



五种不同组织结构特点昆虫的 总 RNA 提取效率比较*

尹志勇^{1**} 郭建军¹ 陈绪美¹ 郑玉琳¹ 田莹¹ 檀军^{1,2***}

(1. 贵州大学昆虫研究所, 贵州山地农业病虫害重点实验室, 贵阳 550025; 2. 遵义医科大学, 组织学与胚胎学教研室, 遵义 563003)

摘要 【目的】比较 RNAeasy 抽提试剂盒法和 Trizol 提取法对不同种昆虫总 RNA 提取的效率, 为不同种昆虫总 RNA 提取方法选择提供参考。【方法】采用 RNAeasy 抽提试剂盒法和 Trizol 提取法分别对九香虫 *Aspongopus chinensis* Dallas、白背飞虱 *Sogatella furcifera* Horváth、中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*、黄蜻 *Pantala flavescens* 和蒿金叶甲 *Chrysolina aurichalcea* 进行总 RNA 提取, 通过紫外分光光度计测定总 RNA 吸光度 (OD) 值, 利用琼脂糖凝胶电泳检测等方式对 RNA 质量进行评估。【结果】2 种提取方法提取不同昆虫总 RNA 中, Trizol 法提取白背飞虱 (同翅目)、蒿金叶甲 (鞘翅目) 和九香虫 (半翅目) 的总 RNA 浓度较高, 但纯度较低。电泳结果显示总 RNA 有降解, 完整性较差, RNAeasy 抽提试剂盒法提取黄蜻 (蜻蜓目) 和中华蜜蜂 (膜翅目) 的浓度较低, 纯度较高, 电泳结果显示完整性较好。【结论】Trizol 法更适合提取小型或几丁质含量高的昆虫, RNA 抽提试剂盒法更适合几丁质含量较少、腹软且有大量体液的昆虫总 RNA 提取。

关键词 昆虫总 RNA; 提取方法; 提取效率; 紫外分光光度; 琼脂糖凝胶电泳

Comparison of the effectiveness of the Trizol method versus an RNA extraction kit for extracting total RNA from insect species with different tissue characteristics

YIN Zhi-Yong^{1**} GUO Jian-Jun¹ CHEN Xu-Mei¹ ZHENG Yu-Lin¹ TIAN Ying¹ TAN Jun^{1,2***}

(1. Institute of Entomology, Guizhou University, Guizhou Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management of the Mountainous Region, Guiyang 550025, China; 2. Department of Histology and Embryology, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

Abstract [Objectives] The relative efficiency of using a RNA extraction kit to extract total RNA from different insects was compared to that of the Trizol method. [Methods] An RNA extraction kit and Trizol were used to extract total RNA from five insects; *Aspongopus chinensis* Dallas, *Sogatella furcifera* Horváth, *Apis cerana cerana*, *Pantala flavescens* and *Chrysolina aurichalcea*. The quality and the OD value of total RNA obtained were measured with a UV spectrophotometer and agarose gel electrophoresis. [Results] Although a higher concentration of total RNA was extracted with the Trizol method from three species, *S. furcifera*, *C. aurichalcea*, and *A. chinensis*, it had lower purity and electrophoresis results indicated that it was degraded with poor integrity. Conversely, although the concentration of total RNA obtained with an RNA extraction kit from *P. flavescens* (Odonata) and *A. cerana cerana* (Hymenoptera) was relatively low, it was relatively pure and had better integrity. [Conclusion] The trizol method is more suitable for extracting total RNA from small insects or those with high chitin content, whereas an RNA extraction kit is better for insects with low chitin content, a soft abdomen and more body fluid.

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (81803968); 资源昆虫学研究科技创新团队 (黔教合人才团队字[2015]71); 贵州省昆虫信息系统与资源开发利用重点实验室 (黔科合 LH 字[2015]7685 号)

**第一作者 First author, E-mail: 2329723038@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: juntan@zmu.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-01-06; 接受日期 Accepted: 2020-04-15

Key words insect RNA; extraction method; extraction efficiency; ultraviolet spectrophotometer; agarose gel electrophoresis

生物总 RNA 在生物学研究具有重要作用, 高质量的 RNA 是进行功能基因的克隆及差异表达分析、Northern 杂交、cDNA 文库构建等实验的基础。总 RNA 分离提取方法较多, 如胍/热酚法 (Feramisco *et al.*, 1992)、氯化胍法 (Cox *et al.*, 1968)、异硫氰酸胍法 (Chomczynski and Sacchi, 1987) 等, 但这些方法花费时间和成本较多。目前, Trizol 提取法和 RNAeasy 抽提试剂盒法的应用比较广泛。昆虫种类繁多, 与其他动物或植物相比, 不同种类, 尤其是不同目的昆虫, 其形态结构、多糖、脂肪及蛋白等含量差异较大, 而这些差异可能会影响昆虫总 RNA 提取效率 (章玉萍等, 2017)。能否根据不同种昆虫的组织结构特点来选取更合适的总 RNA 提取方法? 尚未见相关文献报道。本研究利用 Trizol 法和 RNAeasy 抽提试剂盒法提取 5 种昆虫的总 RNA, 通过对比总结不同目昆虫高效、高质量的总 RNA 提取方法, 为不同组织结构昆虫总 RNA 提取方法选择提供参考。

本文选用九香虫 *Aspongopus chinensis* Dallas、白背飞虱 *Sogatella furcifera* Horváth, 中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*、黄蜻 *Pantala flavescens* 和蒿金叶甲 *Chrysolina aurichalcea* 为供试昆虫。其中, 白背飞虱属于半翅目同翅亚目飞虱科的小型迁飞性昆虫 (黄所生等, 2014), 蒿金叶甲体小型, 是危害沙蒿、白茨的重要害虫, 在内蒙古阿拉善左旗发生面积较大, 危害严重 (吕文宪和刘云生, 1987)。九香虫属昆虫纲半翅目兜蝽科昆虫, 具有理气止痛、温中助阳之功能 (国家药典委员会, 2010)。黄蜻隶属于蜻蜓目蜻科黄蜻属, 体中到大型, 腹腔充满血液等体液, 是天敌昆虫和药用、食用昆虫, 也是水体污染程度的指示昆虫之一 (葛怡情和曹玲珍, 2016)。中华蜜蜂简称中蜂, 体小型, 腹腔充满血液等体液, 是我国特有的蜜蜂种质资源, 是主要的传粉昆虫, 对许多植物的授粉繁衍有着不可替代的作用, 具有重要的经济价值和社会效益, 对我国生态环境的保护有十分重要的意义 (卢一浪, 2019)。上述昆虫分别隶属于半翅目、同翅目、膜翅目、蜻蜓目、

鞘翅目昆虫, 均是常见的具有药用或经济价值的资源昆虫或常见害虫, 且形态大小差异较大, 具有较好的研究价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

蒿金叶甲、中华蜜蜂和黄蜻采集自贵州大学西校区崇学楼前试验田 (东经 106°39', 北纬 26°27'), 白背飞虱和九香虫由贵州大学昆虫研究所养殖, 所有样本均置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 主要试剂和仪器

Trizol 溶液 (北京康为世纪生物科技有限公司)、氯仿溶液 (南京森贝伽生物科技有限公司)、异丙醇溶液 (重庆川东化工有限公司)、无水乙醇溶液 (重庆川东化工有限公司)、RNAeasy 抽提试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司);

NanoDrop 2000/2000C (美国赛默飞世尔公司), Bio-Rad 凝胶成像仪 (美国伯乐公司), 冷冻离心机 (德国 Sigma 公司)

1.3 实验方法

1.3.1 Trizol 法提昆虫总 RNA 取昆虫组织于研钵中加入液氮充分研磨, 转移到 1.5 mL 离心管中, 加入 600 μ L Trizol 溶液, 振荡 30 s 后室温下放置 5 min; 加入 160 μ L 氯仿, 振荡 15 s 后室温放置 3 min, 4 °C, 12 000 $\times$ g 离心 20 min; 取上层无色水相于 RNase-free 离心管中, 向离心管中加入等体积异丙醇 (160 μ L), 颠倒混匀, 室温放置 30 min; 4 °C, 12 000 $\times$ g 离心 20 min, 弃上清; 加入 600 μ L 75%乙醇洗涤沉淀, 4 °C, 12 000 $\times$ g 离心 3 min, 弃上清; 室温放置 3 min, 晾干, 加入 50 μ L DEPC 水, -80 °C 保存。

1.3.2 RNAeasy 抽提试剂盒法提昆虫总 RNA 取昆虫组织置于研钵中加入液氮研磨成粉末, 立刻加入 600 μ L 裂解液, 用移液枪轻轻敲打 8 次, 室温下放置 3 min; 14 000 $\times$ g 离心 2 min, 将上清液移至新离心管; 加入等体积结合液 (600 μ L), 轻轻颠倒混匀 5 次, 移至纯化柱中, 12 000 $\times$ g

离心 30 s; 加入 600 μ L 洗涤液 I, 12 000 $\times$ g 离心 30 s; 加入 600 μ L 洗涤液 II, 12 000 $\times$ g 离心 30 s; 再加入 600 μ L 洗涤液 II, 12 000 $\times$ g 离心 30 s, 弃离心产物, 14 000 $\times$ g 离心 2 min, 去除残留的液体; 将 RNA 纯化柱置于 RNA 洗脱管中, 加入 50 μ L 洗脱液, 室温放置 3 min, 14 000 $\times$ g 离心 30 s; 重复洗脱一次, -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.3 RNA 浓度与纯度测定 用分光光度计测定昆虫总 RNA 浓度及 OD 值。测定前用 DEPC 水校正, 换样前均采用 DEPC 水洗涤测量孔, 以避免样本与样本间的交叉污染。

用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整

性, 用 Bio-Rad 凝胶成像仪曝光并拍照。

1.4 数据统计与分析

实验设置 3 次重复, 实验数据采用 SPSS 18.0 软件进行独立样本 *T*-检验分析, 以平均值 $\pm$ 标准误 (mean $\pm$ SE) 表示 (RNA 含量=RNA 浓度 $\times$ 洗脱液体积/昆虫组织质量)。

2 结果与分析

2.1 昆虫质量记录

对实验所用昆虫进行称重, 如表 1 所示。洗脱液体积为 50 μ L。

表 1 单只昆虫质量 (g)
Table 1 Insect mass and eluent volume

	Trizol 法 Trizol method	RNAeasy 抽提试剂盒法 RNAeasy extraction kit method
白背飞虱 <i>Sogatella furcifera</i> Horváth	0.001	0.001
蒿金叶甲 <i>Chrysolina aurichalcea</i>	0.024	0.024
黄蜻 <i>Pantala flavescens</i>	0.206	0.261
中华蜜蜂 <i>Apis cerana cerana</i> Fabricius	0.093	0.084
九香虫 <i>Aspongopus chinensis</i> Dallas	0.387	0.384

2.2 总 RNA 含量和 OD_{260/280}

紫外分光光度计检测结果表明, Trizol 法提取的 5 种昆虫总 RNA 含量较高 (表 2), 但纯度不高 (表 3)。Trizol 法提取的白背飞虱、蒿金叶甲、黄蜻、中华蜜蜂和九香虫的总 RNA OD_{260/280} 分别为 (1.54 $\pm$ 0.02)、(1.90 $\pm$ 0.11)、(1.88 $\pm$ 0.03)、(1.68 $\pm$ 0.01) 和 (1.79 $\pm$ 0.06), 其中白背飞虱的

总 RNA 可能有蛋白污染; 九香虫、黄蜻和蒿金叶甲的总 RNA 浓度和纯度均较高。2 种方法提取的中华蜜蜂含量无差异 ($P>0.05$), 但 Trizol 法提取的总 RNA 纯度较低, 提示可能有蛋白质污染 (表 2)。

RNAeasy 抽提试剂盒提取昆虫总 RNA 浓度较 Trizol 法低, 但纯度较好, 重复性较好。其中, 九香虫、黄蜻、白背飞虱和蒿金叶甲纯度较高,

表 2 2 种 RNA 提取方法提取的 RNA 含量 (ng/mg)
Table 2 RNA content extracted by two RNA extraction methods (ng/mg)

	白背飞虱 <i>Sogatella furcifera</i>	蒿金叶甲 <i>Chrysolina aurichalcea</i>	黄蜻 <i>Pantala flavescens</i>	中华蜜蜂 <i>Apis cerana cerana</i>	九香虫 <i>Aspongopus chinensis</i>
Trizol 法 Trizol method	8 868.33 $\pm$ 3 758.77*	2 058.47 $\pm$ 1 398.60*	482.48 $\pm$ 258.13	145.65 $\pm$ 47.15	147.86 $\pm$ 28.19
RNAeasy 抽提试剂盒法 RNAeasy extraction kit method	213.33 $\pm$ 10.14	156.11 $\pm$ 41.22	76.30 $\pm$ 3.28	93.33 $\pm$ 7.56	63.16 $\pm$ 17.32

表中数据为平均值 $\pm$ 标准误, *差异显著 ($P<0.05$), **差异极显著 ($P<0.01$)。下表同。

Data in the table are mean $\pm$ SE, * indicates significant difference ($P < 0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$). The same below.

表 3 2 种 RNA 提取方法提取的 OD_{260/280}
Table 3 OD_{260/280} of RNA extracted by two methods

	白背飞虱 <i>Sogatella furcifera</i>	蒿金叶甲 <i>Chrysolina aurichalcea</i>	黄蜻 <i>Pantala flavescens</i>	中华蜜蜂 <i>Apis cerana cerana</i>	九香虫 <i>Aspongopus chinensis</i>
Trizol 法 Trizol method	1.54±0.02**	1.90±0.11	1.88±0.03**	1.68±0.01**	1.79±0.06**
RNAeasy 抽提试剂盒法 RNAeasy extraction kit method	2.02±0.04	2.19±0.01	2.15±0.003	2.09±0.01	2.06±0.01

但浓度较低。Trizol 法提取总 RNA 浓度组内差异较大,导致统计分析结果的标准误差较大(表 2),表明 Trizol 法提取总 RNA 的重复性较差。

2.3 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量

2.3.1 Trizol 法提取的总 RNA 质量分析 由图 1 可见, Trizol 法提取九香虫、中华蜜蜂、黄蜻和白背飞虱总 RNA 的 18S、28S 条带不清晰(图 1: A, B, C, E), 表明 RNA 有降解, 但蒿金叶甲总 RNA 的 18S、28S 条带清晰(图 1: D), 完整性、重复性较好, 蒿金叶甲体型较小且几丁质含量较高, 可能适合使用 Trizol 法提取, 但总体来说 Trizol 法提取昆虫总 RNA 的标准误差较大, 表明其提取的重复性较差, 且总 RNA 降解较明显。

2.3.2 RNAeasy 动物 RNA 抽提试剂盒法提取的总 RNA 质量分析 由图 2 可见, RNAeasy 抽提试剂盒提取九香虫、中华蜜蜂、黄蜻和蒿金叶甲的总 RNA 的 18S、28S 条带清晰完整性较好(图 2: A, B, C, D), 但白背飞虱组未见明显条带(图 2: E), 其中白背飞虱体小, 在分离组织时总 RNA 可能被自身所带的核酸酶降解, 表明 RNAeasy 抽提试剂盒法对提取小型昆虫的总 RNA 适用性较差。但 RNAeasy 抽提试剂盒法提取 5 种昆虫总 RNA 的重复性均较好。

3 讨论与结论

浓度、纯度和完整性等是评价 RNA 质量的关键, cDNA 库的构建、荧光定量 PCR、基因克隆等实验均对 RNA 的质量要求较高(秦玉蓉等, 2008), 而获取高质量的 RNA 取决于基因组 DNA、蛋白质、脂肪等污染的有效去除。本研究中, 实验取样和研磨均是同一条件下进行, 避免

了因样本差异影响不同方法的提取效率; 考虑个人操作技术的熟练程度可能会影响总 RNA 提取质量, 此次实验的昆虫总 RNA 均由同一人提取, 且该操作者具有较丰富的提取总 RNA 的经验, 避免了因操作者不熟练或更换操作者而增大实验误差。此外, 建议今后类似的方法比较类实验, 均应由固定操作者在同等条件下完成, 尽量减少人为误差。

Trizol 试剂能迅速裂解细胞, 从而快速地从组织或细胞中提取总 RNA, 并可抑制细胞释放的核酸酶, 避免总 RNA 被降解(李冉冉等, 2018)。氯仿可提取完整的总 RNA, 加入异丙醇后, 总 RNA 和杂质沉淀, 经过乙醇的洗涤, 杂质被洗脱, 获得较纯的 RNA。Trizol 法适用于类似白背飞虱和蒿金叶甲等小型昆虫或几丁质含量较高的昆虫, 避免小型昆虫组织裂解时释放出的 RNA 被核酸酶所降解, 可获得浓度较高的 RNA; 而对于中华蜜蜂和黄蜻等几丁质含量较少、腹软且有大量体液的昆虫, 则适合用 RNAeasy 抽提试剂盒提取, 组织在裂解液中迅速裂解, 释放出总 RNA, 并特异性地结合到吸附柱上, 而基因组 DNA 和蛋白质等其他组分可通过高速离心被有效去除, 再通过 3 次洗涤, 可充分去除特异性结合的蛋白、盐等杂质, 最后用洗脱液将高纯度的 RNA 洗脱下来, 可使昆虫体液被洗净, 且该类昆虫腹软和几丁质少, 不易堵塞吸附柱, 吸附和纯化作用较好。2 种方法提取的九香虫 RNA 质量均较好, 但 Trizol 法提取的总 RNA 更高, 所以建议使用 Trizol 法提取九香虫总 RNA。

实验发现, 使用 Trizol 法提取昆虫总 RNA 浓度高, 但 Trizol 法提取的总 RNA 标准误差较大, 表明 Trizol 法重复性较差, 而 RNAeasy 抽提试剂盒法提取昆虫总 RNA 浓度虽然较低, 但纯度

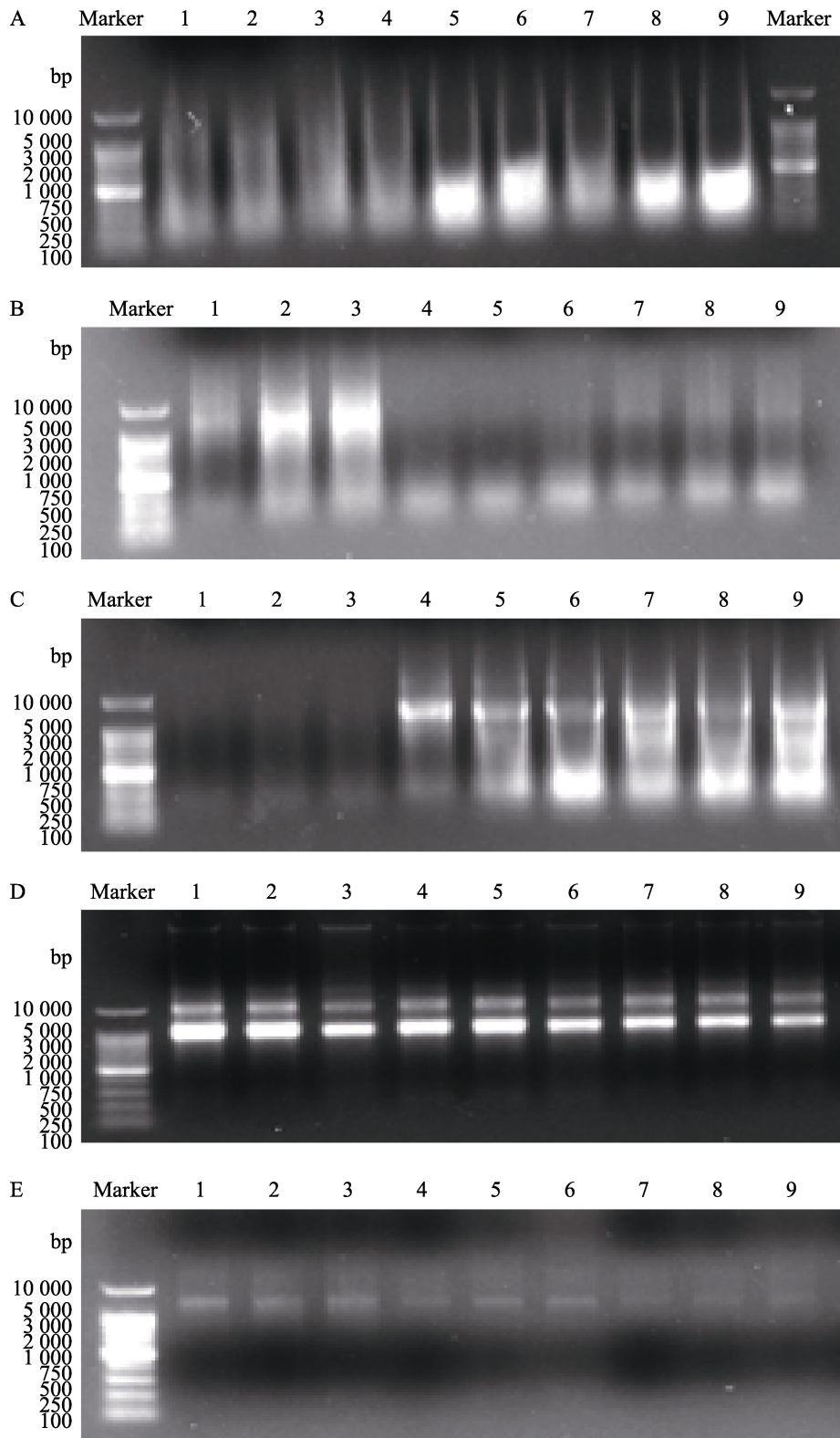


图 1 琼脂糖凝胶电泳检测 Trizol 法提取昆虫总 RNA 图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis detect the RNA extracted by Trizol method

A. 九香虫; B. 中华蜜蜂; C. 黄蜻; D. 蒿金叶甲; E. 白背飞虱; 泳道 1-3, 4-6, 7-9 代表 3 个重复实验结果。

A. *A. chinensis*; B. *A. cerana cerana*; C. *P. flavescens*; D. *C. aurichalcea*; E. *S. furcifera*;

Lane 1-3, 4-6, 7-9 represent 3 independent experiments.

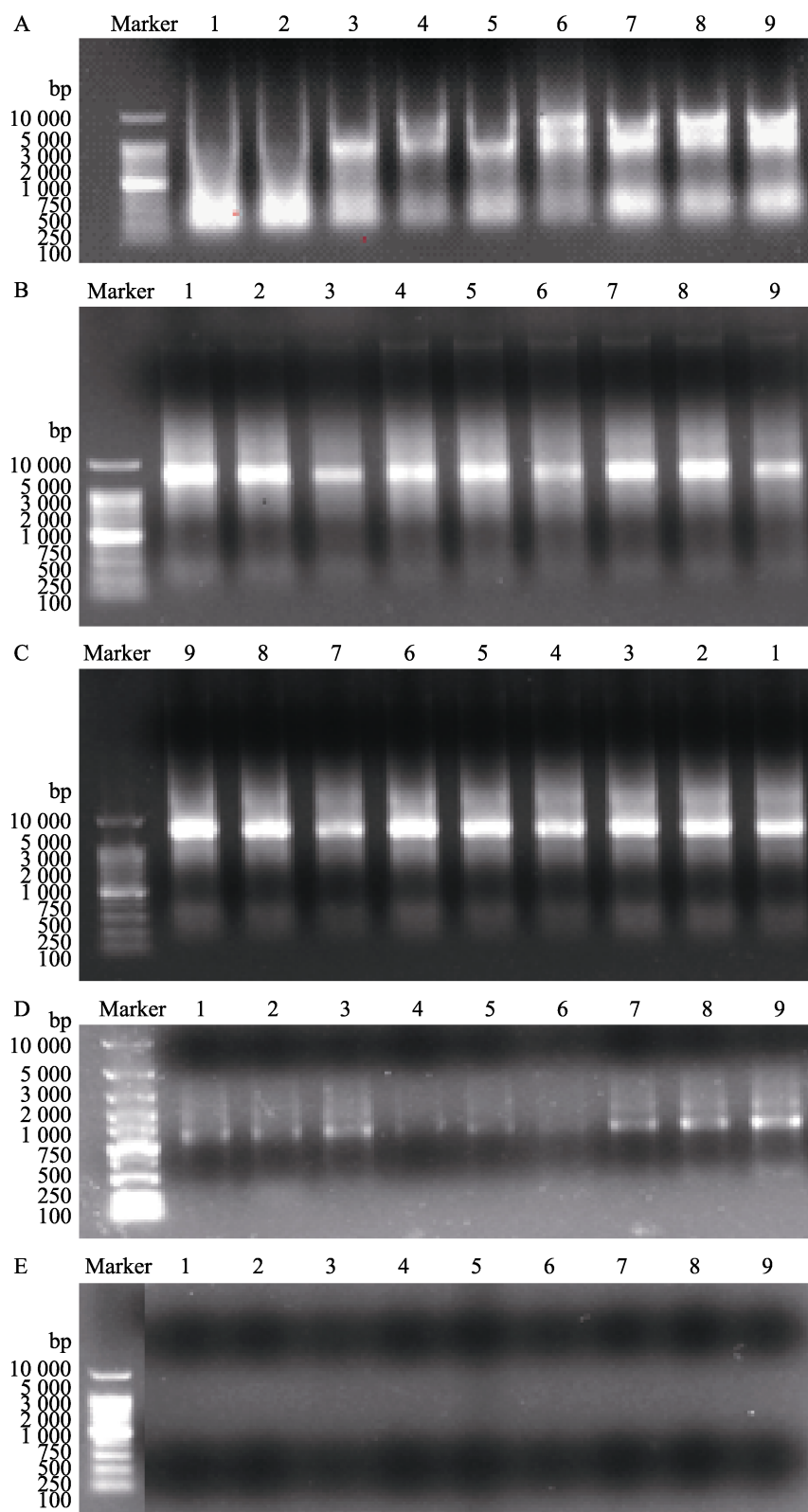


图 2 RNeasy 动物 RNA 抽提试剂盒法琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis by RNeasy animal RNA extraction kit

A. 九香虫; B. 中华蜜蜂; C. 黄蜻; D. 蒿金叶甲; E. 白背飞虱; 泳道 1-3, 4-6, 7-9 代表 3 个重复实验结果。

A. *A. chinensis*; B. *A. cerana cerana*; C. *P. flavescens*; D. *C. aurichalcea*; E. *S. furcifera*;

Lane 1-3, 4-6, 7-9 represent 3 independent experiments.

较高, 且重复性较好。

综上, Trizol 法适合小型昆虫或几丁质含量较多昆虫的总 RNA 提取, RNAeasy 抽提试剂盒适合几丁质含量较少、腹软且有大量体液的昆虫总 RNA 提取。

参考文献 (References)

- Chomczynski P, Sacchi N, 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1): 156–159.
- Cox RA, 1968. The use of guanidinium chloride in the isolation of nuclei acids. *Methods Enzymol.*, 12(part B): 120–129.
- Feramisco JR, Helfman DM, Smart JE, 1992. Isolation of cullar total RNA with guanidium/hot phenol method//Maniatis T (eds.). *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 194–195.
- Ge YQ, Cao LZ, 2016. Transcriptome sequencing and analysis of the head of dragonfly based on RNA-seq. *Sichuan Fauna*, 35(6): 852–859. [葛怡情, 曹玲珍, 2016. 基于 RNA-seq 的黄蜻头部转录组测序与分析. *四川动物*, 35(6): 852–859.]
- Huang SS, Huang FK, Wu BQ, Long LP, Ling Y, 2014. Studies on biotypes of brown planthopper and white-backed planthopper in China and Vietnam. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(2): 525–533. [黄所生, 黄凤宽, 吴碧球, 龙丽萍, 凌炎, 2014. 中国与越南褐飞虱和白背飞虱生物型研究. *应用昆虫学报*, 51(2): 525–533.]
- Li RR, Wang B, Hu S, Li Y, Zhai YJ, Li CX, Sun QF, Ji AQ, 2018. Efficacy comparison of different RNA extraction methods. *Criminal Technology*, 43(6): 431–435. [李冉冉, 王兵, 胡胜, 李洋, 翟永杰, 李彩霞, 孙启凡, 季安全, 2018. 不同 RNA 提取方法的效能比较. *刑事技术*, 43(6): 431–435.]
- Lü WX, Liu YS, 1987. Occurrence and control of *Artemisia argyi*. *Chinese Grassland*, (3): 31–33. [吕文宪, 刘云生, 1987. 蒿金叶甲的发生及其防治. *中国草原*, (3): 31–33.]
- Lu YL, 2019. Analysis of current situation and protection measures of Chinese bee breeding. *China Livestock and Poultry Seed Industry*, 15(3): 62. [卢一浪, 2019. 中华蜜蜂养殖现状与保护措施分析. *中国畜禽种业*, 15(3): 62.]
- Qin YR, Chen R, Wu H, Chang H, Chen GH, Wu XS, Chang GB, 2008. Expression of small and medium molecular RNA in quail blood. *Chinese Poultry*, 30(16): 20–22. [秦玉蓉, 陈蓉, 吴海, 常洪, 陈国宏, 吴信生, 常国斌, 2008. 鹌鹑血液中小分子 RNA 表达的初步研究. *中国家禽*, 30(16): 20–22.]
- State Pharmacopoeia Commission, 2010. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*. Beijing: China Medical Science and Technology Press. 10–11. [国家药典委员会, 2010. *中华人民共和国药典*. 北京: 中国医药科技出版社. 10–11.]
- Zhang YP, Chen M, Zhang LL, Dai JJ, Liu J, Shu R, Fan T, 2017. Nutritional and medicinal value of economic insect resources. *Journal of Agronomy*, 7(10): 66–71. [章玉萍, 陈明, 张丽丽, 代君君, 刘健, 舒蕊, 范涛, 2017. 经济昆虫资源的营养与药用价值. *农学学报*, 7(10): 66–71.]