

微生物 DNA、RNA 和蛋白质共提取方法

A Method for Co-extraction of Microbial DNA, RNA, and Protein

刘思佳¹, 赵圣国^{1,*}

¹ 动物营养学国家重点实验室, 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京

*通讯作者邮箱: zhaoshengguo@caas.cn

摘要: 基因组、转录组和蛋白组等多组学关联分析对研究微生物群落结构组成与变化、功能特征及其与宿主表型关联等具有重要意义。多组学分析有必要对样本 DNA、RNA 和蛋白质进行共提取, 用于后续测序或质谱测定, 这将大大减少试验样品误差和减少珍贵样品用量。本文利用 TRIZOL 试剂可以将 DNA、RNA 和蛋白质分层的原理, 同时提取微生物的这三种生物大分子物质, 具有简便快捷、引入误差少的优势。

关键词: 微生物, DNA, RNA, 蛋白质, 共提取

材料与试剂

1. 50 ml 离心管 (D/RNase-Free) (TIANGEN, catalog number: CT-002-50-01)
2. 15 ml 离心管 (D/RNase-Free) (TIANGEN, catalog number: CT-002-15-01)
3. 1.5 ml 离心管 (D/RNase-Free) (TIANGEN, catalog number: HC117-02)
4. TRIZOL (Invitrogen, catalog number: 15596018)
5. 三氯甲烷 (Dr. Ehrenstorfe, catalog number: L17739500ME)
6. 异丙醇 (国药, catalog number: 8010921801)
7. 无水乙醇 (国药, catalog number: 1000925901)
8. DNase I (TaKaRa, catalog number: 2212)
9. RNase Inhibitor (Takara, catalog number: 2313A)
10. DEPC H₂O (Invitrogen, catalog number: 750024)
11. 10× PCR buffer (Sigma-Aldrich, catalog number: 11699121001)
12. dNTP mixture (10 mM) (Takara, catalog number: 4019)
13. Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, catalog number: 10966018)

14. 柠檬酸钠 (Sigma-Aldrich, catalog number: 71402-250G)
15. NaOH (Sigma-Aldrich, catalog number: S5881-1kg)
16. 盐酸胍 (生工, catalog number: A510243-0100)
17. SDS (Macklin, catalog number: S817788-100g)
18. 超纯水 (D/RNase-free) (BI, catalog number: 01-866-1B)
19. RNA 纯化试剂盒 (TIANGEN, catalog number: DP412)
20. Bradford 蛋白定量试剂盒 (Bestbio, catalog number: BB-3411)

仪器设备

1. 全自动冷冻研磨仪 (德国 RETSCH, catalog number: Cryomill)
2. 生物分析仪 (Agilent Technologies, catalog number: 2100)
3. 涡旋震荡仪 (Scientific Industries, catalog number: vortex-genie2T)
4. 离心机 (SIGMA, catalog number: 3-18k)
5. 水浴锅 (TIANDZ, catalog number: DZKW-S-6)
6. NanoDrop™ 光谱仪 (Thermo Scientific, catalog number: 2000)
7. Qubit 荧光定量仪 (Invitrogen, catalog number: 2.0)
8. 电泳仪 (Bio-Rad, catalog number: CHEF Mapper)
9. PCR 仪 (Thermofisher, catalog number: Veriti 96-Well Thermal Cycler)

实验步骤

一、样品前处理

1. 采集微生物样品, 置于液氮保存。
2. 取约 5 ml (或 5 g) 液氮冻存的微生物样品, 置于研磨罐 (50 ml) 中, 加入 1 颗 20 mm 和 10 颗 5 mm 钢珠, 利用全自动冷冻研磨仪在振动频率为 30 Hz 条件下研磨 5 min, 研磨完成后取出置于 50 ml 离心管。
3. 加入 5 ml TRIZOL 溶液充分混匀, 室温放置 5 min。
4. 加入 0.2 倍体积的三氯甲烷溶液, 涡旋混匀 15 s, 放置 3 min 后离心 (12,000 × g, 4 °C, 15 min)。离心后分为三层, 上层为 RNA, 中层为蛋白质, 下层为 DNA。

59

60 二、总 RNA 提取^[1,2,3]

- 61 1. 取上层水相 RNA 到新的 50 ml 离心管 (RNase-Free) 中,加入等体积预冷异丙醇,
62 颠倒混匀,室温放置 10 min,或-20 °C 放置 1 h,离心 (12,000 × g, 4 °C, 15 min)。
- 63 2. 弃上清,添加与异丙醇等量的预冷 75%乙醇,使用移液枪轻轻将整块沉淀吹起悬浮,
64 离心 (7,500 × g, 4 °C, 10 min),弃乙醇溶液。
- 65 3. 在室温放置 5-10 min,直至干燥。
- 66 4. 加入 100 μl 超纯水 (RNase-free),水浴 (55-60 °C) 10-15 min,促进 RNA 溶解。
- 67 5. 利用 RNA 纯化试剂盒纯化,去除无机离子等杂质,按说明书操作。
- 68 6. DNase I (RNase-free) 消化去除 RNA 溶液中 gDNA,反应体系为 20 μl RNA 溶液,
69 5 μl 10× DNase I Buffer, 2 μl DNase I, 0.5 μl RNase Inhibitor, 22.5 μl DEPC H₂O。
70 37 °C 孵育 25 min。
- 71 7. 利用 RNA 纯化试剂盒纯化,去除 DNase I 以及 gDNA 消化物,得到纯净的 RNA
72 溶液。
- 73 8. 利用细菌通用引物 27F 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R 5'-
74 GGTTACCTTGTACGACTT-3' 检测 RNA 溶液中是否有 gDNA 残留。PCR 反应
75 体系为 25 μl,包括: 2.5 μl 10x PCR buffer, 0.5 μl dNTP mixture, 1 μl 27F 引物
76 (10 μM), 1 μl 1492R 引物 (10 μM), 0.25 μl Platinum Taq DNA polymerase, 1 μl
77 RNA 溶液, 18.75 μl 超纯水;反应程序为: 首先 94 °C 5 min,随后 94 °C 30 s,
78 54°C 30 s, 72 °C 1 min 30 s 35 个循环,最后 72 °C 10 min。利用 1%琼脂糖凝
79 胶电泳对 PCR 产物进行检测。
- 80 9. 使用生物分析仪检测 RNA 浓度和完整性。
- 81 10. RNA 样品置于-80 °C 保存。

82

83 三、总 DNA 提取

- 84 1. 取中间层和下层溶液,加入 0.3 倍 TRIZOL 体积的无水乙醇,颠倒混匀,室温静置
85 3 min,离心 (2,000 × g, 5 min)。将上清液保存到新的 50 ml 离心管中 (用于蛋白
86 质的分离)。
- 87 2. 在沉淀中加入与 TRIZOL 等体积的 0.1 M 的柠檬酸钠溶液,室温静置 30 min,离心

(2,000 × g, 4 °C, 5 min), 弃上清。重复该步骤一次。

3. 室温放置 10 min, 干燥 DNA。

4. 加入 50-100 µl 8 mM NaOH 溶液, 混匀重悬 DNA。

5. 利用 NanoDrop™ 光谱仪、Qubit 荧光定量仪对 DNA 质量和浓度检测, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 DNA 完整性进行检测。

6. DNA 样品置于 -20 °C 或 -80 °C 保存。

四、总蛋白质提取^[4]

1. 取步骤三 (1) 中的上清液, 加入 1.5 倍 TRIZOL 体积的异丙醇, 室温静置 10 min, 离心 (12,000 × g, 4 °C, 10 min)。

2. 弃上清, 加入 2 倍 TRIZOL 体积的 0.3 M 盐酸胍溶液, 室温静置 20 min, 离心 (7,500 × g, 4 °C, 10 min), 弃上清。此步骤重复 3 次。

3. 加入 2 倍 TRIZOL 体积的无水乙醇, 涡旋混匀, 室温静置 20 min, 离心 (7,500 × g, 4 °C, 10 min), 弃上清。

4. 室温干燥 10 min, 重悬于 1% SDS 溶液, 50 °C 孵育 10 min。

5. 利用 Bradford 蛋白定量试剂盒检测蛋白质浓度。

6. 蛋白质样品置于 -20 °C 或 -80 °C 保存。

溶液配方

1. 0.1 M 柠檬酸钠溶液: 25.807 g 柠檬酸钠, 用 10% 乙醇溶液定容至 1000 ml。

2. 10% 乙醇溶液: 10 ml 无水乙醇, 用超纯水定容至 100 ml。

3. 0.8 mM NaOH 溶液: 0.032 g NaOH, 用超纯水定容至 1000 ml。

4. 0.3 M 盐酸胍溶液: 28.659 g 盐酸胍, 用 95% 乙醇定容至 1000 ml。

5. 95% 乙醇溶液: 95 ml 无水乙醇, 用超纯水定容至 100 ml。

6. 1% SDS 溶液: 1 g SDS, 用超纯水定容至 100 ml。

7. 75% 乙醇溶液: 75 ml 无水乙醇, 用超纯水定容至 100 ml。

致谢

感谢中国农业科学院创新工程支持

参考文献

1. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). [Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.](#) *Anal Biochem* 162: 156-159.
2. Liu, S., Zheng, N., Zhao, S. G. and Wang, J. Q. (2020). [Exploring the diversity of active ureolytic bacteria in the rumen by comparison of cDNA and gDNA.](#) *Animals* 10: 2162.
3. 刘思佳, 赵圣国, 郑楠, 王加启. (2020). [瘤胃微生物 RNA 提取中样品前处理方法的优化.](#) *微生物学杂志* 40(1): 88-93.
4. Hummon, A. B., Lim S. R., Difilippantonio, M. J. and Ried, T. (2007). [Isolation and solubilization of proteins after TRIzol® extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage.](#) *Biotechniques* 42: 467-472.