

一种提取小型昆虫总 RNA 的有效方法^{*}

邓 顺^{**} 张友军^{***} 褚 栋

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081)

An effective method to extract total RNA from small insects. DENG Shun^{**}, ZHANG You-Jun^{***}, CHU Dong
(*Institute of Vegetable and Flower, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*)

Abstract Integrated and purified RNA was extracted from aphids and other small insects, using ordinary chemicals sodium dodecylsulfate (SDS), potassium acetate(KAc), etc. Experiments proved the extracted RNA had good quality that could be used to RT-PCR and construct the cDNA library. The extraction method was simple, safe and highly efficient by comparing with other methods, appropriate to extract RNA from medium and small insects.

Key words Small insects, RT-PCR, RNA extraction

摘 要 实验采用 SDS、乙酸钾(KAc)等常规化学试剂从蚜虫等小型昆虫中获得完整且纯度较高的 RNA。进一步的实验证明提取的 RNA 可用于 RT-PCR 以及 cDNA 文库的建立等。该方法简捷、相对安全和快速、提取效率较高, 适合于中小型昆虫 RNA 的提取。
关键词 小型昆虫, RT-PCR, RNA 提取

许多昆虫个体较小, RNA 含量较少, 提取困难。目前市场上针对于昆虫而开发的 RNA 提取试剂很少, 而且多数采用 Trizol 等氧化性较强的试剂, 常配合有毒试剂如氯仿的使用, 并且要求提取前昆虫量较大。本实验参照热酚法^[1]和 SDS-KAc 法^[2]提取 RNA 做了适当改进, 改进后的方法能够简捷、相对安全和快速地从小型昆虫中提取到完整的、DNA 污染很少的 RNA, 而且提取效率较高。

1 材料和方法

1.1 材料

桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer)、烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 和 西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergands) 的成虫采于中国农业科学院蔬菜花卉研究所温室内, 用 70% 的酒精(DEPC 水配制) — 20℃保存^[1]。

1.2 提取方法及试剂

1.2.1 提取试剂: 十二烷基硫酸钠(SDS); BIO BASIC INC; Tris-HCl (pH = 8.0)、乙二胺四乙酸(EDTA)、0.05% 的焦碳酸二乙酯(DEPC); 北京科昊达生物科技发展有限公司; 蛋白酶 K (20

mg/mL, TIANGEN) 酸性饱和酚 (pH < 5.0); 北京鼎国生物技术有限公司; NaCl、醋酸钾(KAc)、异丙醇及乙醇; 北京化工厂。

1.2.2 裂解液的配制及乙酸钾 pH 值的调节: 裂解液: 2% SDS, 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L EDTA, DEPC 水, 3 mol/L KAc (pH 4.8) (配制时用冰醋酸调节, 热浴可以加快 KAc 在乙酸中的溶解)。

1.2.3 提取方法^[3]: (1) 取桃蚜/烟粉虱/蓟马的成虫于 DEPC 水中漂洗, 然后用处理过的吸水纸吸干。

(2) 用 DEPC 处理过的昆虫针将桃蚜/烟粉虱/蓟马挑至 1.5 mL 的离心管中, 加入 30 μL 上述配置好的裂解液, 整个过程在通风橱中进行。

(3) 然后用预先烧好的封顶枪头将昆虫捣碎, 捣碎完毕后再加入 60 μL 裂解液, 将枪头上的残余冲洗。

^{*} 国家重点研究发展计划资助项目 (2002CB111400)。

^{**} E-mail: dshun1979@yahoo.com.cn

^{***} 通讯作者, E-mail: zhangyj@mail.caas.net.cn

收稿日期: 2006-08-17, 修回日期: 2006-10-08, 接受日期: 2006-

(4) 加入 10 μ L KAc(pH 4.8), 用枪头混匀, 使溶液终浓度为 0.3 mol/L。

(5) 加入 100 μ L 饱和酸性酚, 剧烈振荡 5 ~ 15 s。

(6) 加入 3 μ L 蛋白酶 K, 在水浴锅中 55 ~ 65 $^{\circ}$ C 恒温热浴 5 ~ 10 C 后放置冰上 10 min 左右 (热浴时间和冰浴时间视虫量而定)。

(7) 从冰上取出, 在冷冻离心机下 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 V。

(8) 取上清液于另一 1.5 mL 离心管中, 加入等体积的饱和酸性酚, 来回颠倒后在 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min (注: 虫量较小时此步可省略)。

(9) 取上清液于另一 1.5 mL 离心管中, 然后加入等体积的异戊醇或无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 下放置 15 ~ 30 min。

(10) 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min。

(11) 弃上清后加入 75% 的乙醇洗涤沉淀, 常温下 13 000 r/min 离心 1 min, 尽量去除乙醇残留, 重复 2 ~ 3 次。

(12) 放置于通风橱中自然干燥, 注意 RNA 沉淀不能完全干燥。

(13) 加入配制好的无 RNAase 的 TE 溶液 10 μ L 于离心管中。

(14) 保存于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱内。

1.3 紫外分光光度计和琼脂糖检测

从每管中取出 1 μ L, 加无 RNase 的 TE 水至 100 μ L 混匀后, 测定其 260、280 nm 的吸光度, 并根据 A260/A280 的比值评估 RNA 的纯度 (正常范围: 1.8 ~ 2.0)。另取 3 ~ 4 μ L 用于琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性。

1.4 RT-PCR 反应检测 RNA 的质量

取 1 μ L 提取的蚜虫 RNA 溶液, 逆转录后作为 cDNA 模板, 然后选取 1 对简并引物 *Sa. acel*^[4,5] (由上海生工合成) 扩增桃蚜的 AChE 基因, 逆转录时采用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 试剂盒, PCR 反应步骤参考陈茂华^[5] 的体系做适当调整, 1.2% 琼脂糖电泳鉴定 PCR 产物, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察电泳结果。

1.5 RNA 提取效率比较

采用 Trizol (Invitrogen 公司) 试剂按照 RNA 提取说明书和改进后的 SDS-KAc-热酚法提取单头烟粉虱的 RNA, 提取后检测其纯度、完整性等。

2 结果与分析

2.1 RNA 纯度的检测

通过 UV-2000 紫外分光光度计检测本实验所提取的蚜虫、烟粉虱和蓟马的总 RNA, 测得 RNA 紫外光吸收值均在 1.8 到 2.0 之间 (表 1), 说明提取的 RNA 纯度较高。另取 3 ~ 4 μ L RNA 溶液, 用 1.2% 甲醛变性胶电泳检测, 150 V 电压下电泳 0.5 h, 通过溴化乙锭染色, 伯乐公司 Molecular Imager Gel Doc XR system 凝胶成像系统自动拍照, 凝胶图像表明 28S 的亮度高于 18S RNA, 表明 RNA 完整性较好 (图 1 ~ 3)。

表 1 紫外分光光度计测定 RNA 的纯度及浓度

样本	编号	A260/A280	RNA 浓度 (μ g/mL)	RNA 产率 (μ g/mg)
蚜虫	1	1.88	385	1.66
	2	1.86	442	2.02
烟粉虱	1	1.91	100	1.82
	2	1.96	156	1.75
蓟马	1	1.87	202	0.88
	2	1.92	260	1.35

注: 本实验中提取虫量的大小为: 蚜虫 1 头/离心管; 烟粉虱 4 头/离心管 蓟马 4 头/离心管, 每类昆虫分别提取 2 管。

2.2 RT-PCR 检测

用所提取的总 RNA 作为模板进行逆转录和 RT-PCR 反应, 得到相应的 PCR 产物, 引物扩出的目的基因片断单一, 经伯乐公司 Molecular Imager Gel Doc XR system 凝胶成像系统自动拍照, 然后用 Quantity One 软件进行定量分析, 该片断位置在 600 bp 左右, 说明实验提取的 RNA 的质量完全满足后续反应的进行; 而且提取的 RNA 的纯度较高, 说明可用于以后的 cDNA 文库的建立。

2.3 单头烟粉虱 RNA 提取效率的比较

从琼脂糖电泳图来看, 采用 SDS-KAc-热酚法提取的 RNA (4 ~ 6 泳道) 明显亮于 Trizol 试剂提取的 RNA 的亮度 (1 ~ 3 泳道), 并通过 UV-

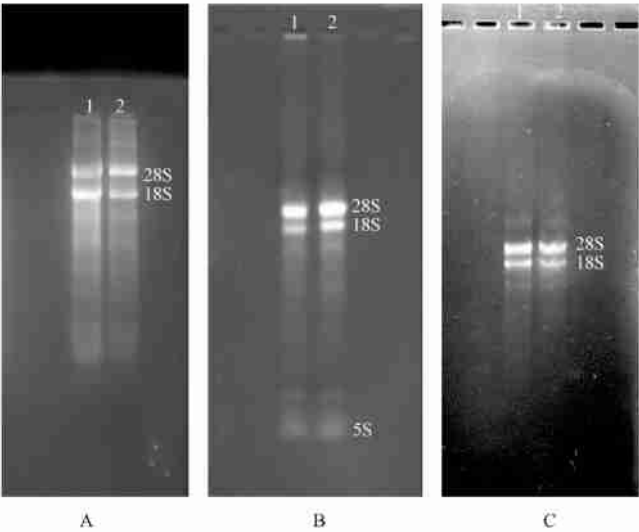


图1 三种昆虫 RNA 电泳图
A. 蚜虫 RNA B. 烟粉虱 RNA C. 蓟马 RNA

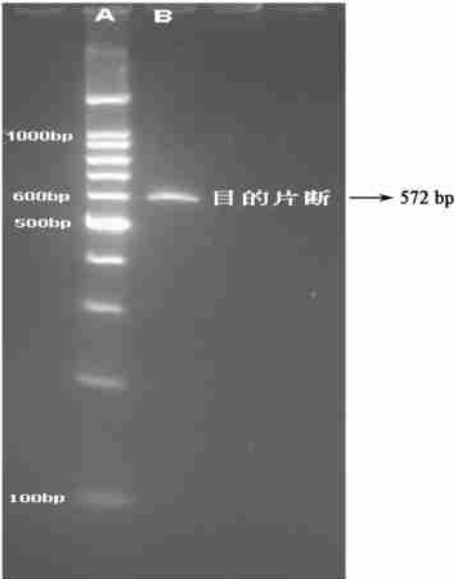


图2 引物 *Sa. aceI* 的 RT-PCR 扩增图谱
A. 100 bp DNA Ladder(TIANGEN) B. RT-PCR 产物

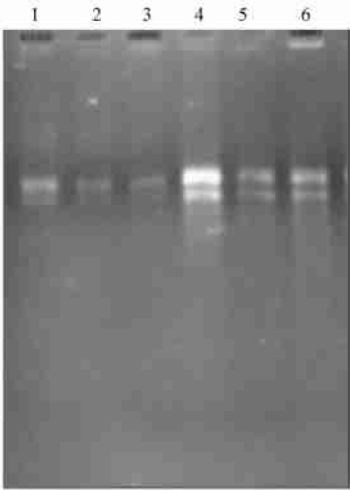


图3 2种实验方法提取单头烟粉虱的 RNA
1~3. Trizol 法 4~6. 改进后的 SDS-KAc-热酚法

3 讨论

由于蚜虫等昆虫个体小,其 RNA 含量就更少,在提取过程中不易操作,特别是研磨和加入裂解液以及温浴时间控制等都需要小心细致,同时要尽量避免对 RNA 产生的污染。

另外,在提取 RNA 的过程中发现,尽可能地减少酚的抽提次数也能避免 RNA 量的减少以及提取过程中的降解,但要避免抽提过程中将蛋白等杂质吸入。同时,温浴的时间不能太长,10~15 min 为宜,否则会导致 RNA 的降解,酸性酚的 pH 值要低于 5.0,热浴以后 DNA 才能较好地溶于有机相。乙酸钾(KAc)的沉淀效果与乙酸钠(NaAc)相同,但钾盐的形式很难溶于含 SDS 的溶液中^[1],采用热浴的方法可以使 KAc 和含有 SDS 的裂解液互溶,这样得到的 RNA 沉淀就直接可以用于体外翻译;关键是加入的 KAc 和饱和酚的 pH 值对 RNA 的纯度有着很大的影响,李玉英等采用 SDS-KAc 法从荞麦中提取到基本上无 DNA 污染的 RNA^[6],但是对乙酸钾 pH 值没有做进一步分析;张容等采用皂土法提取植物 RNA 要求乙酸钾和水饱和酚的 pH 值分别为 4.8 和 4.7,但是提取植物和动

2000 紫外分光光度计检测,采用 Trizol 试剂提取 RNA 的 A260/A280 平均值为 1.75,低于 SDS-KAc-热酚法提取的 RNA 的平均值 1.84。采用 Trizol 提取 RNA 的平均产率为 0.82 μg/mg;低于 SDS-KAc-热酚法提取到 RNA 的平均产率 1.72 μg/mg,这说明了改进后的 SDS-KAc-酸酚法能有效地从单头的昆虫基因组中提取 RNA。

物的 RNA 时对乙酸钾和水饱和酚的 pH 值有不同的要求^[7]。本实验结果表明,在提取蚜虫等小型昆虫的 RNA 时,当乙酸钾 pH 值调整为 4.8 时,可以将 DNA 污染降低到最低。蛋白酶 K 在 65℃ 时的酶活性最高,但是也容易失活,在本实验中可将水浴温度调整至 55℃ 的情况下进行,但需要适当延长水浴时间,10 min 较佳;如果配制裂解液时未加入蛋白酶 K,就需要进行饱和酚的多次抽提,以减少蛋白质的含量。

在遇到虫量较少的情况下,如各种因素(环境、农药、近亲交配等)导致昆虫种群密度急剧下降,采用 SDS-KAc-热酚法方法可以高效地获得 RNA,避免了研究中虫量的浪费。

本实验结果表明,只要在无 RNase 污染的情况下,高压灭菌处理后的水可用于实验中各种试剂的配制,避免了 DEPC(致癌性)的大量使用,而且提取出的 RNA 质量以及完整性也较好,所以一定要在无 RNase 污染的环境下进行实验操作,各种与提取 RNA 有关的实验仪器都要在高温

(170℃)下干热灭菌。该实验方法同样适用于其它小型昆虫的提取,如蚁类、蚊蝇类等。

目前商品化生产的 RNA 提取试剂主要以 TRIZOL 等为主,Trizol 是一类氧化性极强的试剂,价格也较贵。本实验所用的均为常规化学试剂,使用安全,操作时间易控,而且价格低廉,在开发专用于提取昆虫,尤其是提取小型昆虫总 RNA 的试剂盒方面有一定的优势。

参 考 文 献

- 1 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术(第 2 版). 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004. 65~70.
- 2 Chang S. J., Puryear J., Cainey J. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1993, 11(2): 113~114.
- 3 安瑞生, 谭声江, 陈晓峰. 昆虫知识, 2002 39(4): 311~312.
- 4 Li F., Han Z. J. *Gen. Res.*, 2002, 45(6): 1 134~1 141.
- 5 陈茂华, 韩召军. 南京农业大学学报, 2006 29(1): 35~39.
- 6 李玉英, 王转花, 张政. 生物技术, 2004 14(3): 23~24.
- 7 张容, 郑彦峰, 吴瑶, 王胜华, 陈放. 遗传, 2006, 28(5): 583~586.

台湾根螨属种类、寄主、分布与检验技术

范青海^{1**} 苏秀霞¹ 陈 艳²

(1. 福建农林大学植保学院 福州 350002; 2 福建出入境检验检疫局 福州 350001)

Species hosts distribution and inspection techniques of *Rhizoglyphus* from Taiwan. FAN Qing-Hai^{1**}, SU Xiu-Xia¹, CHEN Yan² (1. College of Plant Protection, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China)

Abstract Mites of *Rhizoglyphus* are the most important soil-dwelling pests of bulbs, combs, tubers, tuberous roots and rhizomes, which have been treated as one of the dangerous groups in trade. Information on the host and distribution of five known rhizoglyphid mites, *R. caladii* Manson, *R. echinopus* (Fumouze & Robin), *R. robini* Claparède, *R. setosus* Manson and *R. singularis* Manson from Taiwan are provided, and relative inspection techniques are given as well.

Key words Taiwan, *Rhizoglyphus*, hosts, distribution, inspection techniques

摘 要 根螨是鳞茎、球茎、块茎、块根和根茎等植物的重要地下害螨,是贸易中最危险的有害生物类群之一。对台湾的根螨属螨类:花叶芋根螨、刺足根螨、罗宾根螨、长毛根螨和单列根螨的寄主与分布进行

* 国家自然科学基金(30570220);福建省自然科学基金(B0410014)资助。

**E-mail: qhfancan@gmail.com

收稿日期: 2006-06-12, 修回日期: 2006-11-23,

接受日期: 2007-02-09