

昆虫总 RNA 提取及实时荧光定量 PCR 方法探讨^{*}

董小林^{**}

(华南农业大学昆虫毒理研究室 广州 510642)

摘 要 本文以褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 为实例介绍了利用 Trizol 略法作改进用于提取昆虫总 RNA 的方法,抽提的总 RNA 利用甲醛变性凝胶电泳、NanoDrop 核酸蛋白仪和 Agilent 2100 Bioanalyzer 分析表明其质量高和完整性好。同时讨论了应用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 进行昆虫时空表达研究中选择参考基因应注意的问题,为相关研究提供参考。

关键词 昆虫, RNA 提取, 完整性, RT-qPCR

The application of RNA extraction and real-time fluorescent quantitative PCR in insect

DONG Xiao-Lin^{**}

(Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract Using the brown planthopper as an example, we introduce a modified protocol of RNA extraction using the Trizol reagent method. Formaldehyde modified gel electrophoresis, NanoDrop (Thermo) and Agilent 2100 Bioanalyzer detection indicated that the RNA extracted by this method had high quality and perfect integrity. Several issues in the use of real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) technique on insects became apparent in the expression pattern analysis. These results may provide a reference for the application of this technique in entomology.

Key words insect, RNA extraction, integrity, real-time fluorescent quantitative PCR

获得丰度高、完整性好 RNA 是基因工程研究中的重要技术基础 (Sambrook *et al.*, 1989)。真核生物的总 RNA 分离提取已经建立起许多方法,包括强变性剂法、Trizol 法、CTAB 法、SDS-Phenol 法、酶解法等 (刘华等, 2011), 并研发出许多 RNA 分离提取试剂盒。但是, 仍有不少实验材料由于富含 RNA 酶、色素等物质干扰 RNA 的提取质量 (李宏和王新力, 1999)。在昆虫组织中, RNA 结合更丰富的蛋白和次生代谢产物, 使其特性与其它动物的 RNA 有较大差别 (邓顺等, 2007), 尤其是昆虫组织富含色素, 使昆虫 RNA 提取更加复杂。

实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 是在传统 PCR 技术基础上发展起来的一种高度灵敏的核酸定量技术。该技术是在 PCR 反应体系中加

入荧光染料, 受体荧光发射出的荧光讯号强度与 DNA 产量成正比, 因此可以通过监测整个 PCR 进程中荧光信号的变化, 利用标准曲线对未知模板浓度进行定量分析, 实现 PCR 从定性到定量的飞跃。由于该技术具有准确、特异、灵敏和快速等特点, 故被广泛应用于分子检测、基因表达、核酸多态性分析和 SNP 分析等方面的研究。目前 TR-qPCR 有标准曲线法的绝对定量和比较 Ct 法的相对定量两种定量方法, 研究实践中较常用比较 Ct 法的相对定量, 其前提是参考基因的表达是否稳定 (王光华等, 2008)。目前在昆虫基因的时空表达模式的 RT-qPCR 中, 采用的参考基因很多, 但常常忽视参考基因的表达稳定性检测。

本文以褐飞虱为例, 介绍了利用 Trizol 法略作改进用于提取昆虫总 RNA 的方法, 讨论 RT-qPCR

^{*} 资助项目: 国家自然科学基金 (31171870); 中国博士后科学基金 (2013M542185)。

^{**} E-mail: dxlex@163.com

研究中参考基因应注意的问题,旨在为进行昆虫 RNA 提取及表达分析提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 由广东省农科院植物保护研究所张扬研究员提供,饲养褐飞虱用的水稻为非抗虫品种黄华占。待水稻生长至分蘖中后期时将其移入养虫笼内,平均每周更换水稻一次,水稻加水至刚好淹没土层,在智能温室饲养,温度为 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。Trizol (Invitrogen)、Ex Taq DNA 聚合酶、dNTP、PCR buffer、AMV (Reverse Transcriptase XL)、oligo d(T)₁₈、SYBR Premix Ex Taq 等购自 Takara 公司 (Takara, Japan)。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取 所用的研钵、EP 管、枪头等用 0.2% DEPC 水溶液处理过夜。(1) 迅速从液氮中取出褐飞虱 1 (3 龄以上) ~ 3 (3 龄以下) 头,立刻置于液氮预冷的研钵中,继续加入液氮中轻轻研磨。由于有时所取材料不够多,将 1 mL 的 Trizol 逐滴加入研钵中覆盖研磨后的粉末,待 Trizol 逐渐融化时继续研磨 3 min,用移液器吸走研钵内所有的液体到一新的 1.5 mL EP 管,室温静置 5 min。(2) 加入 0.2 mL 氯仿,混合后静置 5 min, 4°C 12 000 g 离心 15 min。小心取上清液到另一新的 1.5 mL EP 管中。为了防止褐飞虱表皮中的色素影响后续实验,分别用 0.5 mL 氯仿洗涤 2 次。(3) 加入 1 μL RQ1 RNase-Free DNase, 37°C 水浴 5 min,以去除基因组 DNA。(4) 加入 0.5 mL 异丙醇,室温静置 10 min, 4°C 12 000 g 离心 10 min。弃上清液。(5) 加入 1 mL 75% 乙醇,震荡 15 s, 4°C 7 500 g 离心 5 min,弃上清液。重复两次。(6) 倒置在超净台上 5 ~ 10 min (垫上滤纸或倒置于试管架上),加入 30 μL 经 DEPC 处理过的双蒸水中,所获得的总 RNA。(7) 分别用 NanoDrop 分光光度计 (Thermo) 检测总 RNA 的浓度、纯度,用甲醛变性凝胶电泳和 Agilent 2100 Bioanalyzer 检查 RNA 的完整性等指标,最后置于 -80°C 超低温冰箱中保存备用。

1.2.2 cDNA 的合成 在反转录前将每管抽提到的 RNA 调整到相同浓度。在新的用 DEPC 水处理

过的 0.2 mL EP 管中,按以下比例将所需反应物加入: RNA template 1 μg , $5 \times$ Reverse Transcriptase XL (AMV) buffer 4 μL , Oligo d(T)₁₈ (50 pmol/ μL) 1 μL , Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μL) 0.5 μL , Reverse Transcriptase XL (AMV) (5 U/ μL) 0.5 μL , dNTP Mixture (each 2.5 mmol/L) 2 μL , RNase free Water 补余至 20 μL 。在 PCR 仪上按以下程序进行反应: 37°C , 10 min; 42°C , 1.5 h; 99°C , 5 min; 5°C , 5 min。反应结束后取保存于 -20°C 冰箱备用。

1.2.3 参考基因的验证 用半定量 RT-PCR 验证褐飞虱的 β -actin (EU179846) 表达是否恒定。引物为: *Nlactin*-F: 5'-TGC GTGACATCAAGGAGAA-GC-3', *Nlactin*-R: 5'-CCATACCCAAGAAGGAA-GGCT-3'。PCR 反应体系 25 μL : cDNA 1 μL , $10 \times$ Ex Taq buffer 2.5 μL , dNTP 2.0 μL (2.5 mmol/L), Ex Taq 0.5 μL , 正向引物和反向引物各 1 μL (20 $\mu\text{mol/L}$), 加水至 25 μL 。反应条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 40 s, 26 个循环,最后 72°C 延伸 6 min。

1.2.4 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 采用 SYBR 染料法进行 RT-qPCR。取合成好的褐飞虱 cDNA 样品,分别作 cDNA 样品原液的 1 倍、1/10、1/100、1/1000 和 1/10000 稀释的 5 个系列浓度的 cDNA 作为模板,反应体系为 10 μL : SYBR premix Ex Taq 5.0 μL , cDNA 模板 1.0 μL 引物目标基因 F 或 β -actin F 和目标基因 R 或 β -actin R, 加 ddH₂O 补余至 10 μL 。RT-qPCR 反应程序: 95°C 预变性 4 min, 然后 95°C 变性 10 s, 58°C 退火 20 s, 72°C 延伸 30 s, 40 个循环,最后一步设定为 95°C 15 s, 60°C 30 s 获得熔解曲线。每个样品均作 3 个生物学重复以减少操作误差,获得目标基因和内参基因的相对标准曲线。利用 SPSS13.0 software 分析 RT-qPCR 数据,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, 方法参考 Bustin 等 (2010), 比较不同处理的目标基因相对表达水平。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取

用 2.0% 琼脂糖变性凝胶电泳初步检测总 RNA 的完整性,从电泳的结果来看,用 Trizol 试剂抽提的总 RNA 中,5 S、18 S、28 S rRNA 条带清晰 (图 1, 图 2)。分别取 1 μL 总 RNA 样品,用

Nanodrop 核酸蛋白仪检测其纯度和浓度,所得的总 RNA 样品的 OD260/OD280 值为 2.00 ~ 2.10 之间,OD260/OD230 为 2.00 ~ 2.36 之间,说明总 RNA 的纯度较高。用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进一步检测表明提取的总 RNA 具有良好的完整性,适合做定量研究。

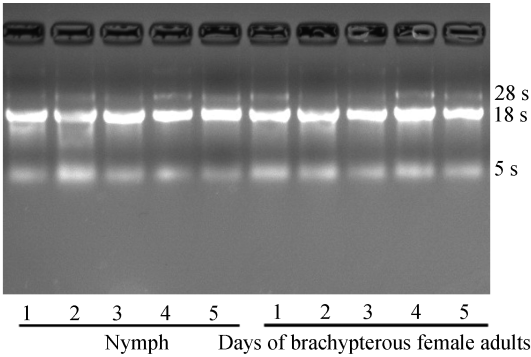


图 1 从不同龄期褐飞虱提取的总 RNA 甲醛变性凝胶电泳图

Fig. 1 Formaldehyde modified gel electrophoresis of total RNA from *Nilaparvata lugens* in different development stages

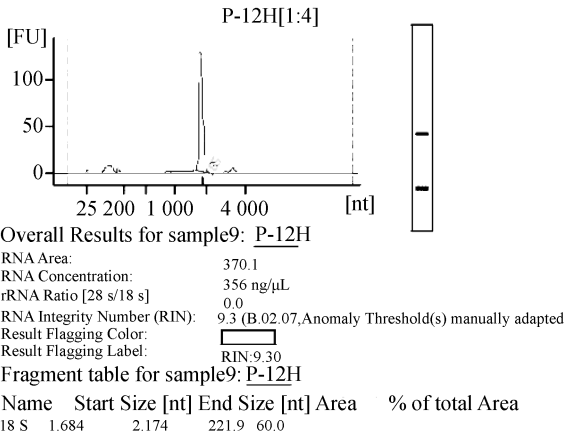


图 2 褐飞虱总 RNA 完整性检测图

Fig. 2 Integrity detection of total RNA extracted from *Nilaparvata lugens*

2.2 参考基因的验证

利用半定量 TR-PCR,以 1 μ L 不同龄期相同浓度总 RNA 反转录得到的 cDNA 作为模板,以 β -actin F 和 β -actin R 引物对进 PCR,26 个循环以后,1.0% 琼脂糖凝胶电泳结果显示,不同龄期 β -actin 的表达量基本稳定 (图 3),符合做内参的标

准。

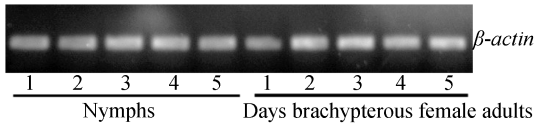


图 3 不同龄期褐飞虱 β -actin 表达模式
Fig. 3 Development expression profile of β -actin in *Nilaparvata lugens*

2.3 标准曲线的制作

经验证 β -actin 在褐飞虱不同龄期表达量基本恒定后,对 β -actin 和 *NIVg* (JF345256) 进行标准曲线的制作,结果显示 β -actin 标准曲线的 R^2 为 0.990,扩增效率为 $E_{actin} = 1.049$,斜率为 -3.211 (图 4:A),*NIVg* 的标准曲线的 R^2 为 0.990,扩增效率为 $E_{NIVg} = 0.999$,斜率为 -3.325 (图 4:B)。符合 RT-qPCR 的要求。

3 讨论

RNA 非常容易降解,所以在整个操作过程中,一定要在无菌的环境中进行。完整性和纯度是评价 RNA 质量的关键标准。cDNA 文库的构建、基因克隆、Northern blot 和 RT-qPCR 等均需要完整和高纯度的 RNA。高纯度的 RNA 取决于有效地去除 DNA、蛋白质和其它色素杂质的污染,完整的 RNA 在于最大限度地避免纯化过程中内源及外源核糖核酸酶对 RNA 的降解,采用高活性的 RNA 酶抑制剂可有效地防止 RNA 的酶解,采用两次氯仿洗涤可使去除 RNA 提取物种的色素和蛋白质 (如果有必要,可以再洗涤几次),同时也可以尽量减少 Trizol 中苯酚、异硫氰酸胍的污染。另外,还有少许的异丙醇、苯酚、异硫氰酸胍用两次 75% 的乙醇洗涤。本实验所提取的总 RNA,在甲醛变性琼脂糖凝胶电泳图上表现为 28 S、18 S、5 S 3 条清晰条带。从其他真核生物总 RNA 电泳一般具有较明显的 3 条带,而且 28 S 条带比 18 S 条带亮。而本实验提取的总 RNA 电泳结果正好相反,即 18 S 条带的亮度高于 28 S 条带的亮度 (图 1)。在其他的昆虫中也出现类似的现象,与从鳞翅目的甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (张霞等,2008)、霜天蛾 *Psilgramma menephorn* (孙秀珍和刘昀,2005)、蜚蠊目的美洲大蠊 *Periplaneta americana*

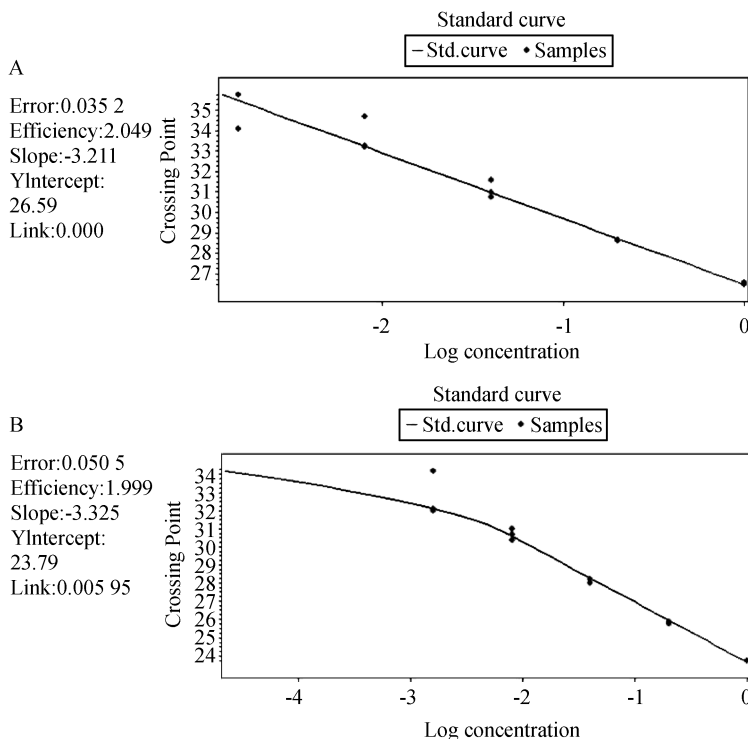


图 4 实时定量 PCR 建立的标准曲线

Fig. 4 Acquiring of standard curve in RT-qPCR

A. 参考基因 β -actin; B. 目标基因 *NIVg*。

A. RT-qPCR standard curve of reference gene β -actin; B. RT-qPCR standard curve of target gene (*NIVg* as an example).

(刘志刚等, 2001) 和双翅目的葱蝇 *Delia antiqua* (冯国忠等, 2010) 等昆虫中提取的总 RNA 的结果一致。Cox (1977) 认为这种现象的产生是由于在有些昆虫体内, rRNA 大亚基的内部存在缺口, 使大亚基呈现大小两个片段, 其中大片段与 18 S 小亚基的大小相近, 因而在甲醛变性琼脂糖凝胶电泳图中 18 S 条带比 28 S 条带的亮度高。另外总 RNA 的完整性仅用脂糖凝胶电泳的方法是不全面的, 本方法用 3 种方法综合检测总 RNA 的纯度和完整度 (图 1, 图 2)。综合看, 用本方法从昆虫中提取的总 RNA 纯度高、完整性好, 适合用于 RT-qPCR。

常用作参照的管家基因有 GAPDH, β -actin, 18S RNA 和 28S RNA 等, 一般认为它们在所有的细胞和组织中都稳定表达, 但也有文献报道它们的表达水平有时也有波动 (Bustin, 2002; Radonic *et al.*, 2004)。因此, 某个管家基因是否适合用作参照基因, 首先是看该参照基因的表达量是否相对恒定, 另外目标基因和参照基因扩增效率也应该基本一致, 效率的偏移将影响实际拷贝数的估

计, 应该通过实验来验证。本文以褐飞虱为实例, 通过实验验证得出褐飞虱的不同龄期 β -actin 的表达是比较稳定的, 扩增效率也比较高, 适合作为参照基因 (图 3, 图 4:A)。其他的管家基因也可能作为不同龄期表达模式的参照基因, 但在实验过程中需要进行进一步验证。目标基因也应该具有较高的扩增效率, 本文以褐飞虱为例, 得到的参考基因和目标基因的扩增效率分别为 1.049 和 0.999 (图 4:B), 说明 RT-qPCR 的结果可靠。

参考文献 (References)

- Bustin SA, 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.*, 29(1):23–39.
- Bustin SA, Beaulieu JF, Huggett J, Jaggi R, Kibenge FS, Olsvik PA, Penning LC, Toegel S, 2010. MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol. Biol.*, 11:74.
- Cox RA, 1977. Structure and function of prokaryotic and

- eukaryotic ribosomes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 32:193 – 211.
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siebert W, Nitsche A, 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313(4):856 – 862.
- Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF, 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (2nd) New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1343 – 1361.
- 邓顺, 张友军, 褚栋, 2007. 一种提取小型昆虫总 RNA 的有效方法. *昆虫知识*, 44(4):593 – 596.
- 冯国忠, 黎万顺, 陈斌, 李莹, 2010. 葱蝇夏滞育蛹的全长 cDNA 文库构建. *西南大学学报(自然科学版)*, 32(6):89 – 94.
- 李宏, 王新力, 1999. 植物组织 RNA 提取的难点及对策. *生物技术通报*, 15(1):36 – 39.
- 刘华, 申天琳, 李学坤, 付合才, 戴九兰, 2011. 土壤 RNA 提取方法研究进展. *应用与环境生物学报*, 17(6):918 – 922.
- 刘志刚, 黄炯烈, 朱振宇, 周珍文, 刘玉琳, 龚十妹, 2001. 美洲大蠊若虫 cDNA 表达文库的构建及初步鉴定. *中华微生物和免疫学杂志*, 21:4 – 6.
- 孙秀珍, 刘昀, 2005. 霜天蛾 cDNA 表达文库的构建和初步鉴定. *西安交通大学学报(医学版)*, 26(3):244 – 246, 279.
- 王光华, 赵伟春, 程家安, 2008. 实时荧光定量 PCR 技术及其在昆虫学研究中的应用. *昆虫学报*, 51(12):1293 – 1303.
- 张霞, 李国勋, 郭巍, 2008. 甜菜夜蛾肠粘蛋白 cDNA 基因的分子克隆与序列分析. *中国农业科学*, 42(11):3898 – 3904.