

# 一种用于黄曲霉高质量总 RNA 提取方法与应用\*

林剑青, 王成成, 肖春华, 陈国华, 贺竹梅

(中山大学生命科学学院水产品安全教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

**摘要:** 不断发展的研究技术对黄曲霉 RNA 的提取质量提出更高的要求, 而真菌的细胞壁结构及其内源性 RNase 活性常是达到这一目标的主要障碍。以黄曲霉菌丝为材料, 探讨了采用 TES 热酚法获得高质量总 RNA 的方法, 并通过 RT-PCR (反转录聚合酶链式反应) 和 RNA-Sequencing (转录组测序) 对获得的 RNA 进行了质量验证。结果显示, TES 热酚法不但所用试剂价格低廉, 该法所提取的 RNA 质量较高, 其浓度、纯度和完整性均可满足 RT-PCR、转录组测序的文库构建和高通量测序等对 RNA 要求较高的分子生物学实验。

**关键词:** 黄曲霉; RNA 提取; TES 热酚法; RT-PCR; 转录组测序

**中图分类号:** Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2012) 06-0107-05

## A Method for Total RNA Extraction from Fungus *Aspergillus flavus* and Its Application

LIN Jianqing, WANG Chengcheng, XIAO Chunhua, CHEN Guohua, HE Zhumei

(MOE Key Laboratory of Aquatic Product Safety, School of Life Sciences,  
Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** The rapidly developing molecular techniques require the ability to extract high quality RNA from *Aspergillus flavus*. The cell wall structure and endogenous RNase activity in *A. flavus* are often the main obstacles for obtaining RNA with high quality. In this paper, TES hot phenol method was applied to obtain total RNA from *A. flavus*, and the total RNA was further used in RT-PCR (Reverse translation-polymerase chain reaction) and RNA-sequencing. The results showed that the TES hot phenol method can be used to get a good quality of total RNA from this filamentous fungus as templates for following studies, such as RT-PCR and RNA sequencing.

**Key words:** *Aspergillus flavus*; RNA extraction; TES hot phenol method; RT-PCR; RNA-Sequencing

丝状真菌黄曲霉 *Aspergillus flavus* 所产生的黄曲霉毒素 (aflatoxins) 是一组具有强致癌性和免疫毒性的真菌毒素, 对人类健康产生极大的危害。半个世纪以来, 科学家们应用各种生物学技术, 对黄曲霉次级代谢相关基因尤其是黄曲霉毒素代谢相关基因展开了大量的研究<sup>[1-2]</sup>。

随着分子生物学技术的发展, Northern 杂交、cDNA 文库构建、RT-PCR 扩增、荧光定量 PCR、芯片杂交、转录组测序等技术被越来越多地应用于

黄曲霉生长发育及次级代谢机制的研究中, 这也对所提取的 RNA 的质量提出了更高的要求。然而, 丝状真菌细胞具有由几丁质、葡聚糖、脂类和肽类组成的细胞壁结构, 严重影响 RNA 提取效率。因此, 通常用于动物细胞、细菌和酵母中的 RNA 提取方法很难直接用于黄曲霉 RNA 的提取<sup>[3]</sup>。同时, 真菌细胞中含有大量的 RNase 和次级代谢产物, 提取 RNA 的过程中必须抑制内源 RNase 的活性, 同时除去多糖、多酚、蛋白质以及细胞壁残

\* 收稿日期: 2012-03-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31170044)

作者简介: 林剑青 (1986 年生), 男, 硕士研究生; 通讯作者: 贺竹梅; E-mail: lsshezm@mail.sysu.edu.cn

骸<sup>[3-4]</sup>, 否则不仅影响 RNA 的产量和完整性, 还会对后续实验产生直接的影响。

针对以上丝状真菌的特征, 其 RNA 提取包括两个主要关键步骤: 细胞壁的破坏和 RNA 抽提纯化。破坏真菌细胞壁的方法主要包括: 研钵研磨法、玻璃珠研磨法、酶解法、超声波降解法、微波辐射法、加热法等<sup>[3-6]</sup>; 根据抽提缓冲液的不同, RNA 抽提的方法可以分为: TRIzol 法、CTAB 法、异硫氰酸胍法、SDS/酚抽提法等<sup>[4, 7-10]</sup>, 另外还可以使用过柱的方法对 RNA 进行分离纯化。

本文以黄曲霉菌丝为材料, 使用对 RNA 完整性破坏比较小的研钵研磨法破坏细胞壁, 在参考了多种 RNA 抽提方法的基础上, 对热酚法做了较大的改进, 并使用这种改进的 TES 热酚法提取黄曲霉总 RNA, 用紫外分光光度计检测了 RNA 的产量和质量, 并且通过 RT-PCR、RNA 测序对提取的总 RNA 质量进行了进一步检验。实验结果表明这种 TES 热酚法是一种有效的适合黄曲霉总 RNA 提取的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和用具的准备

用于 RNA 提取的研钵、药匙、镊子、试剂瓶等均在 180 °C 条件烘烤 30 min; 所用枪头以及离心管均在 121 °C 高压灭菌 30 min, 烘干备用; 所配试剂均用 DEPC (Sigma) 处理过夜或者用 DEPC 水进行配制; 所用酚为水饱和酚 (Solarbio)。

### 1.2 真菌材料的准备

实验所用黄曲霉菌种 *Aspergillus flavus* NRRL 3357 由本实验室保存。将  $3.3 \times 10^7$  个黄曲霉孢子接入装有 100 mL PDB (Difco) 培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 °C、200 r/min 振荡培养 72 h, 培养物真空抽滤得到菌丝, 称取 0.2 g 菌丝, 置于用液氮预冷的研钵中, 用经过液氮预冷的杵子充分研磨, 直至菌丝成粉末状, 立即进行 RNA 抽提操作。

### 1.3 改良的 TES 热酚法<sup>[10-11]</sup>

具体步骤如下: ①将充分研磨的菌丝粉末加入到含有 4 mL TES 提取缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 0.5% SDS) 和 4 mL 水饱和酚的预冷的 10 mL 离心管中; ②剧烈振荡离心管后, 65 °C 水浴 15 min, 其间每隔 2~3 min 颠倒混匀一次; ③置于冰上充分冷却后, 4 °C、11 000 r/min 离心 10 min; ④转移上层水相至另一盛有 4 mL 酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 并预冷的 10 mL 离心管中, 剧烈振荡, 4 °C、11 000 r/min 离心 10 min;

⑤重复步骤④操作一次; ⑥取上层水相至另一离心管中, 加等体积氯仿/异戊醇 (24:1), 剧烈震荡, 4 °C、11 000 r/min 离心 10 min; ⑦取上层水相至新的离心管中, 加入等体积预冷的异丙醇, -20 °C 沉淀过夜; ⑧4 °C、11 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 用预冷的  $\varphi = 75\%$  乙醇和无水乙醇分别各洗涤沉淀一次, 室温下干燥; ⑨用 200  $\mu$ L DEPC 处理过的 ddH<sub>2</sub>O 溶解沉淀, -70 °C 储存备用。

### 1.4 RNA 完整性以及纯度检测

1.4.1 紫外分光光度计 (NanoVue, GE Healthcare) 测定样品  $A_{260}$  和  $A_{280}$  值, 以检验其浓度和纯度, 每个样品重复 3 次。

1.4.2 甲醛变性胶电泳用 1 × MOPS (20 mmol/L MOPS, 50 mmol/L CH<sub>3</sub>COONa, 10 mmol/L EDTA, pH 7.0) 作为电泳缓冲液, 配制琼脂糖质量分数为 1.2% 的甲醛变性胶, 80 V 电泳 40 min。电泳结束后, 用凝胶成像仪 (天能公司) 成像。

1.4.3 将 TES 热酚法提取获得的 RNA 使用 Gibogreen 染料法进行定量, 三个平行样品按照相同质量进行混合之后, 在安捷伦 2100 生物分析仪上使用 RNA Nano 6000 chip 进行检测分析。

### 1.5 样品中基因组 DNA 的去除以及 cDNA 第一条链合成

使用无 RNase 的 DNase I (Takara) 去除样品中的 DNA; 应用 Invitrogen 公司“用于 qRT-PCR 的 M-MLV 第一链合成系统”试剂盒提供的方法进行 cDNA 第一条链的合成。

### 1.6 RT-PCR

根据相关文献<sup>[12]</sup>, 选取黄曲霉毒素代谢通路中的 *aflR* (678 bp) 和 *aflW* (911 bp) 基因, 设计引物对, *aflR*: 5'-ATTCAACTCGGCGACCATCA-3', 5'-TGCTCAGCAAGTAGCCATCC-3'; *aflW*: 5'-GAAGACCGCGGAGAATGG-3', 5'-GGCCCAATGACTGC C-3'。PCR 体系如下: 10  $\mu$ L 2 × HS Reaction Mix (东盛生物), 正反向引物各 0.5  $\mu$ mol/L, cDNA 约 2  $\mu$ g, 0.2  $\mu$ L HS Taq, 加无菌水至 20  $\mu$ L。在下述 PCR 程序上进行扩增: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s、55 °C 45 s、72 °C 60 s (35 循环); 72 °C 7 min; 4 °C 停止反应。

### 1.7 测序文库的构建与转录组测序

RNA 检测合格后, 使用 Illumina<sup>®</sup> TruSeq<sup>™</sup> RNA Sample Preparation Kit 构建转录组测序文库, 并在安捷伦 2100 生物分析仪上使用 DNA 1000 chip 检测文库质量, 在确保文库合格后, 使用 Genome Analyzer Iix 高通量测序, 并对测序质量进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 的纯度和完整性检测

TES 热酚法提取的总 RNA 样品经紫外分光光度计检测, 得到的  $A_{260}/A_{280}$  比值较稳定, 分布在 2.1 左右 (2.012 ~ 2.184), 说明 RNA 样品几乎不存在污染或者其污染可以忽略不计<sup>[13]</sup>。

在总的 RNA 中大约有 98% ~ 99% 的都是核糖体 RNA (rRNA)<sup>[14]</sup>; 因此, 总 RNA 的完整性可以通过 rRNA 的完整性体现, 而 rRNA 的完整性可以通过  $\varphi = 1.2\%$  甲醛变性胶的凝胶电泳检测。由电泳结果可以看出, 运用 TES 热酚法提取的黄曲霉总 RNA 的 28S、18S rRNA 条带清晰可见, 无弥散现象, 而且 28S rRNA 条带亮度约为 18S rRNA 条带的 2 倍 (图 1), 说明没有发生 RNA 的降解, 其总 RNA 样品的完整性较好。

鉴于以上结果, 进一步采用 RT-PCR 和转录组测序对 TES 热酚法提取的黄曲霉菌总 RNA 的质量进行检验。

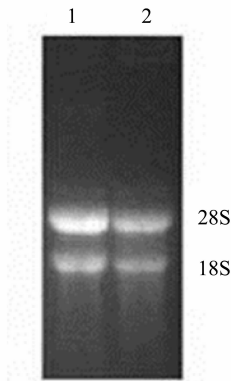


图 1 TES 热酚法提取的黄曲霉菌总 RNA 电泳图  
Fig. 1 Electrophoretogram of total RNA from *Aspergillus flavus* NRRL 3357 extracted by TES hot phenol method (1 和 2 为同一方法不同样品的两个平行组)

### 2.2 RT-PCR 对 TES 热酚法提取的黄曲霉总 RNA 质量的验证

为了验证 TES 热酚法提取的黄曲霉 RNA 的质量, 以其为模板, 我们对黄曲霉毒素代谢基因簇中 *aflR* 和 *aflW* 基因进行了 RT-PCR 特异性扩增。结果显示, 以 TES 热酚法所提取的 RNA 为模板, 进行 RT-PCR, 分别能扩增出清晰的、符合预期大小的 (678 bp 和 911 bp) 特异性条带, 且没有非特异性条带的出现 (图 2), 表明我们所分离出的总 RNA 没有 DNA 污染。

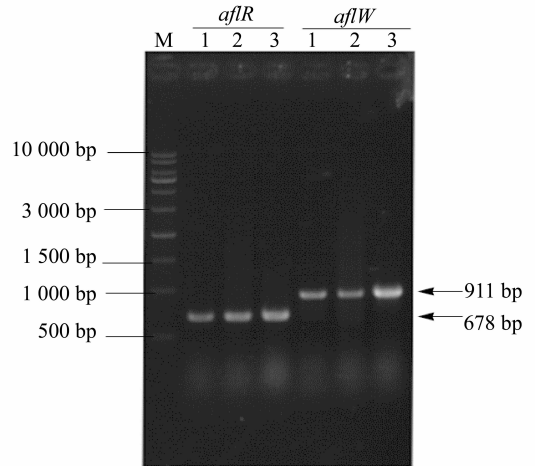


图 2 以 TES 热酚法提取的黄曲霉总 RNA 为模板的 RT-PCR 扩增电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of RT-PCR using total RNA from *Aspergillus flavus* NRRL 3357 extracted by TES hot phenol method as template

### 2.3 转录组测序验证 TES 热酚法提取的黄曲霉总 RNA 的质量

2.3.1 RNA 质量浓度和质量检测: 用于制备转录组文库的总 RNA 样品完整度必须达到 6.0 以上的 RIN (RNA integrity number) 值,  $A_{260}/A_{280}$  的比值应在 1.8 ~ 2.2 的范围内。普通 UV 定量法容易产生严重偏差, 我们使用 Gibogreen 染料法对 RNA 质量浓度重新进行了定量分析, 发现用 TES 热酚法提取的 3 个 RNA 样品的  $A_{260}/A_{280}$  均在 2.1 左右, 纯度较高, 质量浓度达到 400 ng/ $\mu$ L 以上, RNA 总量符合转录组测序要求。使用安捷伦 2100 生物分析仪检测 RNA 完整性,  $RIN > 6$ ,  $S28/S18 = 2.3$ , 表明样品完整性较高。将 3 个样品等量混合后, 再次检测其质量浓度和完整性, 样品完全合格 (表 1), 可以用于转录组文库构建。

2.3.2 转录组文库质量检测: RNA 检测合格后, 使用 Illumina® TruSeq™ RNA Sample Preparation Kit 构建转录组测序文库, 文库体积为 20  $\mu$ L, 质量浓度为 10.58 ng/ $\mu$ L, 在安捷伦 2100 生物分析仪上使用 DNA 1000 chip 对文库进行检测, 结果表明, 黄曲霉转录组文库质量如图 3 所示, 都分布在 (380  $\pm$  50) bp, 没有 100 bp 以下的吸收峰 (这种大小的吸收峰可由引物二聚体纯化不彻底引起), 符合测序要求, 表明可以进行高通量测序。

表 1 TES 热酚法提取的总 RNA 的质量浓度和质量检测

| Table 1 Analysis of concentration and quality of <i>Aspergillus flavus</i> RNA extracted by TES hot phenol method |   |                      |                      |                         |     |
|---|---|----------------------|----------------------|-------------------------|-----|
| 样品  | 质量浓度/<br>( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) | 体积/<br>$\mu\text{L}$ | 总量/<br>$\mu\text{g}$ | $A_{260}/$<br>$A_{280}$ | RIN |
| 样品 1  | 419.3   | 7.15                 | 3.0                  | 2.102                   | >6  |
| 样品 2  | 848.0   | 3.54                 | 3.0                  | 2.109                   | >6  |
| 样品 3  | 845.3   | 3.55                 | 3.0                  | 2.115                   | >6  |
| 混合样品  | 632.0   | 14.24                | 9.0                  | /                       | >6  |

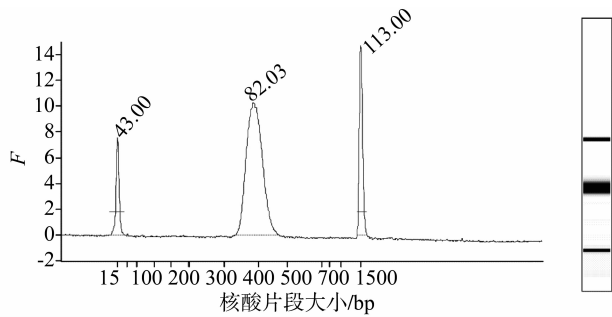


图 3 转录组文库质量检测

Fig. 3 Quality measurement of transcriptomic library  
核酸片段 43.00 和 113.00 bp 的 Marker  
分别是已知片段大小和质量浓度的 DNA 片段

2.3.3 测序质量分析 使用 Genome Analyzer IIx 对转录组文库进行高通量双末端测序, 读长为  $2 \times 115$  bp。进行 reads 过滤, 去除序列中测序质量较差部分后保留长度大于 50 bp 的 reads, 过滤后 reads 的长度分布见图 4, 大部分过滤后的 reads 长度仍在 115 bp 左右。过滤后有效数据量为 2.49 G。对有效数据进行分析, 发现 90.50% 的 reads 可以唯一定位到黄曲霉基因组上, 分析发现, 这些 reads 在基因上呈较均匀的分布, 91% 基因的 reads 覆盖率超过 90%, 说明 reads 对大部分表达基因的覆盖是完整的。

### 3 讨论与结论

本文采用液氮和研钵对黄曲霉菌丝进行研磨的方法破坏其细胞壁, 与玻璃珠研磨法相比, 这种方法价格较为低廉, 适用于 RNA 的大规模提取, 也避免了超声波降解法和微波辐射法中所存在的破坏 RNA 的风险, 同时也不需要像酶解法一样引入新的蛋白质, 从而在不引入新杂质的条件下最大程度地保证了 RNA 的产量和完整性。

由于在完整的细胞内, 多糖多酚类化合物和一些未知次级代谢产物在空间上与核酸是分离的, 但当组织被研磨, 细胞破碎后, 这些物质就会与

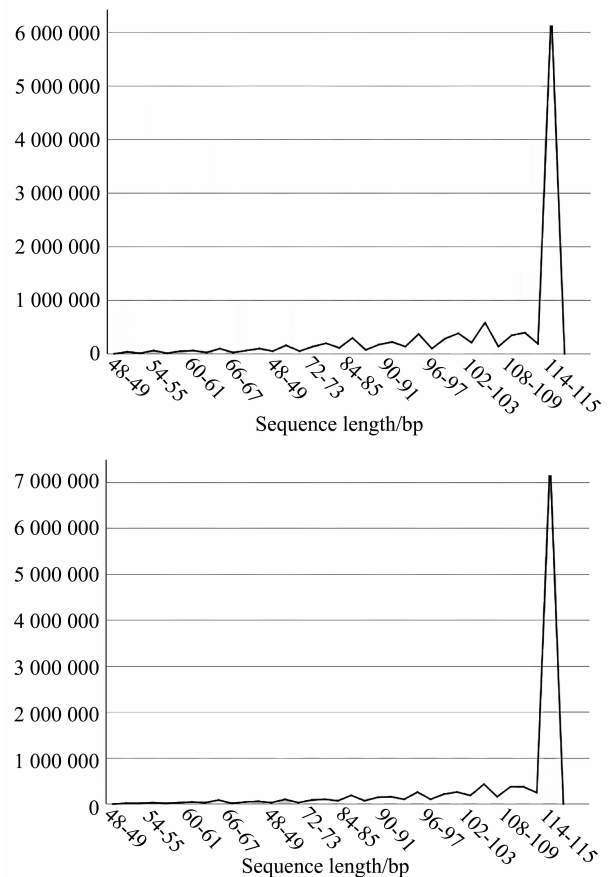


图 4 测序长度分布统计分析

Fig. 4 Distribution of sequence length over all sequences

RNA 相互作用<sup>[15]</sup>, 所以当我们在破坏细胞结构之后就应尽快用酚氯仿抽提以将多糖多酚类物质与 RNA 分离。本文所使用的 TES 热酚法在传统热酚法的基础上进行了改进。传统热酚法中所使用的裂解缓冲液是 SDS 和醋酸钠<sup>[10]</sup>, 而在 TES 热酚法中将裂解缓冲液换成了 Tris-HCl、EDTA 和 SDS。SDS 主要用于蛋白质的变性和促使 RNases 失活; EDTA 是一种金属离子整合剂, 能够进一步抑制 RNases 的活性<sup>[16-17]</sup>。酸性酚与裂解缓冲液合用, 能够在高温及剧烈震荡的条件下有效的破坏细胞, 提取 RNA<sup>[18-19]</sup>。由于 RNA 在碱性条件下对  $\text{OH}^-$  离子诱导的单链裂解更加敏感<sup>[20]</sup> 而导致其极不稳定, 因此, 我们用酸性水饱和酚 (pH 5.2) 来维持整个提取过程的酸性环境。氯仿能够使蛋白质变性, 异戊醇能够减少蛋白质在变性过程中的起泡现象, 在 RNA 提取过程中先后使用酚、酚/氯仿/异戊醇、氯仿/异戊醇进行抽提, 能够充分去除蛋白质等杂质, 从而保证所提取 RNA 的浓度、纯度和完整性, 以满足后续对 RNA 质量有较高要求的分子生物学实验, 且此法所用试剂相对于 Trizol 试剂盒价格

更低廉, 适用于大批量的 RNA 提取。

本文对 TES 热酚法提取的 RNA 进行了 PCR 扩增和转录组测序。通过 PCR 可以扩增出预期大小的特异性条带。在转录组测序的文库构建和高通量测序过程中的一系列质量控制实验均表明, TES 热酚法所提取的 RNA 质量较高, 用它所构建的转录组测序文库质量符合测序要求。转录组测序结果分析表明, 转录组测序实验获得了较高质量的数据, 说明 TES 热酚法所提取的 RNA 浓度、纯度和完整性较高。

#### 参考文献:

- [1] KENSLER T W, ROEBUCK B D, WOGAN G N, et al. Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology [J]. *Toxicol Sci*, 2011, 120 (Suppl 1): 28–48.
- [2] LIU S Y, LIN J Q, WU H L, et al. Bisulfite sequencing reveals that *Aspergillus flavus* holds a hollow in DNA methylation [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7: e30349.
- [3] LEITE G M, MAGAN N, MEDINA A. Comparison of different bead-beating RNA extraction strategies: an optimized method for filamentous fungi [J]. *J Microbiol Methods*, 2012, 88(3): 413–418.
- [4] YANG F, TAN H, ZHOU Y, et al. High-quality RNA preparation from *Rhodosporidium toruloides* and cDNA library construction therewith [J]. *Mol Biotechnol*, 2011, 47: 144–151.
- [5] FREDRICKS D N, SMITH C, MEIER A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43: 5122–5128.
- [6] GRIFFITHS L J. Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR [J]. *J Med Microbiol*, 2006, 55: 1187–1191.
- [7] CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1: 581–585.
- [8] VAN DESSEL W, VAN MELLAERT L, GEUKENS N, et al. Isolation of high quality RNA from *Streptomyces* [J]. *J Microbiol Methods*, 2004, 58: 135–137.
- [9] LI R, MOCK R, HUANG Q, et al. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens [J]. *J Virol Methods*, 2008, 154: 48–55.
- [10] AMIN-UL MANNAN M, SHARMA S, GANESAN K. Total RNA isolation from recalcitrant yeast cells [J]. *Anal Biochem*, 2009, 389: 77–79.
- [11] UPPULURI P, PERUMAL P, CHAFFIN WL. Analysis of RNA species of various sizes from stationary-phase planktonic yeast cells of *Candida albicans* [J]. *FEMS Yeast Res*, 2007, 7(1): 110–117.
- [12] YU J, CHANG P K, EHRlich K C, et al. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 1253–1262.
- [13] KEULEN G V, SIEBRING J, REMBACZ K P, et al. Improved method for the isolation of RNA from (standing liquid cultures of) *Streptomyces* [J]. *J Microbiol Methods*, 2004, 58: 139–142.
- [14] LOPEZ-GOMEZ R, GOMEZ-LIM M A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp [J]. *HortScience*, 1992, 27: 440–442.
- [15] 郑丽霞, 林晓东, 朱芳德, 等. 龙眼 FLO/LFY 同源基因 cDNA 片段的克隆 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2004, 43: 60–64.
- [16] HEARST J E, VINOGRAD J. The net hydration of deoxyribonucleic acid [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1961, 47(6): 825–830.
- [17] HEARST J E, VINOGRAD J. The net hydration of T-4 bacteriophage deoxyribonucleic acid and the effect of hydration on buoyant behavior in a density gradient at equilibrium in the ultracentrifuge [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1961, 47(7): 1005–1014.
- [18] GOLDEN S S, BRUSSLAN J, HASELKORN R. Genetic engineering of the cyanobacterial chromosome [J]. *Methods Enzymol*, 1987, 153: 215–231.
- [19] BOVY A, DE KRUIF J, DE VRIEZE G, et al. Iron-dependent protection of the *Synechococcus ferredoxin I* transcript against nucleolytic degradation requires cis-regulatory sequences in the 5' part of the messenger RNA [J]. *Plant Mol Biol*, 1993, 22(6): 1047–1065.
- [20] BIRNBOIM H C. Extraction of high molecular weight RNA and DNA from cultured mammalian cells [J]. *Methods Enzymol*, 1992, 216: 154–160.