

[10] Schuettz P, Chiappa V, Briel M, et al. Procalcitonin algorithms for antibiotic therapy decisions[J]. Arch Intern Med, 2011, 171(15): 1322-1331.

[11] Bouadma L, Luyt CE, Tubach F, et al. Use of procalcitonin to reduce patients' exposure to antibiotics in intensive care units (PRORATA trial): a multicentre randomised controlled trial[J]. Lancet, 2010, 375(9713): 463-474.

[12] Albrich CW, Dusemund F, Bucher B, et al. Effectiveness and safety of procalcitonin-guided antibiotic therapy in lower respiratory tract infections in real life[J]. Arch Intern Med, 2012, 172(9): 715-722.

[13] Ruiz-Esteban R, Relea Sarabia P, Garcia Delgado E, et al. Procalcitonin and C-reactive protein levels as diagnostic tools in febrile patients admitted to a General Internal Medicine ward[J]. Clin Biochem, 2012, 45(1/2): 22-25.

[14] Viallon A, Desseigne N, Marjollet OA, et al. Meningitis in adult patients with a negative direct cerebrospinal fluid examination: value of cytochemical markers for differential diagnosis[J]. Critical Care, 2011, 15(3): 136.

[15] Berg P, Lindhardt BO. The role of procalcitonin in adult patients with community-acquired pneumonia-a systematic review[J]. Dan Med J, 2012, 59(3): 4357.

[16] Müller F, Christ-Crain M, Bregenzer T, et al. Procalcitonin levels predict bacteremia in patients with community-acquired pneumonia[J]. Chest, 2010, 138(1): 121-129.

[17] Halim EI, Attia A, Zytoun T, et al. The diagnostic and prognostic value of serum procalcitonin among ventilator associated pneumonia patients[J]. OJRD, 2013, 3(2): 73-78.

[18] Seligman R, Santos Seligman BG, Zimmermann Teixeira PJ. Comparing the accuracy of predictors of mortality in ventilator-associated pneumonia[J]. J Bras Pneumol, 2011, 37(4): 495-503.

[19] Charles PE, Kus E, Aho S, et al. Serum procalcitonin for the early recognition of nosocomial infection in the critically ill patients: a preliminary report[J]. BMC Infect Dis, 2009, 9(1): 49.

[20] van Nieuwkoop C, Bonten TN, van't Wout JW, et al. Procalcitonin reflects bacteremia and bacterial load in urosepsis syndrome: a prospective observational study[J]. Crit Care, 2010, 14(6): 206.

[21] Budkevich LI, Lecmanov AU, Kolokolchikova EG, et al. Comparing the morphological changes in burn wound tissues and the procalcitonin concentration[J]. Int J Bio Med, 2013, 3(1): 23-26.

[22] Kim MH, Lim G, Kang SY, et al. Utility of procalcitonin as an early diagnostic marker of bacteremia in patients with acute fever[J]. Yonsei Med J, 2011, 52(2): 276-281.

[23] Begja-Lika A, Buló-Kasneji A, Refatllari E, et al. Serum procalcitonine levels as an early diagnostic indicator of sepsis[J]. Mater Sociomed, 2013, 25(1): 23-25.

[24] Schuetz P, Haubitze S, Mueller B. Do sepsis biomarkers in the emergency room allow transition from bundled sepsis care to personalized patient care[J]. Curr Opin Crit Care, 2012, 18(4): 328-354.

[25] Ruiz-Rodriguez JC, Caballero J, Ruiz-Sanmartin A, et al. Usefulness of procalcitonin clearance as a prognostic biomarker in septic shock. A prospective pilot study[J]. Med Intensiva, 2012, 36(7): 475-480.

[26] Christ-Crain M, Stolz D, Bingisser R, et al. Procalcitonin guidance of antibiotic therapy in community-acquired pneumonia: a randomized trial[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 174(1): 84-93.

[27] Schuetz P, Christ-Crain M, Thomann R, et al. Effect of procalcitonin-based guidelines vs standard guidelines on antibiotic use in lower respiratory tract infections: the ProHOSP randomized controlled trial[J]. JAMA, 2009, 302(10): 1059-1066.

[28] Maravic-Stojkovic V, Lausevic-Vuk L, Jovic MA, et al. Procalcitonin-Based therapeutic strategy to reduce antibiotic use in patients after cardiac surgery: a randomized controlled trial[J]. Srp Arh Celok Lek, 2011, 139(11/12): 736-742.

(收稿日期: 2014-11-12)

• 综 述 •

细菌生物膜 RNA 提取方法研究

辛运超¹综述, 张玉妥¹, 尚小颖^{2△}审核

(1. 河北北方学院病原生物与免疫学研究所, 河北张家口 075000; 2. 河北北方学院附属第一医院耳鼻咽喉头颈外科, 河北张家口 075000)

关键词: 细菌; 生物膜; 总 RNA; 提取方法

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 02. 044

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)02-0244-03

高纯度和完整性好的 RNA 提取是微生物分子生物学研究的重要前提^[1]。RNA 提取即将细胞破碎裂解, 利用相关试剂去除多糖、酚类、蛋白质及 DNA 等的污染, 通过一系列的抽提、洗涤和沉淀, 最终获得纯净 RNA^[2]。细菌生物膜可被形容为包裹在细菌表面的一层由糖和蛋白质等构成的厚厚的、黏性屏障^[3], 且这些胞外聚合物约占其总生物量的 90%^[4], 严重影响细菌细胞裂解, 干扰核酸提取和纯化, 增加了 RNA 提取的难度^[5]。相比动植物的真核细胞, 细菌的 RNA 水平较低, 半衰期短, 没有 5' 帽子结构和 3' Poly(A) 尾巴结构, 在提取过程中很容易降解。本文从目前国内外细菌生物膜总 RNA 的提

取方法的种类、产物分析及常见问题等方面对细菌生物膜 RNA 提取方法研究展开综述。

1 常用的细菌生物膜总 RNA 提取方法及特点

1.1 强变性剂法 强变性剂法常采用胍盐等强蛋白变性剂提取细菌生物膜总 RNA。异硫氰酸胍、盐酸胍、饱和酚等都是强烈的蛋白变性剂, 能有效地解离核蛋白与核酸的复合体, 抑制 RNA 酶活性。在 β-巯基乙醇、N-月桂酰肌氨酸钠等的协同作用下, 高浓度的胍盐能强烈抑制 RNA 酶的活性, 可从胰腺等富含 RNA 酶的组织细胞中分离出完整的 RNA。强变性剂法可用于大多数细菌生物膜总 RNA 的提取, 其优点在于强烈的蛋

白变性剂可对细菌生物膜本身及提取液中 RNA 酶的活性起到最佳的抑制效果^[6]。

1.2 Trizol 试剂快速提取法 Trizol 是一种新型的总 RNA 提取试剂,可直接从细胞或组织中提取高质量的总 RNA。1987 年 Chomczynski 和 Sacchi 提出“硫氰酸胍-酚氯仿一步法”,一些试剂公司通过对这一技术的改良,建立了 Trizol 试剂快速提取法。其包括苯酚、胍盐等强变性剂,具有快速裂解细胞,抑制内源 RNA 酶,沉淀蛋白及消化残余的 DNA 等作用,能最大程度保持 RNA 的完整性^[7]。可用于铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌等细菌生物膜的总 RNA 提取,能获得较纯净的产物^[8-9]。具有提取快速、高效,总 RNA 产物纯度高, DNA 和蛋白质污染少等优点。此外, Trizol 试剂还可促进不同种属、不同相对分子质量的多种 RNA 析出。

1.3 热硼酸盐法及改良热硼酸盐法 热硼酸盐法将硼酸盐缓冲体系、蛋白酶 K 消化蛋白和氯化锂选择性沉淀 RNA 等步骤偶联在一起,大大简化了 RNA 的提取过程。硼酸与酚类化合物形成复合物,二硫苏糖醇,聚乙烯吡咯烷酮与酚类化合物形成复合物,这几种物质均可抑制细菌生物膜中酚类物质的氧化及其与 RNA 的结合,通过锂离子沉淀剩余的多糖和酚类物质,从而使其最大限度地与 RNA 分离^[10]。改良热硼酸盐法在原热硼酸盐法的基础上加入一些提取辅助剂,并根据其特性调整提取步骤,进一步提高了总 RNA 产量和质量。

1.4 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法 CTAB 是一种阳离子表面活性剂,具有从低离子强度溶液中沉淀核酸与酸性多聚糖的特性。较高浓度的 CTAB 可以有效地裂解细菌的细胞壁,沉淀核酸和酸性多聚糖,而与 β -巯基乙醇共同作用可使蛋白变性、抑制 RNA 酶活性。作为 RNA 提取变性剂,CTAB 比强变性剂法的异硫氰酸胍和改良热硼酸盐法的十二烷基硫酸钠(SDS)更有效^[11]。CTAB 法是植物 DNA 提取的经典方法,之后用于 RNA 的提取中,改良后的 CTAB 法用于细菌生物膜总 RNA 的提取具有重复性好,简单易行,成本低等优点。

1.5 十二烷基硫酸钠-酸性酚(SDS-Phenol)法 SDS 可使核蛋白与核酸复合物分离,苯酚(Phenol)能够快速使蛋白质变性。加入 β -巯基乙醇做还原剂,可避免酚类物质的氧化,减少其对 RNA 分离纯化的影响^[12]。SDS-Phenol 法可用来提取大量细菌的 RNA,改良的 SDS-Phenol 法也适用细菌生物膜总 RNA 提取。SDS-phenol 法在抑制 RNA 酶的同时,使蛋白质等变性,提取的总 RNA 产量高,完整性好,纯度高,且操作简单,无需超速离心和多次酚-氯仿抽提^[13],是一种快速、高效的总 RNA 提取方法。

2 常用的细菌生物膜总 RNA 提取试剂盒

随着实验技术的进步,国内外试剂公司开发出很多便于提取细菌生物膜 RNA 的试剂盒。Takara 公司的 RNAiso Plus 是广谱型总 RNA 提取试剂盒,颜色鲜明,便于分层,采用了独特的细胞裂解系统,无需苯酚氯仿抽提等步骤,实验操作方便快捷,可以从动物组织、植物材料、培养细胞、细菌及生物膜中提取总 RNA。MP Biomedicals 公司的 FastRNA Pro Blue 试剂盒用于从革兰氏阳性和阴性菌生物膜中高效分离 RNA,裂解释放出的 RNA 用 RNAproTM 处理纯化,保证了 RNA 的质量,其配合 FastPrep 仪,可使样品的裂解处理更快、重复性更好。Invitrogen 公司的 Trizol 总 RNA 提取试剂盒是一步法苯酚和异硫氰酸胍解决方案,较传统 Trizol 法更快捷、高效,且较好地保持了 RNA 的完整性;加入氯仿离心后,裂解液分离成水相和有机相, RNA 存在于水相,通过异丙醇沉淀回收^[14]。

此外, Omega 公司的细菌 RNA 小量提取试剂盒(Bacteria RNAkit)以及高纯度 RNA 抽提试剂盒(HPtotal RNAkit); Qiagen 公司的 RNeasy Protect Bacteria Mini Kits 以及 Pure-LinkTM RNA Mini Kit 等,都可以从细菌及生物膜中快速、高效地提取出总 RNA^[15]。国内,上海生工 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒,北京天根 RNAprep pure Cell/Bacteria Kit 试剂盒等国内产品亦可提取较高质量的细菌生物膜总 RNA。

使用试剂盒法提取细菌生物膜总 RNA 方便、快捷,能较好地防止 RNA 酶的污染,获得较高纯度和浓度的 RNA。但其产量相对较低,费用较高,不适用于实验室大样本细菌生物膜总 RNA 的提取,且不同的试剂盒提取结果存在较大差异。如 FastRNA Pro Blue 试剂盒是表皮葡萄球菌生物膜总 RNA 提取的最佳选择^[16]; PureLinkTM RNA 试剂盒则在大肠杆菌生物膜总 RNA 提取中有明显优势^[17]。因此,在提取不同标本细菌生物膜总 RNA 时,应注意试剂盒的选择。

3 总 RNA 提取后分子生物学分析

总 RNA 提取后浓度、纯度及完整性的分析是以 RNA 为对象的研究必要步骤。目前,最常用的浓度与纯度检测方法是用紫外分光光度计测量样品 RNA 在波长 260 nm 和 280 nm 处的吸光度(OD)值,依据 Beer-Lambert 定律计算出核酸浓度。260 nm 和 280 nm 处 OD 值比值(A₂₆₀/A₂₈₀)可用来评估 RNA 的浓度和纯度,1.0 的 A₂₆₀ 读数相当于 40 μ g/mL 的单链 RNA, A₂₆₀/A₂₈₀ 比值为 1.8~2.1,表示样品是高度纯化的 RNA。微量、超微量紫外分光光度计能检测 0.3~2.0 μ L 样品 RNA 的浓度与纯度,并可同时生成光谱线性曲线,使测量更加方便、快捷,且灵敏度较高。普通的琼脂糖凝胶电泳也可根据条带的亮度粗略判断 RNA 的纯度和浓度,但更侧重于完整性的分析。如能观察到 23S、16S 和 5S rRNA 的条带,便可说明提取成功;如其中 23S rRNA 的条带亮度为 16S rRNA 的 2 倍,且无拖带现象,则表明所提取的 RNA 基本无降解,完整性好^[18]。另外,某些荧光染料,如 Quant-ITTM RIBOGREEN RNA 试剂,能结合核酸使荧光大大增强,配合荧光酶标仪可准确地定量 1 ng/mL 浓度的样品 RNA^[19]; Aligent 公司的 2100 Bioanalyzer,采用微量流控和毛细管电泳技术处理结合了荧光染料的样品核酸,可精确分析样品浓度和纯度,同时自动生成凝胶电泳图像,提供样本完整性的信息。

4 总 RNA 提取过程中的常见问题及解决方法

4.1 RNA 酶污染 RNA 酶污染是 RNA 提取过程中的常见问题,也影响着细菌生物膜总 RNA 的提取。RNA 酶广泛存在而稳定,一般反应不需要辅助因子,因此 RNA 制剂中少量的 RNA 酶便会引起 RNA 在制备与分析过程中的降解。RNA 酶的污染可分为内源性和外源性 RNA 酶污染。内源性 RNA 酶来自样本细胞内部,在细菌细胞壁破裂后释放,当 RNA 酶抑制剂失效、用量不足、样品量过多或匀浆时温度过高时,未灭活的 RNA 酶可迅速降解 RNA,影响 RNA 的提取质量。适量的 RNA 酶抑制剂、RNA 稳定剂及低温下的熟练操作一般可克服内源性 RNA 酶带来的影响,最大程度地提高总 RNA 的提取质量。导致 RNA 酶污染的主要来源为实验试剂、器械及实验室内环境。因此,实验中所有的玻璃器皿均应该经高温干烤处理,塑料器皿以焦碳酸二乙酯(DEPC)水浸泡处理;操作中使

用无 RNA 酶的吸头、试管,以高压灭菌后的 DEPC 水配制溶液^[20];操作人员戴一次性口罩、帽子、手套,且操作中手套要经常更换;实验中,打开和关闭离心管以及取枪头时均用长柄镊子,镊子在使用前经酒精擦拭并在酒精灯上烧过消毒等。相关

文献报道,采用氯仿处理实验器皿、耗材和水也可降低外源性 RNA 酶对 RNA 的降解作用^[21]。

4.2 总 RNA 产量低 由于细菌 RNA 具有水平低,半衰期短,易降解等特点,其 RNA 的提取产量较低。细菌生物膜胞外存在大量的多糖等聚合物,这些胞外聚合物的高浓度复合和富含带负电荷的多糖能够严重干扰 RNA 的提取和后续反转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR)的进行^[22]。因而,为获取高质量的不同细菌生物膜总 RNA,前期样品的处理、提取方法及试剂盒的选择尤为重要。提取细菌总 RNA 时,样品细菌应处在对数生长期,菌量充足,且需要溶菌酶的消化来实现彻底的细胞裂解和最大限度的 RNA 回收。提取细菌生物膜总 RNA 时,将样品经缓冲液冲洗、超声震荡、低温离心处理有助于胞外聚合物的去除,提高 RNA 提取质量,且对于细胞活力基本无影响^[23]。有研究显示,与玻璃珠法、超声破碎法和液氮研磨法比较,热酸性酚法对提取白色念珠菌早期生物膜总 RNA 提取有较好的效果^[24];经超声震荡,缓冲液(50 mmol/L 醋酸钠缓冲液,10 mmol/L 乙二酸四乙酸和 1% SDS; pH 值 5.0)处理的变形链球菌及生物膜悬液,佐以氯仿处理,可获得较高浓度、纯度的总 RNA^[25];适量溶菌酶充分作用后的葡萄球菌生物膜总 RNA 的提取产量可增加 2~4 倍^[26]。

5 小 结

RNA 的提取是分子生物学研究的基础。从细菌生物膜等富含胞外聚合物的样本中分离和纯化 RNA 非常困难。这些聚合物与核酸结合,抑制了 RNA 的转译活性,干扰了 DNA 酶的活性。因此,寻找从细菌生物膜中稳定获得高质量 RNA 的提取方法,对于细菌生物膜后继以 RNA 为对象的分子生物学研究具有重要的价值。

目前,国内外用于提取总 RNA 的技术方法大致分为四类:有机提取方法,柱式篮格式脱水法,磁粉法和直接裂解法。四类方法都可用于提取高质量的 RNA,且大多数被开发成商业的试剂盒,简化了分子生物学的提取工艺^[27],在用于提取细菌生物膜总 RNA 时,要注意根据其特性择优选择。相信随着科学技术的发展,细菌生物膜总 RNA 的提取方法将会越来越方便、快捷、高效。

参考文献

- [1] Ares M. Bacterial RNA isolation[J]. Cold Spring Harbor Protoc, 2012(9):1024-1027.
- [2] Li JH, Tang CH, Song CY, et al. A simple, rapid and effective method for total RNA extraction from *Lentinula edodes*[J]. Biotechnol Lett, 2006, 28(15):1193-1197.
- [3] Phillips PL, Wolcott RD, Fletcher J, et al. Biofilms made easy[J]. Eoun Int, 2010, 1(3):1-6.
- [4] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix[J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(9):623-633.
- [5] Junttila S, Lim KJ, Rudd S. Optimization and comparison of different methods for RNA isolation for cDNA library construction from the reindeer lichen *Cladonia rangiferina*[J]. BMC Res Notes, 2009, 2(1):204.
- [6] 刘华,申天琳,李学坤,等.土壤 RNA 提取方法研究进展[J].应用与环境生物学报,2011,17(6):918-922.
- [7] 吴凯朝,黄诚梅,李杨瑞,等. Trizol 试剂法快速高效提取 3 种作物不同组织总 RNA[J]. 南方农业学报,2012,43(12):1934-1939.
- [8] 廖欣,余加林,艾青. 氨溴索对表皮葡萄球菌生物被膜胞间多糖黏附素及其调控基因作用的体外研究[J]. 中国抗生素杂志,2013,

38(11):876-879.

- [9] 孙小敏,余加林,林丽华,等. 氨溴索对铜绿假单胞菌生物膜密度感应系统信号分子及相关基因的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(16):1559-1562.
- [10] 王暑辉,徐倩,徐筱,等. 富含多糖多酚的侧柏叶片总 RNA 提取方法[J]. 吉林农业大学学报,2012,34(1):76-80.
- [11] 左欣欣,陈泽宇,马腾. 从动物组织中提取总 RNA 的 CTAB 法[J]. 中国西部科技,2011,10(2):35-36.
- [12] Wang Y, Hayatsu M, Fujii T. Extraction of bacterial RNA from soil: challenges and solutions[J]. Microbes Environ, 2012, 27(2): 111-121.
- [13] Vomelová I, Vaníková Z, Sedo A. methods of RNA purification. all ways (should) Lead to Rome[J]. Folia Biol (Praha), 2009, 55(6):243-251.
- [14] Stead M, Agrawal A, Bowden K, et al. RNAsnapTM: a rapid, quantitative and inexpensive, method for isolating total RNA from bacteria[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(20):156.
- [15] 邹晓蕾,刘礼崔,罗立新. 细菌总 RNA 提取方法的比较[J]. 现代食品科技,2013,29(8):1948-1954.
- [16] Franca A, Melo LD, Cerca N. Comparison of RNA extraction methods from biofilm samples of *Staphylococcus epidermidis*[J]. BMC Res Notes, 2011, 4(1):572.
- [17] Franca A, Bento JC, cerca N. variability of RNA quality extracted from biofilms of foodborne pathogens using different kits impacts mRNA quantification by qPCR[J]. Curr Microbiol, 2012, 65(1): 54-59.
- [18] Di Cello F, Xie Y, Paul-Satyaseela M, et al. Approaches bacterial RNA isolation and purification for microarray analysis of *Escherichia coli* K1 interaction with human brain microvascular endothelial cells[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8):4197-4199.
- [19] 陈星,潘迎捷,孙晓红,等. 细菌总 RNA 提取方法的研究进展[J]. 湖南农业科学,2010,40(3):9-11.
- [20] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社,2002:582-585.
- [21] 李银聚,张春杰. 适宜于实验教学的动物组织总 RNA 提取的操作方法[J]. 河南农业科学,2010,39(8):140-142.
- [22] Radstrom P, Knutsson R, Wolffs P, et al. Pre-PCR processing: Strategies to generate PCR compatible samples[J]. Mol Biotechnol, 2007(26):133-146.
- [23] Cerca F, Andrade F, Franca A, et al. *Staphylococcus epidermidis* biofilms with higher proportions of dormant bacteria induce a lower activation of murine macrophages [J]. J Med Microbiol, 2011, 60(12):1717-1724.
- [24] 张琰,马鸣,虞丽华,等. 改良热酸性酚法提取白色念珠菌早期生物膜总 RNA 的研究[J]. 口腔生物医学,2010,1(2):65-67.
- [25] Cury JA, Seils J, Koo H. Isolation and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* in suspension cultures and biofilms [J]. Braz Oral Res, 2008, 22(3):216-222.
- [26] Franca A, Freitas A, Henriques AF, et al. Optimizing a qPCR gene expression quantification assay for *S. epidermidis* biofilms: a comparison between commol/Lercial kits and a customized protocol[J]. PLoS One, 2012, 7(5):37480.
- [27] Hanz GM, Jung B, Giesbertz A, et al. Sequence-specific labeling of nucleic acids and proteins with methyltransferases and cofactor analogues[J]. J Vis Exp, 2014, 22, (93):111-115.

(收稿日期:2014-11-28)