

高效提取二相性白假丝酵母菌总 RNA 实验研究*

罗红梅, 苑天红**, 余晓玲, 贺娟, 谭心, 马研

(贵阳医学院微生物学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨高效、简便提取白假丝酵母菌孢子相及菌丝相细胞总 RNA 的方法。方法: 采用液氮法、超声法及玻璃珠(直径 0.55 cm)法提取白假丝酵母菌的孢子相和菌丝相细胞总 RNA, 紫外分光光度计检测所提取的二相性白假丝酵母菌总 RNA 的 OD₂₆₀ 及 OD₂₈₀, 琼脂糖凝胶电泳检测所提取的二相性白假丝酵母菌总 RNA 的完整性。结果: 液氮法、超声法及玻璃珠法提取白假丝酵母菌孢子相总 RNA 的浓度分别为(1.021 ± 0.145) g/L、(0.923 ± 0.031) g/L、(1.121 ± 0.175) g/L, 纯度分别为 1.697 ± 0.087、1.474 ± 0.064、1.897 ± 0.047; 液氮法、超声法及玻璃珠法提取白假丝酵母菌菌丝相总 RNA 的浓度分别为(0.357 ± 0.260) g/L、(0.287 ± 0.023) g/L、(0.523 ± 0.056) g/L, 纯度分别为 1.548 ± 0.047、1.474 ± 0.064、1.874 ± 0.064; 电泳结果显示, 应用玻璃珠法提取的孢子相和菌丝相总 RNA 28S rRNA、18S rRNA、5S rRNA 三条带均明显显示, 而采用液氮法、超声法提取的总 RNA 三条带不明显。结论: RNAiso Plus 试剂联合直径为 0.55 cm 的玻璃珠法提取的白假丝酵母菌孢子相及菌丝相细胞的总 RNA 浓度及纯度均较液氮法和超声法好, 值得推广。

[关键词] 白假丝酵母菌; RNA; 液氮; 超声; 玻璃珠

[中图分类号] R379.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)06-0611-04

An Experimental Study on Effective Isolation of Total RNA from Dimorphic *Candida albicans*

LUO Hongmei, YUAN Tianhong, SHE Xiaoling, HE Juan, TAN Xin, MA Yan
(Department of Microbiology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To explore an efficient and simple method for extraction of total RNA of *Candida albicans* in yeast form and hyphal form. **Methods:** The total RNA of *Candida albicans* in yeast form and hyphal form was isolated by liquid nitrogen method, ultrasonication method and glass bead (diameter 0.55 cm) method respectively. The OD₂₆₀ and OD₂₈₀ values of extracted total RNA were measured by ultraviolet spectrophotometer and agarose gel electrophoresis was carried out to test RNA integrity. **Results:** The concentrations of yeast form total RNA extracted by liquid nitrogen method, ultrasonication method and glass bead method were (1.021 ± 0.145) g/L, (0.923 ± 0.031) g/L, (1.121 ± 0.175) g/L, and the purities were 1.697 ± 0.087, 1.474 ± 0.064, 1.897 ± 0.047, respectively. The concentrations of hyphal form total RNA extracted by the three methods were (0.357 ± 0.260) g/L, (0.287 ± 0.023) g/L, (0.523 ± 0.056) g/L, and the purities were 1.548 ± 0.047, 1.474 ± 0.064, 1.874 ± 0.064, respectively. The results of electrophoresis showed that there were three clear bands - 28S rRNA, 18S rRNA and 5S rRNA when total RNA was isolated with glass bead method and the bands were not clear when RNA was isolated by liquid nitrogen and ultrasonication methods. **Conclusions:** The concentration and the purity of total RNA isolated from dimorphic *Candida albicans* by RNAiso Plus combined with 0.55 cm diameter glass bead method are higher than that isolated by liquid nitrogen and ultrasonication methods. This method is effective, simple, economic and worth populari-

* [基金项目] 贵州省科学技术厅科研基金资助项目[2008]2273号。

** 通信作者 E-mail: gy.th@163.com

zing.

[Key words] *Candida albicans*; RNA; liquid nitrogen; ultrasonication method; glass beads

白假丝酵母菌是医院真菌感染中最常见的二相性真菌^[1],因其具有坚硬的细胞壁,所以破坏其细胞壁是提取其细胞总 RNA 的关键。目前有关提取白假丝酵母菌总 RNA 的方法虽有报道,但都相对复杂繁琐,且需要特定的仪器或设备^[2-3],本文分别采用 3 种不同方法提取白假丝酵母菌孢子相、菌丝相细胞的总 RNA,探讨高效、简便、经济提取二相性白假丝酵母菌总 RNA 的快捷方法,为进一步从分子生物学水平研究二相性白假丝酵母菌奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株

白假丝酵母菌标准菌株 ATCC - 10231, 贵阳医学院微生物学教研室保存。

1.2 主要试剂及仪器

酵母浸膏、葡萄糖、蛋白胨、琼脂粉(上海博微生物科技有限公司), RPMI 1640 培养基(北京赛默飞世尔生物化学制品有限公司), 优质胎牛血清(天津灏洋生物制品科技有限责任公司), RNAiso Plus 试剂(TaKaRa 公司), DEPC 原液、溴化乙锭(Solarbio 公司), 琼脂糖(上海益博生物科技有限公司), 0.55 cm 玻璃珠(天津玻璃仪器厂), 液氮(上海振兴化工一厂); 超声粉碎仪(北京长源实验设备厂), 高速台式冷冻离心机(江苏太仓医疗器械厂), 紫外分光光度计(上海跃进医疗器械厂), 微型水平凝胶有机玻璃电泳仪(日本 ADVANCE), 凝胶成像分析仪(北京长源实验设备厂)。

1.3 二相性白假丝酵母菌的培养

将白假丝酵母菌接种于 10 ml YPD 液体培养基中, 37 °C 培养 48 h 后, 再转种于 10 ml YPD 液体培养基中, 37 °C 培养 12 h, 获得孢子相细胞^[4]。将白假丝酵母菌接种于 10 ml 含有 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基(pH 7.0), 37 °C、传代培养 12 次, 待菌丝相细胞纯度达 95% 以上后, 于 4 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 获得菌丝相细胞^[5]。分别用灭菌生理盐水将孢子相和菌丝相细胞浓度均调整为 5×10^7 /ml, 分别取 1 ml 二相性菌悬液于 DEPC 处理过的离心管内, 10 000 r/min 离心 10 min, 并保留菌细胞沉淀用于后续实验。

1.4 二相性白假丝酵母菌总 RNA 的提取

1.4.1 液氮法 分别在二相性菌细胞沉淀中加入 1 ml RNAiso Plus 试剂, 放入液氮中冻融, 每次冻融 5 s, 间隔 10 s, 冻融 4 次。

1.4.2 超声法 分别在二相性菌细胞沉淀中加入 1 ml RNAiso Plus 试剂, 置于冰上, 用超声粉碎仪进行破壁, 功率调至 400 W, 工作时间为 3 s/次, 间隔 15 s, 总时间为 15 min。

1.4.3 玻璃珠法 分别在二相性菌细胞沉淀中加入 400 μ l RNAiso Plus 试剂, 再放入 10 粒 0.55 cm 玻璃珠, 于漩涡混合器(转速为 150 r/min)上振荡 5 min, 再将振荡后的液体移入新的 EP 管中, 加入 600 μ l RNAiso Plus 试剂充分混匀, 放置 25 min。

1.4.4 总 RNA 的提取 分别将上述 3 种方法处理得到的孢子相及菌丝相细胞中各加入 200 μ l 氯仿, 充分混匀后放置 10 min, 12 000 r/min 4 °C 离心 15 min; 取上清液于新的离心管内, 再加入等体积的异丙醇混匀后放置 5 min, 12 000 r/min 4 °C 离心 10 min; 弃上清, 加入 1 ml 75% 乙醇洗涤, 12 000 r/min 4 °C 离心 10 min; 弃上清, 置超净台晾干, 加入 20 μ l DEPC 水溶解 RNA 沉淀, 60 °C 水浴 10 min。

1.5 检测二相性白假丝酵母菌总 RNA

1.5.1 浓度和纯度的检测 用紫外分光光度仪检测 260 nm 及 280 nm 波长下的 OD 值, 根据公式: RNA 浓度(g/L) = (OD₂₆₀值 \times 40 \times 稀释倍数)/1 000, RNA 纯度 = OD₂₆₀/OD₂₈₀, 计算出所提取的孢子相和菌丝相样本的总 RNA 浓度和纯度。

1.5.2 完整性的检测 用 1.0% 琼脂糖凝胶, 90 V 电泳 15 min, 经 EB 染色的凝胶在凝胶成像分析仪上观察结果。

1.6 统计分析 使用 SPSS 17.0 统计学软件分析, 数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 统计方法选用单因素方差分析, 比较 3 种方法所提取的总 RNA 浓度和纯度差异, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 总 RNA 浓度和纯度比较

玻璃珠法所提取的白假丝酵母菌孢子相和菌丝相总 RNA 浓度和纯度均高于液氮法和超声法, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 并且玻璃珠法提取

的总 RNA 样品 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.8 ~ 2.0, 而液氮法及超声法提取的总 RNA 样品该比值小于 1.8, 均有降解。结果见表 1、2。

表 1 三种方法提取的白假丝酵母菌孢子相总 RNA 浓度和纯度 ($n = 10$)

Tab. 1 Concentrations and purities of total RNA extracted from yeast form of *Candida albicans* with three methods

提取方法	浓度 (g/L)	纯度
液氮法	$1.021 \pm 0.145^{(1)}$	$1.697 \pm 0.087^{(1)}$
超声法	$0.923 \pm 0.031^{(1)}$	$1.474 \pm 0.064^{(1)}$
玻璃珠法	1.121 ± 0.175	1.897 ± 0.047

注: ⁽¹⁾与玻璃珠法比较, $P < 0.05$ 。

表 2 三种方法提取的白假丝酵母菌菌丝相总 RNA 浓度和纯度 ($n = 10$)

Tab. 2 Concentrations and purities of total RNA extracted from hyphal form of *Candida albicans* with three methods

提取方法	浓度 (g/L)	纯度
液氮法	$0.357 \pm 0.260^{(1)}$	$1.548 \pm 0.047^{(1)}$
超声法	$0.287 \pm 0.023^{(1)}$	$1.474 \pm 0.064^{(1)}$
玻璃珠法	0.523 ± 0.056	1.874 ± 0.064

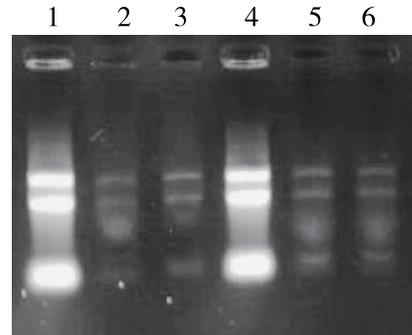
注: ⁽¹⁾与玻璃珠法比较, $P < 0.05$ 。

2.2 总 RNA 完整性的比较

将所提取的总 RNA 样品经 1.0% 琼脂凝胶电泳, 并在凝胶成像分析仪上观察发现, 用玻璃珠法所提取的孢子相及菌丝相总 RNA 样品可见清晰的 3 条 rRNA 条带, 即 28S rRNA、18S rRNA 和 5S rRNA, 液氮法与超声法提取的孢子相及菌丝相总 RNA 完整性均较玻璃珠法差, 见图 1。

3 讨论

白假丝酵母菌是二相性真菌, 具有孢子相和菌丝相两种形态, 在一定条件下这两种形态可以相互转换, 大多数研究认为, 白假丝酵母菌孢子相转换成菌丝相是其致病的关键因素之一^[6]。因此, 白假丝酵母菌二相性转换已成为当前研究的热点, 而在体外诱导培养出高纯度的白假丝酵母菌孢子相和菌丝相细胞, 并提取其二相细胞的总 RNA, 对于从分子生物学水平深入研究其二相性的转换至关重要。然而提取其总 RNA 有一定难度, 因为白假丝酵母菌是一种具有复杂、坚固细胞壁的真核细胞



1: 玻璃珠法提取的孢子相细胞总 RNA; 2: 液氮法提取的孢子相细胞总 RNA; 3: 超声法提取的孢子相细胞总 RNA; 4: 玻璃珠法提取的菌丝相细胞总 RNA; 5: 液氮法提取的菌丝相细胞总 RNA; 6: 超声法提取的菌丝相细胞总 RNA

图 1 三种方法提取的白假丝酵母菌孢子相及菌丝相细胞总 RNA 的电泳结果

Fig. 1 The electrophoresis results of total RNA extracted from yeast form and hyphal form of *Candida albicans* with three methods

型微生物, 其细胞壁有 4 ~ 8 层, 主要成分是多糖, 其中几丁质成分使白假丝酵母菌细胞壁较其它酵母菌细胞壁坚固, 它的蛋白主要通过 β -1,6 支链葡聚糖与几丁质骨架结合^[7], 要提取浓度和纯度高、完整性好的白假丝酵母菌总 RNA, 破壁是其中一个关键的步骤。目前采用的白假丝酵母菌破壁方法主要有液氮法、破壁酶法、酸洗玻璃珠法、热酸性酚法、超声法等, 而这些方法均繁琐、耗时, 并且需要特定的仪器设备^[2-4]。

本实验采用新型 RNAiso Plus 试剂, 价格比传统 Trizol 试剂便宜, 且作为广谱型 Total RNA 提取试剂, 具有以下优点。(1) 广谱性强, 可以从动物组织、植物材料、各种微生物、培养细胞等中提取 Total RNA; (2) 纯度高, 提取的 Total RNA 基本不含蛋白质及基因组 DNA, 可以直接用于 Northern 杂交、斑点杂交、mRNA 纯化、体外翻译、RNA 分解酶的保护分析、RT-PCR、构建 cDNA 文库等各种分子生物学实验; (3) 快速简便, 实验操作快速方便, 整个操作在 1 h 内便可完成; (4) 颜色鲜明, 加入氯仿离心后, 会形成无色的上清层和鲜红色的下层 (有机层)。

实验所应用的玻璃珠是直径为 0.55 cm 的普通玻璃珠, 通过振荡机械性地破坏白假丝酵母菌细胞壁, 以提取细胞总 RNA。该方法的振荡时间不宜过短或过长, 过短破壁不充分, 核酸没有释放出

来,过长则会使释放出来的核酸被降解。研究发现振荡时间在 5 min 并且振荡转速为 150 r/min 时,提取的白假丝酵母菌总 RNA 效果最佳。这与传统的酸洗玻璃珠相比,不仅价格便宜,且操作简单,振荡时间 5 min,就能有效破坏白假丝酵母菌孢子相和菌丝相的细胞壁,所提取的总 RNA 浓度、纯度及完整性均较液氮破壁法和超声破壁法好。使用液氮和超声法破壁提取的白假丝酵母菌孢子相和菌丝相总 RNA 的纯度不高,分析其原因是液氮易挥发,实验操作不方便,因此导致破壁时间不够;超声法需要特殊仪器,且超声时间如果不够,破壁就不充分,而超声时间过长,则总 RNA 又容易被降解,并且超声法提取的总 RNA 暴露于空气中,容易被污染。所以,液氮和超声法破壁提取的白假丝酵母菌孢子相和菌丝相总 RNA 的浓度和纯度均不如玻璃珠法高。

本研究首次采用了 RNAiso Plus 试剂联合直径为 0.55 cm 的玻璃珠法提取白假丝酵母菌孢子相和菌丝相细胞总 RNA,所得到的白假丝酵母菌无论是孢子相还是菌丝相,其总 RNA 浓度、纯度及完整性均较以往传统的液氮破壁法和超声破壁法提取的白假丝酵母菌孢子相和菌丝相细胞总 RNA 浓度、纯度更高,并且完整性也更好。因此采用 RNAiso Plus 联合直径为 0.55 cm 的玻璃珠法,用于提取白假丝酵母菌孢子相和菌丝相细胞的总 RNA,高效、简便、经济实惠,不需要特殊的实验器

材,就能满足分子生物学实验的需要,值得推广。

4 参考文献

- [1] Tashiro M, Murakami H, Yoshizawa S, et al. Isolation rate and susceptibilities of *Candida* species from blood, vascular catheter, urine and stool [J]. *Kansenshogaku Zasshi*, 2010(2):187-192.
- [2] 苏惠春,程波,傅冷西,等. 3 种破壁方法提取念珠菌总 RNA 效果的比较[J]. *中国真菌学杂志*, 2007(5):286-288.
- [3] 潘琤,魏昕,刘卫红. 改进 Trizol 法提取白假丝酵母菌总 RNA 初探[J]. *临床口腔医学杂志*, 2007(9):531-532.
- [4] 苏惠春,程波,施秀明. EFG1 和 HGC1 基因在白假丝酵母菌菌丝相和酵母相的表达差异[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2010(4):304-306.
- [5] 韩慧霞,王鲁,宋秋荷,等. 白假丝酵母菌菌丝相全长 cDNA 文库的构建和鉴定[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2011(4):260-263.
- [6] 陈雪蓉,肖敦振. 白假丝酵母菌毒力因子的研究进展[J]. *中国妇幼保健*, 2007(32):4631-4633.
- [7] Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, et al. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function and expression[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008(1):130-180.

(2012-08-03 收稿, 2012-11-08 修回)

编辑:潘 娅

(上接第 610 页)

本研究结果显示,性周期筛选合笼法受孕率高,是复制小规模孕鼠模型的首选方法。阴道精子检查法和阴道精子合并角化上皮检查法操作简便、可行性强,但均需要结合雌鼠性周期的推算,降低其假阳性率或假阴性率,提高判断大鼠受孕情况的准确性。

4 参考文献

- [1] 张春燕,刘丽均,狄敏,等. 不同剂量孕马血清促性腺激素(PMSG)对未成年大鼠超数排卵效果与质量的影响[J]. *中国比较学杂志*, 2007(6):338-340.

- [2] 张俭,伍贤进,马岚,等. BALB/c 小鼠繁殖性能的观察及分析[J]. *实验动物科学与管理*, 2006(4):1-4.
- [3] 唐旭,殷国荣,杨建一,等. 一种简便准确的小鼠妊娠诊断法—阴栓物测法[J]. *中国生物制品学杂志*, 2008(10):898.
- [4] 翟青新,招霞,哈慧馨,等. 小鼠的生殖特性及阴栓[J]. *实验动物科学*, 2009(2):62-63.
- [5] 王月鹏,赵行宇,张慧峰. 成年大鼠性周期阴道细胞变化探究[J]. *健康与生物医药*, 2007(17):192-193.

(2012-08-28 收稿, 2012-10-25 修回)

编辑:潘 娅