

两种提取蒙古黄芪miRNA方法的比较

吕帝瑾, 陈婧, 钟扬, 南蓬*

复旦大学生命科学学院, 生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 上海200433

摘要: 通过对两种miRNA提取方法——一步法和多步法进行比较研究, 以期获得较高质量的蒙古黄芪不同器官的miRNA。实验结果表明, 两种方法均可用于蒙古黄芪miRNA提取, 二者存在着不同的优缺点, 多步法提取成功率较高但步骤繁琐, 相比之下一步法实验条件要求严苛但步骤简单、快捷省时, 提取的蒙古黄芪miRNA完整性好, 可以满足荧光定量PCR等进一步实验需要。

关键词: miRNA提取; 蒙古黄芪; 一步法; 多步法

Compare with Two Protocols for microRNA Extraction from *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*

LÜ Di-Jin, CHEN Jing, ZHONG Yang, NAN Peng*

Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering, Ministry of Education, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: In order to obtain better quality miRNA in different parts of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*, two miRNA extraction methods (one-step method and multi-step method) were compared. The results showed that these two methods had different advantages and disadvantages, but both of them could be used for miRNA extraction. Multi-step method had higher success rate with cumbersome steps, one-step method needed strict experimental conditions but fast and time-saving, the miRNA isolated with one-step method had high integrity which could be used for quantitative RT-PCR and so on.

Key words: miRNA extraction; *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*; one-step method; multi-step method

黄芪是植物黄芪和中药黄芪的统称, 中药黄芪为豆科植物蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*)或膜荚黄芪(*A. membranaceus*)的干燥根, 具有补气固表、利尿脱毒、敛疮生肌的功效, 黄芪的有效药用成分包括毛蕊异黄酮、黄芪皂甙、黄芪多糖等多种代谢产物以及锌、钼、硅等多种微量元素, 在医学上常用于预防治疗人类的乳腺癌、骨质疏松症、心血管及肝肾系统相关疾病(刘星塔和喻正坤1995)。

miRNA是一种长度为21~26个核苷酸(nt)的非编码内源性小分子RNA, 近年来受到科学家们广泛的关注。提取miRNA作为实验研究的基础步骤, 其提取质量的优劣与整体实验的成功与否息息相关。目前研究领域针对不同的实验样本和实验目的已经开发出相应的不同试剂盒产品。

对于普通细胞及组织miRNA的提取主要采用两种方法: 一种是根据不同类别的RNA在不同浓度乙醇中溶解度的差异进行沉淀分离, 随后利用

特殊硅基质吸附材料特异性吸附小片段RNA (<200 nt); 另一种是先提取样品中的总RNA, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)将总RNA中的小片段RNA割胶分离, 再对其进行沉淀回收。对于从甲醛固定石蜡包埋(FFPE)样品中提取miRNA, 则通常先采用二甲苯脱蜡、乙醇洗涤之后再用裂解液和蛋白酶处理, 后期处理与普通组织相同。对于血液中miRNA的提取则需使用专用的过滤柱来分离白细胞, 期间需加入RNAlater稳定剂确保分离的白细胞RNA不被降解掉。

目前随着分子生物学技术在药用植物领域应用研究的日益深入, 获取高质量的miRNA样本逐渐成为进行分子生物学研究的重要前提, 黄芪中多糖成分及次生代谢产物含量较高, 给miRNA的

收稿 2014-05-22 修定 2014-07-07

资助 国家自然科学基金(81373963和30925004)。

* 通讯作者(E-mail: nanpeng@fudan.edu.cn; Tel: 021-65642957)。

提取带来了一定难度。本研究比较分析了应用于普通组织miRNA提取的两种提取试剂法(盒),以期获得一种较为理想的提取方法,为黄芪的分子生物学研究打好基础。

材料与方 法

本实验采用经过16 °C恒温,每日14 h光照和10 h黑暗条件处理条件下,盆栽培养100 d以上的蒙古黄芪[*Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* (Bunge) P. K. Hsiao],分别采用每棵植株的根、茎、叶3个部分作为研究材料。

1 一步法

采用天根公司的miRcute miRNA提取分离试剂盒(DP501),分别取0.1 g蒙古黄芪根、茎、叶组织在研钵中用液氮迅速研磨成粉末,每0.1 g植物组织加1 mL裂解液,用匀浆仪进行匀浆处理,将匀浆样品在室温放置5 min,使得核酸蛋白复合物完全分离。加入200 μ L氯仿,盖好管盖,剧烈振荡15 s,室温放置5 min。4 °C 13 400 \times g离心15 min,样品分为3层:下层为黄色有机相,中间层和上层为无色水相, RNA主要存在于水相中。将水相转移到新管中,准确量取转移液的体积,缓慢加入转移液体积0.43倍的无水乙醇,混匀,将得到的溶液和沉淀一起转入过滤柱中,室温13 400 \times g离心30 s,离心后保留流出液。量取流出液的体积,缓慢加入流出液体积0.75倍的无水乙醇,混匀,将得到的溶液和沉淀再次转入吸附柱中,室温13 400 \times g离心30 s,弃流出液,保留吸附柱。向吸附柱中加入500 μ L去蛋白液,室温静置2 min,室温13 400 \times g离心30 s,弃废液。向吸附柱中加入700 μ L漂洗液室温静置2 min,室温13 400 \times g离心30 s,弃废液。向吸附柱中加入500 μ L漂洗液,室温静置2 min,室温13 400 \times g离心30 s,弃废液。将吸附柱放入2 mL收集管中,室温13 400 \times g离心1 min,去除残余液体。将吸附柱转入一个新的1.5 mL离心管中,加15~30 μ L RNase-free ddH₂O,室温放置2 min,室温13 400 \times g离心2 min,即可获得miRNA。将所得miRNA溶液置于-70 °C冰箱保存备用。

2 多步法

2.1 蒙古黄芪总RNA提取

采用普通植物组织总RNA提取方法,本实验中使用的是天根植物总RNA提取试剂盒(DP432)。

2.2 小RNA分离

本实验试剂盒采用Balancer NGS Library Preparation Kit for small microRNA (K02420),取第一步提取的总RNA 1 μ g,加入3'Adaptor和RNase free H₂O配成5 μ L RNA混合体系,70 °C下加热2 min立即放在冰上冷却。依次加入Ligation Buffer、100 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂、Ligation Enhancer Mix、RNase Inhibitor Cocktail、3'Adapter Ligation Enzyme Mix配成总体积10.5 μ L的3'接头混合体系,22 °C预热1 h。向上述体系中加入1 μ L RT Primer,混匀后依次置于75 °C 5 min,37 °C 30 min,25 °C 15 min。期间将20 \times 5'Adapter置于70 °C下2 min,然后立即置于冰上配制成5'接头连接体系。依次加入3'Adapter Ligation Mix,10 mmol \cdot L⁻¹ ATP,5'Adaptor,5'Adapter Ligation Enzyme Mix,配成14.5 μ L的混合体系后,置于20 °C下1 h,放入4 °C下冷藏。

取14 μ L接头混合体系依次加入5 \times First Strand Buffer,10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP,100 mmol \cdot L⁻¹ DTT,RNase Inhibitor Cocktail,Reverse Transcriptase,配成24 μ L的体系后置于42 °C 1 h。

依次加入10 μ L上述反应的cDNA混合液,2 \times High Fidelity PCR Mix,50 \times Primer G \times 1,50 \times Primer G \times 2,RNase free H₂O配成50 μ L的PCR反应体系,按照98 °C 30 s;94 °C 10 s,60 °C 30 s,72 °C 15 s,12个循环;72 °C 10 min的反应步骤扩增,4 °C保存。

用6%琼脂凝胶电泳PCR产物,将110~125 bp的条带部分割下纯化。将0.5 mL的离心管底部用针穿4~5个圆孔,把割下待回收的胶放入其中,将0.5 mL离心管放入2 mL离心管中13 400 \times g离心2 min,加入100 μ L稀释后的洗脱液,轻柔翻转2 h洗脱。将洗脱液和胶碎块混合物转移到过滤柱上,室温下13 400 \times g离心过滤柱2 min,将所得miRNA溶液置于-70 °C冰箱保存备用。

实验结果

1 高通量测序结果分析

对两种方法提取的小RNA分别进行文库构建及高通量测序,将获得的数据通过Blast与miRBase 20.0 (<http://www.mirbase.org/>)中的已知miRNA序列(193个物种,25 141条成熟miRNA)进行比对,匹

配度达到90%的序列作为已知miRNA (表1)。数据结果显示多步法提取的miRNA含量少, 效率较低。根、茎、叶中可比对出的已知miRNA序列分别只有39、25和17条。而利用一步法提取的miRNA效果良好, 根、茎、叶中可比对出的已知miRNA序列分别达到172、93和354条(表1)。将一步法提取的经高通量测序所得的蒙古黄芪miRNA数据分别与大豆和苜蓿miRNA数据库进行比对, 获得相匹配的miRNA条数为大豆中164、78、164条, 苜蓿中150、64、110条。将两种方法的结果进行比较, 一步法所测得的数据是多步法的近4倍, 并且包含了多步法测得的全部数据。

表1 高通量测序数据与miRBase中已知miRNA比对所得两种方法中已知miRNA条数

Table 1 The deep sequencing result of two methods which were aligned with the mature sequences of all Viridiplantae miRNAs in miRBase

组织	已知miRNA条数	
	一步法	多步法
根	172	39
茎	93	25
叶	354	17

2 两种提取方法的综合比较

通过对两种方法的综合比较(表2), 我们可以发现一步法与多步法分别存在各自的优缺点: 一步法提取的miRNA单位含量约为多步法的1.5倍; 在操作时间上一步法的用时仅为多步法的1/4, 操作步骤及所需器材均大幅度简略; 在提取质量方面, 一步法的OD₂₆₀/OD₂₈₀比值略高于多步法, 表明

提取的RNA纯度更高; 二者在价格方面相差不多, 提取单个样品的miRNA价格均在50元左右。在实验过程中, 一步法操作所需的实验条件极为严苛, 在实验过程中必须严格控制实验用品与外界的接触, 需勤换实验手套确保无RNA酶干扰实验结果; 同时在2次加入无水乙醇的步骤中, 需要准确量取转移液的体积, 计算无水乙醇的加入量, 如误差较大则会严重影响miRNA的提取数量和质量; 多步法虽步骤繁琐但所需条件并不严苛, 与一步法相比实验成功率更高。以10次实验的数据结果来看, 一步法成功率仅为30%, 多步法则为80%; 一步法获得的结果仅为片段在200 nt以下的小RNA, 而多步法的第一步为提取实验材料的总RNA, 亦可应用于多类其他实验, 例如mRNA的克隆等。总结而言, 一步法与多步法均存在不同优缺点, 一步法优点在于步骤简单、节省时间和实验资源, 小RNA提取数量多、完整性好, 实验结果可信度高; 缺点在于实验过程对操作条件要求十分严格, 从而导致实验的成功率不高; 多步法的优点在于对整个实验过程的操作条件要求较为宽松, 从而使得提取成功率更高, 第一步总RNA的提取产物亦可应用于其他实验, 拓展性强; 缺点在于实验步骤繁琐, 所需实验仪器及实验耗材较多, 耗费时间, 且最后收集产物中miRNA种类数量较少, 可参考数据量有限。

讨 论

蒙古黄芪为中医药中常用的名贵药材, 含多种黄酮类及多糖类化合物、氨基酸和微量元素。在提取miRNA的过程中, 微量的内源或外源RNA酶就会使miRNA降解, 而且细胞水溶性次生代谢物

表2 一步法与多步法综合比较

Table 2 Comprehensive comparison between one-step and multi-step

类别	一步法	多步法
提取价格/元·样品 ⁻¹	约50	约50
提取时间/h	2	8~9
提取miRNA含量检测/ng·μL ⁻¹	360	240
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ 比值	1.92	1.89
提取成功率/%	30	80
实验条件要求	极为严格	严格
优点	步骤简单、省时快捷, 提取结果完整性高	成功率高、第一步提取产物可应用于多类实验
缺点	实验条件严格导致成功率低	步骤繁琐、耗时

如多糖、多酚等在提取过程中易与RNA结合形成粘稠难溶的胶状物而导致miRNA的大量损失,或与RNA形成褐色复合物导致RNA完全丧失生物活性(赵成萍等2012)。随着近年来对miRNA研究的逐渐深入,miRNA实验相关的技术和工具也越来越多。本文中提到的两种方法相比而言,多步法属于miRNA研究中早期广泛应用的一种方法,采用快速回收细胞或者组织样本中的总RNA,包括miRNA,再对小RNA进行富集和纯化;一步法则是技术不断改进的产物,首先用变性裂解液裂解样品,稳定RNA,随后用氯仿来萃取,再通过改良的玻璃纤维滤膜来进行纯化,由于一步法快捷省时,省去了繁琐耗时的步骤,提取效率更高,应用也愈加广泛。

在本实验中我们采用了多种方法来检验提取效果,对于miRNA结果检测来说,测OD₂₆₀/OD₂₈₀值是最常用的方法,但该方法准确性不足,可靠性不够。Agilent 2100 Bioanalyzer也是一类常用的工具(Weber等2010; Taylor和Gercel-Taylor 2008; Tissot 2008),该生物分析仪具备了微量、快速、自动化的特点,只需1 μL的样品量和手工上样,无需更多操作。近来最引人注目的检测方案是RNA Integri-

ty number (RIN) (Mueller等2004),作为安捷伦特有的专利,用来检测RNA完整性指数,它能够全面考虑各项影响RNA质量的因素,最后经专利函数计算得出。目前已有80%以上的用户将其视为RNA质控标准,它正逐步扩展成为全球公认的RNA质控金标准,相信未来会得到更多人的青睐。

参考文献

- 刘星塔, 喻正坤(1995). 黄芪成分和药理活性研究进展. 上海医药, (2): 23~28
- 赵成萍, 雷万钧, 刘亚令, 梁建萍(2012). 两种膜荚黄芪DNA提取方法的优化和比较. 植物生理与生物技术, 18: 5~8
- Mueller O, Lightfoot S, Schroeder A (2004). RNA integrity number (RIN)—Standardization of RNA quality control. Agilent Application Note. Waldbronn, Germany: Agilent Technologies, 1~8
- Taylor DD, Gercel-Taylor C (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecolo Oncol*, 110: 13~21
- Tissot C (2008). Analysis of miRNA content in total RNA preparations using the Agilent 2100 bioanalyzer. Agilent Technologies. Palo Alto, Calif, USA, <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-7870EN.pdf>
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Wang K (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chem*, 56: 1733~1741