

适合于全长 cDNA 文库构建的猪苓菌核及菌丝体总 RNA 提取方法比较

李杨, 李海娜, 夏颖, 刘忻壑, 李艳茹, 许广波* (延边大学农学院, 吉林延吉 133002)

摘要 [目的]筛选出适合于 cDNA 文库构建的猪苓菌核及菌丝体总 RNA 的提取方法。[方法]采用 Trizol 改良法和 EASY Spin 植物快速提取试剂盒(简称试剂盒法)对猪苓菌丝及菌核的总 RNA 进行提取。[结果]经紫外分光光度计对所得总 RNA 的均一性及 1% 琼脂糖凝胶电泳对所得总 RNA 的完整性检测后发现, 2 种方法均可提出完整的总 RNA, 试剂盒法相较于 Trizol 改良法其所提取的总 RNA 质量和纯度都较好, 但 Trizol 改良法所提取的总 RNA 产率比较高。[结论]LD-PCR 成功合成了猪苓菌核和菌丝体的 cDNA 产物, 呈弥散状分布在 1 000~5 000 bp 和 750~2 500 bp, 满足 cDNA 建库的要求。

关键词 猪苓; 菌丝; 菌核; 总 RNA 提取方法

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)02-0063-03

Comparison of Methods for Extracting Total RNA from *Polyporus umbellatus* Mycelium and Sclerotium Suitable for Constructing Full-length cDNA Library

LI Yang, LI Hai-na, XIA Ying et al (College of Agriculture, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

Abstract [Objective] To screen out the method for extracting total RNA from *Polyporus umbellatus* mycelium and sclerotium suitable for cDNA library construction. [Method] The total RNA of mycelium and sclerotium of *P. umbellatus* was extracted by improved Trizol method and EASY Spin plant RNA kit method (kit method for short). [Result] The total RNA was homogenized by UV spectrophotometer and the integrity of the obtained total RNA was detected by 1% agarose gel electrophoresis. It was found that both methods could provide the complete total RNA. Compared with the kit method, the total RNA extracted by the improved Trizol method was better in quality and purity, but the total RNA extracted by improved Trizol method had higher yield. The cDNA of mycelium and sclerotium of *P. umbellatus* was successfully synthesized by LD-PCR and distributed in the range of 1 000-5 000 bp and 750-2 500 bp, which satisfied the requirement of cDNA library construction.

Key words *Polyporus umbellatus*; Mycelium; Sclerotium; Total RNA extraction method

cDNA 文库构建是现代生物技术研究中一项很重要的技术, 是大规模与高效率获得基因序列的有效途径, 特别是对基因组庞大且短期内不能进行全基因组测序的某些物种来说, 其是有效开展功能基因组研究的一条重要途径^[1]。通过构建全长 cDNA 文库能够直接发现并克隆与生命活动有关的调控基因, 进而阐述其基因所编码的蛋白质性质及其相互作用的关系。然而, 构建高质量的全长 cDNA 文库并不容易, 要获得完整的 mRNA 就是一个棘手问题。目前从细胞中提取总 RNA 的方法很多, 通常采用的方法有 Trizol 法、改良 CTAB 法、SDS 酸酚法、异硫氰酸胍-CTAB 法、异硫氰酸胍-SDS 法等, 提取纯度高、完整性好的 mRNA 是顺利构建 cDNA 文库、RT-PCR 以及 EST 序列分析等分子生物学研究的关键^[2-4]。为此, 许多公司制定和生产了用于提取不同物种总 RNA 的方法和试剂盒, 但不同物种细胞组织中所含的成分(多糖、多酚等)有很大差异, 因此, 不同方法和不同厂家的试剂盒间也各有优缺点。

猪苓 [*Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr.] 是一种药用大型真菌, 在分类学上属于无隔担子菌亚纲 (Holobasidiomycetidae)、无褶菌目 (Aphyllphorales)、多孔菌科 (Polyporaceae)、多孔菌属 (*Polyporus*)。猪苓主要分布于我国陕西等西南省区和东北长白山区^[5]。Xing 等^[6]通过分析比对 nr DNA ITS 和 28s rRNA (LSU) 序列认为猪苓的种群发源地应是陕西省和甘肃省。猪苓的生长过程可分为菌丝体萌发、菌核生长和子实体形成三个阶段。生长 3 年的菌核(黑苓)才可作为药

材, 一般认为, 猪苓菌核生长周期长, 细胞趋于木质化^[7], 在菌核中会大量富集多糖、酚类等次生代谢产物。尤其是酚类物质易被氧化成醌, 与 RNA 不可逆地结合, 增加了提取足够质量与纯度的总 RNA 的难度。目前还少有关于从猪苓菌核中提取总 RNA 方法的文献报道。笔者以产于陕西的猪苓菌核及菌丝体为试材, 通过 Trizol 改良法和 EASY Spin 植物快速提取试剂盒(简称试剂盒法)提取总 RNA, 探索提取猪苓菌核及菌丝体总 RNA 的最适方法, 为后续构建陕西猪苓菌核及菌丝体的 cDNA 文库奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料。猪苓菌核为采自于陕西省佛坪县的 3 年生黑苓, 菌丝体采用组织分离法从猪苓菌核中分离获得, 再经转管活化和扩繁后保存于延边大学农学院微生物实验室。

1.1.2 供试试剂。

1.1.2.1 RNA 提取试剂。Trizol® Reagent 购于 Invitrogen 公司; EASY Spin 植物快速提取试剂盒购于北京艾德莱生物科技有限公司。

1.1.2.2 其他试剂。DEPC 购于 Solarbio 公司; Advantage® 2 PCR kit 购于 Clontech 公司; 其他常规生化试剂均为国产分析纯。

1.1.3 供试引物。SMART IVTM Oligonucleotide (12 μmol/L) 5' - AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCCGG - 3'; CDS III/3' PCR Primer (12 μmol/L) 5' - ATTCTA-GAGGCCGAGGCGCCGACATG - d(T)₃₀N₋₁N - 3'。

1.2 方法

1.2.1 猪苓菌核及菌丝体中总 RNA 提取。

1.2.1.1 Trizol 改良法^[8]。取 1.5 mL 预冷后 EP 管, 分别加

基金项目 国家自然科学基金项目(31160014)。

作者简介 李杨(1995—), 女, 吉林松原人, 硕士研究生, 研究方向: 药用真菌学。*通讯作者, 教授, 硕士生导师, 从事微生物学研究。

收稿日期 2017-11-22

入 80 mg 经液氮研磨后的猪苓菌核及菌丝体粉末,经 1 mL Trizol 试剂的裂解后,加入氯仿产生有机相,离心取上清后加入等体积的水饱和酚、三氯甲烷和异戊醇去除蛋白质^[9],离心取上清后用异丙醇沉淀 RNA^[10],离心去上清后由 75% 乙醇清洗沉淀 2~3 次,最后用 DEPC 水溶解沉淀。

1.2.1.2 试剂盒法。参照 EASY Spin 植物 RNA 快速提取试剂盒说明书的方法进行操作。

1.2.2 总 RNA 检测。用紫外分光光度法检测提取总 RNA 的均一性;用 1% 琼脂糖凝胶、TAE 缓冲液电泳检测所得总 RNA 的完整性。

1.2.3 猪苓菌核及菌丝体 cDNA 的合成。

1.2.3.1 cDNA 第一链的合成。向 0.5 mL EP 管中加入 3 μ L 总 RNA、1 μ L SMART IVTM Oligonucleotide、1 μ L CDS III/3' PCR Primer,瞬时离心。72 $^{\circ}$ C 孵育 2 min,冰上冷却 2 min,瞬时离心。再按顺序加入 2 μ L 5 \times First-Strand Buffer、1 μ L DTT(20 mmol/L)、1 μ L dNTP Mix(10 mmol/L)、1 μ L SMARTScribeTM MMLV Reverse Transcriptase,反应体系为 10 μ L,轻轻混合。42 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,将管置于冰上终止反应。

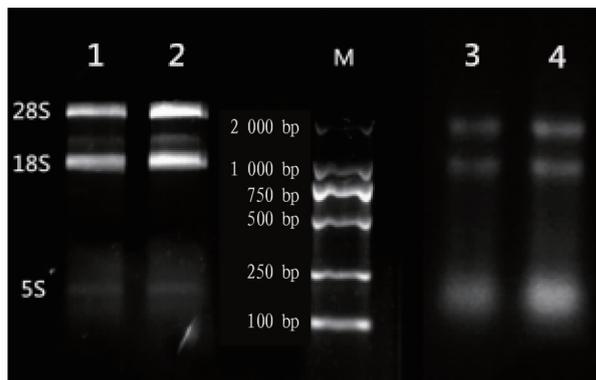
1.2.3.2 LD-PCR 扩增双链 cDNA。通过 LD-PCR 扩增双链 cDNA 反应体系如下:2 μ L First-Strand cDNA,80 μ L Deionized H₂O,10 μ L 10 \times Advantage 2 PCR Buffer,2 μ L 50 \times dNTP Mix,2 μ L 5' PCR Primer,2 μ L CDS III/3' PCR Primer,2 μ L 50 \times Advantage 2 Polymerase Mix,总体积 100 μ L。

反应扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 20 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,68 $^{\circ}$ C 6 min,为增加 DNA 产量设置 25 个循环。1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

2 结果与分析

2.1 RNA 完整性检测 采用 2 种提取方法都可以从猪苓菌核和菌丝体中提取出总 RNA,由图 1 和图 2 的电泳结果可见,都出现了总 RNA 的 28S、18S、5S 这 3 条条带。但是 Trizol 改良法的 5S 条带拖尾现象比较严重,说明 Trizol 改良法提取的总 RNA 存在着降解问题,可能是 RNase 酶未去除干净或温度过高导致 RNA 单链断裂,致使 RNA 降解;而试剂盒法提取出的 RNA,3 条带比较清晰,意味着 RNA 没有出现蛋白质残留或 DNA 污染等现象,而且 28S 的亮度约为 18S 的 2 倍,表明提取的总 RNA 完整性很高,没有发生降解。

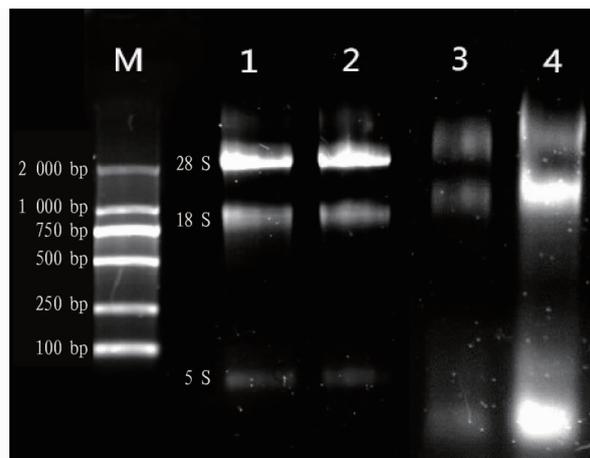
2.2 RNA 均一性检测 用紫外分光光度计测定 OD_{260/280} 来检验所提取总 RNA 的均一性,当 OD_{260/280} 值过小时,表明有蛋白质或酚污染;当 OD_{260/280} 值大于 2.2 时,意味着 RNA 已经降解成单核酸了^[10-11]。由表 1 可知,采用试剂盒法提取总 RNA 的 OD_{260/280} 比值均为 1.7~2.1,表明总 RNA 纯度很



注:1,2 为试剂盒法;3,4 为 Trizol 改良法;M 为 DL 2000 Marker
Note:1,2. EASY Spin Plant RNA kit method;3,4. Improved Trizol method;M. DL2000 Marker

图 1 不同方法提取猪苓菌核总 RNA

Fig. 1 Total RNA from sclerotium of *P. umbellatus* using different methods



注:1,2 为试剂盒法;3,4 为 Trizol 改良法;M 为 DL 2000 Marker
Note:1,2. EASY Spin Plant RNA kit method;3,4. Improved Trizol method;M. DL 2000 Marker

图 2 不同方法提取猪苓菌丝体总 RNA

Fig. 2 Total RNA from mycelium of *P. umbellatus* using different methods

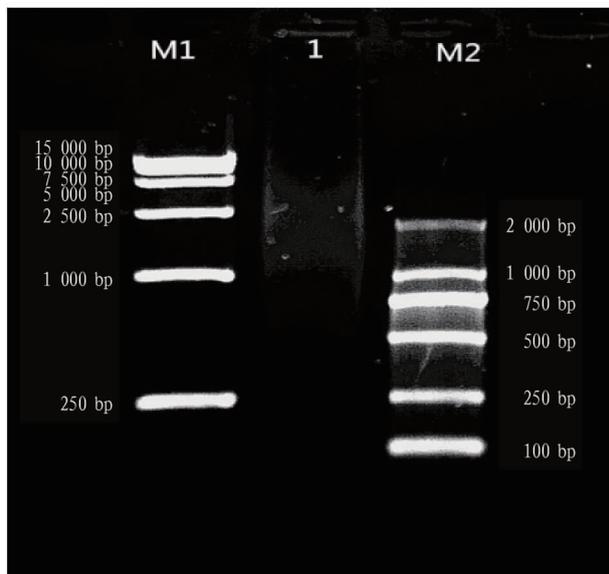
高;而采用 Trizol 改良法提取总 RNA 的 OD_{260/280} 比值大于 2.2,表明总 RNA 已经降解。但是,相比 Trizol 改良法,试剂盒法提取的总 RNA 产量偏低,推测是样品在用基因组 DNA 清除柱清除残留 DNA 时 RNA 的产量也严重降低。猪苓菌核中的总 RNA 产量明显低于菌丝体中的总 RNA 产量,其原因可能是因为菌核处于休眠状态,活性较弱,且菌核细胞趋于木质化,裂解难度增大,导致总 RNA 产量比较低。

表 1 不同方法提取猪苓菌核和菌丝体的纯度与产率比较

Table 1 Comparison of quality and efficiency of extracted total RNA from sclerotium and mycelium of *P. umbellatus* by different methods

| 方法 Method | 样品 Sample | 猪苓菌核 Sclerotium of <i>P. umbellatus</i> | | 猪苓菌丝体 Mycelium of <i>P. umbellatus</i> | |
|------------------------|--------------|---|--------------------------------|--|--------------------------------|
| | | OD _{260/280} | 产率 Productivity// μ g/g | OD _{260/280} | 产率 Productivity// μ g/g |
| 试剂盒法 EASY Spin | 1 | 2.06 | 2.46 | 1.99 | 7.51 |
| Plant RNA kit method | 2 | 2.09 | 3.31 | 1.95 | 4.84 |
| Trizol 改良法 | 3 | 2.24 | 6.43 | 1.97 | 16.81 |
| Improved Trizol method | 4 | 2.26 | 6.94 | 2.19 | 12.47 |

2.3 LD-PCR 扩增 cDNA 通过对猪苓菌核及菌丝体的 cDNA 合成和 LD-PCR 扩增,经电泳检测扩增产物,其结果见图 3、4。猪苓菌核和菌丝体的引物扩增条带弥散分别分布在 1 000 ~ 5 000 bp 和 750 ~ 2 500 bp,说明它们的 cDNA 扩增带的丰度和长度均符合 cDNA 文库构建条件。

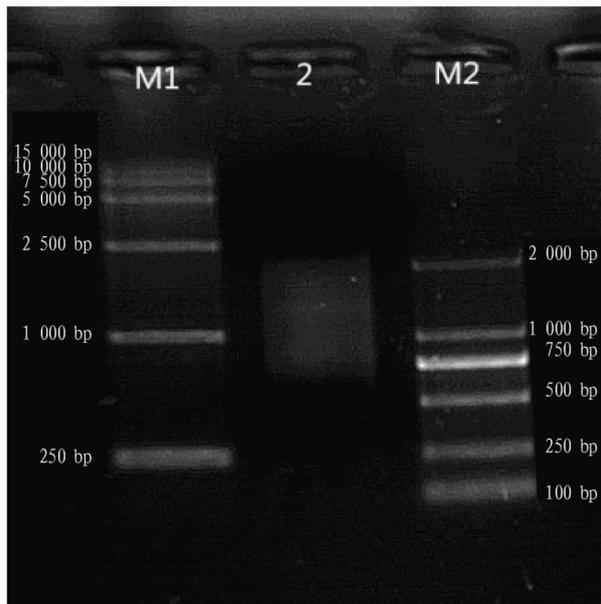


注: M1 为 DL 15000 Marker; M2 为 DL 2000 Marker; 1 为猪苓菌核双链 cDNA

Note: M1. DL 15000 Marker, M2. DL 2000 Marker; 1. Double-strand cDNA of sclerotium of *P. umbellatus*

图 3 猪苓菌核 LD-PCR 结果

Fig. 3 LD-PCR products of sclerotium of *P. umbellatus*



注: M1 为 DL 15000 Marker; M2 为 DL 2000 Marker; 2 为猪苓菌丝双链 cDNA

Note: M1. DL 15000 Marker, M2. DL 2000 Marker; 2. Double-strand cDNA of mycelium of *P. umbellatus*

图 4 猪苓菌丝 LD-PCR 结果

Fig. 4 LD-PCR products of mycelium of *P. umbellatus*

3 讨论与结论

猪苓菌核细胞内含有较多的多糖和麦角甾醇,而且其含量随年份增加亦明显升高,而用液体发酵培养的菌丝体多糖和麦角甾醇含量更是高于菌核^[12]。猪苓菌核是由拟薄壁组织和疏丝组织形成的一种休眠体,是菌核贮藏养分的器官^[13],这些因素都明显增加了猪苓菌核及菌丝体总 RNA 的提取难度。栾焕东等^[14]采用 Trizol 法、Trizol 改良 1 法、Trizol 改良 2 法及 CTAB 改良法对长白山猪苓菌丝体总 RNA 的提取结果表明,Trizol 法存在多糖多酚污染,影响了 RNA 的完整性,CTAB 改良法耗时较长,产率比较低,Trizol 改良 1 法、Trizol 改良 2 法提取的总 RNA 无论是完整性还是纯度均较 Trizol 法与 CTAB 改良法好。秦亚丽^[15]分别采用 Trizol 试剂法、RNAiso plus 法、RNAiso plus 搭配 RNAiso-mate for Plant Tissue 法、CTAB-LiCl 法及 Trizol Reagent 法共 5 种方法对陕西猪苓菌丝体总 RNA 进行提取,结果表明 CTAB 法与 Trizol Reagent 法所提出的 RNA 产率低,且 OD_{260/280} 也达不到要求; Trizol 法与 RNAiso plus 法虽得出了明显的条带,但存在蛋白质或多糖污染,而 RNAiso plus 搭配 RNAiso-mate for Plant Tissue 法经改良后得到的 RNA 质量和产量都很好。

鉴于猪苓菌核特殊的结构和在提取总 RNA 时出现的困难,笔者认为需要注意以下几点:①加入裂解液前要保证猪苓样品一直处于冷冻的状态;②针对猪苓菌核难提取易降解的情况,可适当增加裂解液的量并延长裂解液与猪苓样品接触的时间;③用提前预热到 75 ~ 85 °C 的 RNase-free H₂O 溶解 RNA,这些可以在一定程度上提高总 RNA 产量。

该研究采用了 Trizol 改良法和试剂盒法 2 种不同的方法提取猪苓菌核和菌丝体的总 RNA。Trizol 试剂作为普遍的 RNA 提取试剂,虽然成功率高,但所得总 RNA 纯度较低,完整性较差,易降解;而试剂盒法比较简便,且提取时间短,通常 30 min 就可以完成,所得 RNA 纯度比较高,完整性也较好。

参考文献

- [1] 姜静. 分子生物学实验原理与技术[M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社, 2003.
- [2] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南(上册)[M]. 北京:科学出版社, 2005.
- [3] BUTT R H, PFEIFER T A, DELANEY A, et al. Enabling coupled quantitative genomics and proteomics analyses from rat spinal cord samples[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(9): 1574 - 1588.
- [4] 周玉婷, 王钰. 苹果 RNA 提取方法的探索[J]. *运城学院学报*, 2010, 28(5): 43 - 44.
- [5] 许广波, 傅伟杰, 赵旭奎. 我国猪苓研究的进展[J]. *菌物研究*, 2003, 1(1): 58 - 61.
- [6] XING X K, MA X T, HART M M, et al. Genetic diversity and evolution of Chinese traditional medicinal fungus *Polyporus umbellatus* (Polyporales, Basidiomycota) [J]. *Plos one*, 2013, 8(3): 1 - 10.
- [7] 郭顺星, 徐锦堂. 猪苓菌核结构性质的研究[J]. *菌物学报*, 1991, 10(4): 312 - 317.
- [8] 杨楠, 徐正进, 周永力. 改良 TRIZOL 法提取高质量稻曲病菌总 RNA 的方法[J]. *现代农业科技*, 2008(11): 145 - 149.
- [9] 王阿娜, 裴瑾, 刘薇, 等. 桑叶片总 RNA 提取方法的比较研究[J]. *中成药*, 2012, 34(7): 1377 - 1380.
- [10] 张晓丽, 代红军. 植物 RNA 提取方法的研究进展[J]. *北方园艺*, 2014(8): 175 - 178.

(下转第 77 页)

差异不大,15 a 之后二者差异明显,最大差值为 0.0014 m^3 。阳坡林分变化趋势与阴坡林分的材积连年生长量变化趋势基本相似,前期差异不大,最大差值为 0.0014 m^3 ,20 a 后两者差异较明显,最大差值为 0.0032 m^3 。

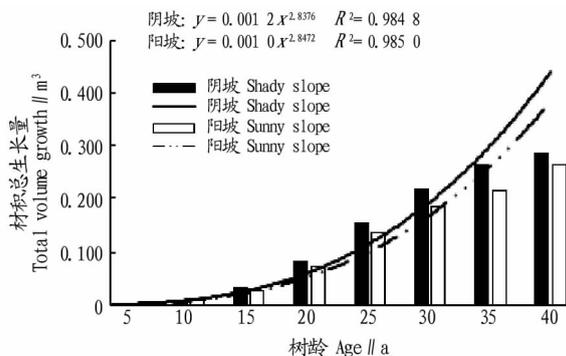


图7 不同坡向华北落叶松材积总生长量的生长过程

Fig. 7 Growth process of total volume growth of *Larix principis-rupprechtii* in different slope directions

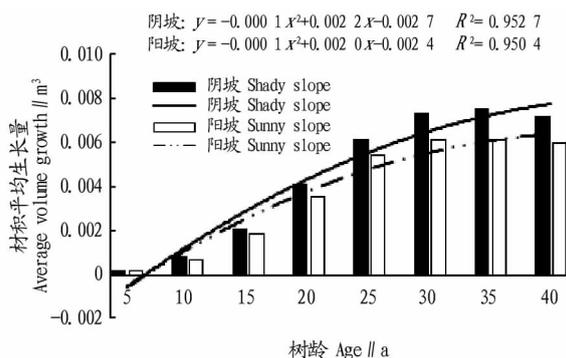


图8 不同坡向华北落叶松材积平均生长量的生长过程

Fig. 8 Growth process of average volume growth of *Larix principis-rupprechtii* in different slope directions

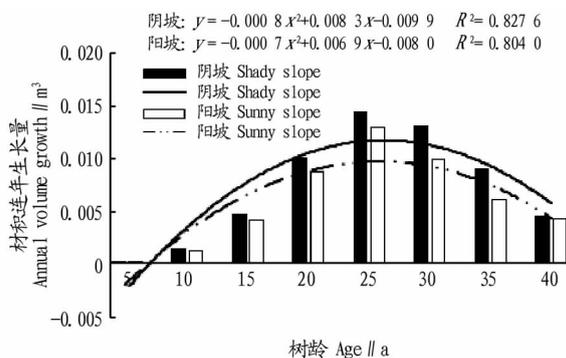


图9 不同坡向华北落叶松材积连年生长量的生长过程

Fig. 9 Growth process of annual volume growth of *Larix principis-rupprechtii* in different slope directions

3 讨论

笔者在研究华北落叶松人工林林木生长状况时,只考虑了坡向因子,并未涉及其他影响林木生长的立地因子,如海拔、坡位和坡度等因子。海拔、坡向、坡位和坡度对华北落叶松人工林林木生长有着不同程度的影响,其中海拔、坡向对华北落叶松的生长有较大影响^[2]。笔者在选取标准样地时,每块样地的基本情况大致相同,海拔对每块样地的林木生长影响较小。

林木胸径生长既受立地条件的影响,又与林分密度结构有密切关系,密度对胸径、树高和单株材积生长均有一定程度的影响,尤其是对胸径总生长的影响更为显著^[3]。该研究表明,在立地条件基本一致的情况下,阴坡的胸径生长量均大于阳坡,这种结果也可能与林分密度或土壤水分有关。笔者采用对华北落叶松人工林的平均木进行树干解析的方法研究,如果采用优势木进行树干解析,可能也会影响试验结果。该试验得到的结论与隋玉龙等^[4]研究的结论基本一致,坡向对林木生长状况的影响可能与树种无关,对于这方面还需要进一步研究。

对于冀北山区来说,阴坡比阳坡林木生长得好,可能是由于阴坡和阳坡的水热条件和土壤理化性质的差异较大^[5],阳坡蒸发量大,温度高,土壤含水量低;阴坡蒸发量少,土壤含水量高。华北落叶松虽然是喜阳树种,但是由于冀北山地是干旱地区,水分是限制冀北山地华北落叶松人工林林木生长的主要因素。因此,在冀北山地种植华北落叶松人工林宜选阴坡种植。这与王勇^[6]、王梅等^[7]、李晶^[5]的研究结论一致,但罗广军^[8]研究认为,阳坡华北落叶松的生长要优于阴坡,原因可能是所选样地林分的树种为喜阳、耐旱树种,且阳坡的光照条件较好。

参考文献

- [1] MÄKINEN H, NÖJD P, SARANPÄÄ P. Seasonal changes in stem radius and production of new tracheids in Norway spruce [J]. *Tree physiology*, 2003, 23(14): 959-968.
- [2] 张宝忠, 孙德学, 金有林. 辽西地区华北落叶松造林立地条件选择的研究[J]. *防护林科技*, 2005, 11(6): 19-20.
- [3] 刘春延. 河北塞罕坝华北落叶松人工林生长及生境因子关系研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2009.
- [4] 隋玉龙, 李雷, 马莉, 等. 冀北山地不同坡向人工油松林生长规律研究[J]. *保定: 河北林业科技*, 2013, 12(6): 7-9.
- [5] 李晶. 落叶松人工林生长与立地因子关系的研究[J]. *林业科技*, 1991, 3(2): 7-9.
- [6] 王勇. 燕山山地华北落叶松人工林生长规律研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2014.
- [7] 王梅, 张文辉. 不同坡向人工油松林生长状况与林下物种多样性分析[J]. *西北植物学报*, 2009, 29(8): 1678-1683.
- [8] 罗广军. 赤松人工林生长与立地因子的关系[J]. *林业科技*, 2006, 31(6): 9-11.

(上接第 65 页)

- [11] 汪天虹. 分子生物学实验[M]. 北京: 北京大学出版社, 2008: 36.
- [12] 李雯瑞, 梁宗锁, 陈德育, 等. 不同发育阶段猪苓菌核显微结构和成分含量的比较[J]. *西北林学院学报*, 2013, 28(4): 116-121.
- [13] 周微微. 猪苓菌核及发酵菌丝体化学成分研究及质量分析[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2008.

- [14] 栾焕东, 战莹莹, 姜颖越, 等. 长白山药用真菌鸡爪苓菌丝体总 RNA 提取方法的比较[J]. *延边大学农学报*, 2014, 36(4): 297-301.
- [15] 秦亚丽. 猪苓遗传多样性及多糖合成酶-UGPase 基因的克隆[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.