

一种 RNA 提取试剂盒 ——TRIZOL 的使用方法初探

于寒松, 彭 帅, 谢远红, 胡耀辉*
(吉林农业大学食品工程学院, 吉林 长春 130118)

摘 要: 以酿酒酵母为原料, 利用 TRIZOL 试剂快速提取法, 得到的总 RNA 不完整, 只有 5s rRNA 一条条带, 经过对该试剂盒的改进后提取的总 RNA 呈现 28s rRNA, 18s rRNA 和 5s rRNA 三条清晰的条带, 很少有降解, 其 A_{260}/A_{280} 值可达 1.946, A_{260}/A_{230} 值为 2.070, 具有很高的纯度。

关键词: TRIZOL; 酵母; RNA 提取

Study on Improvement of RNA Isolating Reagent Kit—TRIZOL

YU Han-song, PENG Shuai, XIE Yuan-hong, HE Yao-hui*
(College of Food Engineering, Jilin Agricultural University, Jilin 130118, China)

Abstract: To isolate total RNA from *Saccharomyces cerevisiae* by the method of TRIZOL reagent kit, the RNA purified was rather not complete, since it showed band 5s rRNA only. After changing several steps of the method, the results showed that there appeared three clear bands—28s rRNA, 18s rRNA and 5s rRNA respectively with little RNA decomposed. The ratio of $A_{260}/$

收稿日期 2004-09-20

*通讯作者

基金项目: 吉林省科技厅重点资助项目(20010204-1)

作者简介: 于寒松(1979-), 在读博士, 研究方向为生物化学及分子生物学。

- Chem, 1994, 42: 2688-2691.
- [4] Kato A, Shimokawa K, Kobayashi K. Improvement of the functional properties of insoluble gluten by pronase digestion followed by dextran conjugate[J]. J Agric Food Chem, 1991, 39: 1053-1056.
- [5] Nakamura S, Kato A, Kobayashi K. Enhanced antioxidant effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides[J]. J Agric Food Chem, 1992, 40: 2033-2037.
- [6] Chevalier F, Hobert J M, Popineau Y, et al. Improvement of functional properties of β -lactoglobulin glycosylated through the maillard reaction is related to the nature of the sugar[J]. International Dairy Journal, 2001, (11): 145-152.
- [7] Jing H, Kitts D D. Chemical and biochemical properties of casein-sugar maillard reaction products[J]. Food and Chemical Toxicology, 2002, 40: 1007-1015.
- [8] Dittrich R, El-massry F, Kunz K, et al. Maillard reaction products inhibit oxidation of human low-density lipoproteins in vitro[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 3900-3904.
- [9] Antony S M, Han I Y, Rieck J R, et al. Antioxidative effect of maillard reaction products formed from honey at different reaction times[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 3985-3989.
- [10] Brands C M J, van Boekel M A J S. Kinetic modelling of reactions in heated disaccharide—Casein Systems[J]. Food Chemistry, 2003, 83: 13-26.
- [11] Chevalier F, Chobert J-M, Popineau Y, et al. Improvement of functional properties of β -lactoglobulin glycosylated through the maillard reaction is related to the nature of the sugar[J]. International Dairy Journal, 2001, 11: 145-152.
- [12] Aoki T, Hiidome Y, Kitahata K, et al. Improvement of heat stability and emulsifying activity of ovalbumin by conjugation with glucuronic acid through the maillard reaction[J]. Food Research International, 1999, 32: 129-133.
- [13] Pearce K N, Kinsella J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique[J]. J Agric Food Chem, 1978, 26(3): 716-723.
- [14] Bobtaille G, Ayers C. Effects of κ -Casein glycosylation on heat stability of milk[J]. Food Research International, 1995, 28(1): 17-21.

A_{280} was 1.961, and A_{260}/A_{230} 2.070, so the purity was high.

Key words: TRIZOL; *Sacharomyces cerevisiae*; RNA isolate

中图分类号: Q79 Q93

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)11-0039-04

从细胞中分离总RNA的纯度与完整性对于许多分子生物学实验至关重要,例如, Northern 印迹及杂交分析,寡聚纤维素选择分离 mRNA, cDNA 文库的构建等实验的成败在很大程度上取决于总RNA的提取质量^[1]。从真核细胞中提取的总RNA用凝胶电泳分析,根据是否得到代表三种最显著 rRNA 分子的特征带型(28S rRNA, 18S rRNA 和 5S rRNA),来检测总RNA提取的完整性^[2],而根据 A_{260}/A_{280} 与 A_{260}/A_{230} 的比值可验证总RNA的纯度。

完整的总RNA可以通过多种方法从真核细胞中提取。而细胞的类型和提取方法对能否得到未降解总RNA有一定影响,比如在本试验中所用的原料酿酒酵母就是一类特殊类型的细胞,其具有特殊的细胞壁结构,由甘露聚糖和葡聚糖组成,利用现在最流行的总RNA一步提取法即 TRIZOL 试剂盒提取法得到的总RNA不完整,只具有 5S rRNA 条带,而利用传统的热酸性酚法虽然提取的RNA质量较高,但步骤复杂、需时较长且不利于多个样品同时操作,本试验针对这种现状,对 TRIZOL 法提取步骤进行部分改进,以期得到一种既方便、快速又能得到高质量总RNA的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)AS₂ 1416购于中国科学院微生物所菌种保藏中心,酿酒酵母 #215 为本实验室保藏, TRIZOL 试剂盒购自于上海生工生物公司(加拿大 BBI 产品)。

1.2 方法

将酵母菌在 10 ml 完全培养基中培养至指数中期($OD_{600}=1.0$),按下述两种方法分别提取酵母菌总RNA。

1.2.1 热酸性酚法提取酵母菌总RNA

参照文献[1]中的方法略有改进^[3]。取 1ml 上述指数中期酵母培养液于 4℃, 1500 × g 离心 3min, 弃上清。菌体沉淀用 1ml 冰冷水重悬转移至一个干净的离心管中, 4℃ 离心 10s, 弃上清。用 400 μl TES 溶液重悬细胞沉淀, 加 400 μl 酸性酚, 激烈振荡 10s。65℃ 温育 30~60℃, 其间不时振荡混合。冰浴放置 5min, 4℃, 12000 × g 离心 5min, 水相移至一个干净的离心管中加 400 μl 酸性酚, 振荡, 冰浴放置 5min, 4℃, 12000 × g 离心 5min, 将水相移到一新管中加 40 μl 3mol/L 乙酸钠(pH5.3)及 1ml 冰冷的无水乙醇, 4℃, 12000 × g 离心 5min, 在冰冷 70% 乙醇中快速振荡洗涤 RNA 沉淀, 12000 × g 离心

5min, RNA 沉淀用 DEPC 水(后文记做 DEPC-H₂O)重溶。产物用于电泳分析或在 -20℃ 保存。

1.2.2 TRIZOL 试剂盒提取酵母菌总RNA

按 BBI 公司提供的 TRIZOL 试剂使用说明书进行操作: 取 1ml 指数中期的酵母培养液, 经计数后(酵母菌每 1×10^8 个加 1ml TRIZOL)离心收集菌体, 加入 1ml TRIZOL, 混匀, 激烈振荡, 室温放置 5min, 加入 200 μl 氯仿, 剧烈振荡 30s, 12000 × g 离心 5min, 上层水相移入一个新离心管中, 加入等体积的异丙醇, 室温放置 5min, 12000 × g 高速离心 5min 弃上清, 用 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀 2 次, 用 30 μl DEPC-H₂O 溶解 RNA 沉淀。产物用于电泳分析或在 -20℃ 保存。

1.2.3 TRIZOL 试剂盒改进方法提取酵母菌总RNA

在收集菌体之前加入 1% 的蜗牛酶 30℃ 温育 20min(对照组温育 50min), 然后进行菌体离心收集加入 1ml TRIZOL, 混匀, 振荡, 冰浴 5min, 加入 200 μl 氯仿, 剧烈振荡 30s, 12000 × g, 4℃ 离心 5min, 上层水相移入一个新离心管中, 加入等体积的异丙醇, 冰浴 5min, 12000 × g, 4℃ 离心 10min, 弃上清, 用 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀 2 次, 用 30 μl DEPC-H₂O 溶解 RNA 沉淀。产物用于电泳分析或在 -20℃ 保存。

1.3 总RNA浓度及纯度检测

将采用上述三种方法得到的酵母总RNA溶于 DEPC-H₂O 中, 取一定量的样品稀释 N 倍至 200 μl 混匀, 加入微量比色杯中, 用紫外分光光度计测量样品的 A_{230} , A_{260} , A_{280} 的值(以 DEPC-H₂O 为空白调整零点)。

RNA 样品浓度(μg/μl)为: $A_{260} \times N \times 40/1000$ 。据此浓度计算酵母菌总RNA产量, 以 A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} 比值的大小判定 RNA 样品的纯度。每样品重复 3 次取平均值^[3]。

1.4 总RNA完整性检测

取少量三种方法所得总RNA样品与溴酚蓝上样缓冲液混匀后, 在 1% 琼脂糖凝胶、TAE 缓冲液中 60℃ 电泳 1h, 用上海东方凝胶成像仪摄像。

2 结果与分析

2.1 三种提取方案总RNA产量比较

热酸性酚法, TRIZOL 法, TRIZOL 改进法, 提取的总RNA经测定 A_{260} 的三次平均值分别为 0.296、0.298、0.122, 根据 1.3 中公式($A_{260} \times N \times 40/1000$)计算总RNA产量分别为 1.184、0.488、1.192 μg/μl。所以 1ml 指数中期的酵母培养液得到的总RNA量中, 热酸性酚法获

得的总 RNA 量为 $35.52\mu\text{g}$ ；而 TRIZOL 方法得到的总 RNA 量最少，为 $14.64\mu\text{g}$ ；改进后的 TRIZOL 方法 RNA 产量大大提高，达到 $35.76\mu\text{g}$ 。

由上述结果可知，改进的 TRIZOL 方法提取酵母总 RNA 产量大大提高，一方面是由于加入对酵母细胞壁有特异性破坏作用的酶使酵母的 RNA 大部分被释放出来，这是本方法产量提高的最主要原因，另一方面，由于改进方法中使用了冰浴，且离心时使用了冷冻离心机 (4°C 离心) 离心，使 RNA 的降解率降低，这样使总 RNA 的纯度和完整性都有所提高。

2.2 三种方法提取酵母菌总 RNA 纯度的比较

表 1 三种提取方法获得的 RNA 纯度
Table 1 Purity of total RNA by the three method

方法	吸光值				
	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Trizol法(未加酶)	0.203	0.122	0.090	1.356	0.601
Trizol法(加酶破壁 20min)	0.144	0.298	0.152	1.961	2.070
Trizol法(加酶破壁 50min)	0.145	0.299	0.153	1.954	2.062
热酸性酚法	0.142	0.296	0.153	1.935	2.085

由表 1 可知，热酸性酚法和改进的 TRIZOL 法提取的酵母菌总 RNA 纯度较高。而 TRIZOL 法提取的总 RNA 纯度很低。

提取的 RNA 溶液 A_{260}/A_{280} 的比值介于 $1.7\sim 2.0$ 之间时 RNA 纯度高，如果小于 1.7 ，则说明有蛋白质的污染或是 RNA 发生降解；提取的 RNA 溶液 A_{260}/A_{230} 的比值大于 2.0 时 RNA 纯度高，如果远小于 2.0 ，则表明其中有大量的小分子或盐存在。本研究采用加酶 Trizol 法和热酸性酚法破壁获得的效果远比其他方法好，RNA 产出量明显提高，与此同时溶出的蛋白质也增加，在蛋白质沉淀时会吸附和包裹小分子物质使其产生共沉，因而 A_{230} 值变小，同时 RNA 溶出率提高 A_{260} 变大，因此 A_{260}/A_{230} 比值大于 2.0 ，说明 RNA 纯度大幅度提高。而杂质蛋白质溶出率增加导致 A_{280} 值增大，但其增加的幅度远小于 RNA 溶出率的增加幅度，则总体上 A_{260}/A_{280} 值均大于 1.7 ，从而也说明 RNA 纯度提高。

2.3 三种方法提取酵母菌总 RNA 完整性的比较

在酵母菌总 RNA 提取过程中，应用热酸性酚法时发现所得 RNA 沉淀呈浅黄色，说明其中有多酚类物质没有全部除去，其他两种方法提取的总 RNA 则呈白色或半透明状。

由图 1 电泳结果明显可见 TRIZOL 提取方法提取的总 RNA 只有 5S rRNA 一条条带，且亮度较暗，说明其提取的总 RNA 不完整且产量低，而由图 2 可看出热酸性酚法和 TRIZOL 改进法提取的总 RNA 可见三条清晰的条带，它们分别为 5S rRNA，18S rRNA，28S rRNA。表明这两种方法提取的酵母菌总 RNA 比

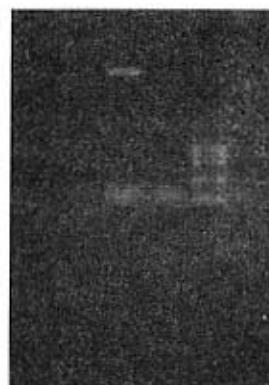


图 1 Trizol 法提取总 RNA(未加酶)

Fig.1 Extraction of RNA by Trizol (Not add enzyme)



1. 热酸性酚法提取总 RNA
2. 蜗牛酶处理 20min 后用 Trizol 提取总 RNA
3. 蜗牛酶处理 50min 后用 Trizol 提取总 RNA
4. Marker

图 2 两种总 RNA 提取方法比较

Fig.2 Comparrrson of total RNA isolation by two methods

较完整。

另外，由表 1 和图 2 可以看出经蜗牛酶处理 20min 和处理 50min 对总 RNA 的产量和完整性影响不大。

3 讨论

试验证明，用 TRIZOL 法获得的酵母菌总 RNA 不完整或降解严重，纯度很低，不适合直接应用于酵母菌总 RNA 的提取，而改进后的 TRIZOL 法和热酸性酚法获得的酵母菌总 RNA 很少有降解，纯度很高，适合于获得高质量的酵母总 RNA。

本试验室最后确定了 TRIZOL 改进法为酵母菌总 RNA 的提取方法，因为它在可以得到质量较高的 RNA 的同时，还具备快速简捷，所需试剂种类少，适合于少量样品提取等优点，热酸性酚法虽然得到的 RNA 质量高但是这个方法耗时长，所用试剂多且实验中加入的酚类物质不易除去，最终易与 RNA 形成褐色复合物而导致 RNA 完全丧失生物学活性^[5]。

因此，要获得完整的高纯度的 RNA 是一项较为困

番茄籽蛋白的功能和结构

沈心妤, 许时婴*, 王 璋
(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 蛋白经加水溶解(5% W/V)和加热至 50℃, 氮溶指数 NSI 最高为 30.02%。对可溶性番茄籽蛋白功能性质的测定表明, 当乳化温度由 30℃ 上升至 50℃ 时, 其乳化能力和乳化稳定性均随之上升, 而当乳化温度上升至 60℃ 时, 乳化能力和乳化稳定性均显著下降; 其起泡性略优于大豆分离蛋白, 而泡沫稳定性不如大豆分离蛋白。对番茄籽蛋白的氨基酸组成分析表明, 番茄籽蛋白氨基酸种类齐全, 可以作为强化赖氨酸的蛋白源。SDS-PAGE 电泳图显示, 可溶性番茄籽蛋白中 70% 为盐溶性蛋白, 水溶性蛋白相对分子质量分别为 39.2、30.1 和 15.8kDa; 盐溶性蛋白相对分子质量分别为 66.1、28.1 和 16.8kDa; 醇溶性蛋白相对分子质量分别为 30.3 和 17.8kDa。

关键词: 番茄籽蛋白; 氮溶指数; 乳化性; 起泡性; SDS-PAGE

Functional Properties and Structure of Tomato Seed Protein

SHEN Xin-yu, XU Shi-ying*, WANG Zhang
(Department of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract : The maximum NSI of tomato seed protein (TSP) was 30.02% at 50℃ in a 5%(W/V) water solution. The determination of functional properties of soluble tomato seed protein showed that the emulsifying capacity and stability of the soluble tomato seed protein were increased as the temperature rose from 30℃ to 50℃, and decreased when reaching 60℃. Compared with soy isolate protein, tomato seed protein had better foaming capacity but worse foam stability. The amino acid composition of tomato seed protein indicated that it could be used as a promising source for supplementation of low lysine foods. SDS-PAGE electrophoresis revealed that the water and salt fraction of tomato seed protein exhibited three bands each (39.2, 30.1 and 15.8kDa, 66.1, 28.1 and 16.8kDa, respectively), while alcohol soluble protein showed two bands (30.3 and 17.8kDa).

Key words tomato seed protein NSI(nitrogen solubility index); emulsifying capacity; foaming capacity;

SDS-PAGE

中图分类号 TS201.21

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)11-0042-05

收稿日期 2004-11-29

*通讯作者

基金项目: “十五”国家重大科技专项项目(2001BA501A232)

作者简介: 沈心妤(1980-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学与工程。

难的工作, 不同物种甚至同一物种不同组织的 RNA 提取, 往往需要采用不同的处理方法^[6]。

参考文献:

- [1] F. 奥斯伯. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 朱德华, 等. 快速纯化真核细胞总RNA方法的改良[J]. 河南医学研究, 2001, (3).
- [3] 吴丽娟, 等. 改进SDS-Phenol法快速提取细胞总RNA[J]. 第三军医大学学报, 1991, (1).
- [4] 杨安刚, 等. 生物化学与分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [5] 傅荣昭, 等. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994.
- [6] 杜希华, 等. 文冠果花药总RNA提取方法研究[J]. 北京林业大学学报, 2003, (1).