

# 一种适用于RT-PCR的杉树类植物中总RNA提取的方法

李菁芳, 黄劭毅, 田仁鹏, 张珞珍, 方呈祥\*

(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

**摘要:** 杉树类植物含大量的多糖、多酚类物质, 这使得此植物的总 RNA 提取较困难。研究通过比较几种有代表性的提取植物总 RNA 的方法, 建立了一种酸酚法和 PEG8000 沉淀法相结合的改良的 CTAB 法。此方法操作简单, 使用的试剂均为常规试剂, 成本低, 能够有效去除植物组织中多糖和多酚类等次生物质, 从而得到高质量的 RNA。使用这种改良的方法制备的总 RNA 产物对 P450 基因成功地进行了反转录聚合酶链式反应 (reverse transcriptase - polymerase chain reaction, RT-PCR), 证明此方法是一种适用于 RT-PCR 的杉树类植物组织中总 RNA 提取的方法。

**关键词:** 杉树类植物; RNA 提取; 次生物质; RT-PCR

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2004)06-0551-06

## An Improved Method Suited to Extract Total RNA Used to RT-PCR from Fir Plant

LI Jing-Fang, HUANG Shao-Yi, TIAN Ren-Peng, ZHANG Luo-Zhen, FANG Cheng-Xiang\*

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** Fir plants contain plenty of polysaccharides and polyphenols. Comparing several standard methods for extracting total RNA from fir plant, a modified method which can eliminate the interferences of polysaccharides and polyphenols in the plant tissues was constructed in the present study. The high-quality RNA sample obtained by the improved CTAB method used to RT-PCR (reverse transcriptase - polymerase chain reaction) of P450 gene study, and the result indicated that the method is easier for operation and is at lower cost.

**Key words:** Fir plants; RNA extraction; Secondary substance; RT-PCR

核糖核酸(RNA)是分子生物学研究的重要材料之一, 无论是 cDNA 文库的构建、Northern 杂交分析和分离基因, 还是研究基因的转录调控都需要高纯度且保持完整性的 RNA。反转录聚合酶链式反应 (reverse transcriptase - polymerase chain reaction, RT-PCR) 是一种从 RNA 扩增 cDNA 拷贝的方法。RT-PCR 对于获得与克隆 mRNA 的 5' 与 3' 末端序列以及用极少量的 mRNA 样品构建大容量的 cDNA 文库等方面都是极为灵敏的方法。此外, RT-PCR 还易于鉴定已转录的序列是否发生突变

及呈现多肽性; 还可用于测定基因表达的强度, 尤其是在可获得的 mRNA 数量有限以及目的基因表达水平很低时即用 RT-PCR 方法来分析<sup>[1]</sup>。获得高质量的总 RNA 是进行 RT-PCR 十分重要的基础步骤。从植物组织中制备 RNA 方法已有许多报道, 其中酸性酚-硫氰酸胍-氯仿法<sup>[1]</sup>、一步法<sup>[1]</sup>和苯酚法<sup>[2]</sup>等可用于绝大多数动植物组织中 RNA 的提取。不过, 许多植物包括杉树类植物中含有大量的多糖、胶质与酚类等次生物质, 用传统的方法来提取这些植物组织中的 RNA, 通常获得的 RNA 产量低、易降

收稿日期: 2004-01-19, 修回日期: 2004-05-09。

作者简介: 李菁芳(1976—), 女, 武汉大学生命科学学院硕士, 现从事植物 P450 基因的研究。

\* 通讯作者(Author for correspondence)。

解或不宜用于体外翻译。因此如何有效除去多糖、酚类和胶质等物质,而且尽量减少 RNA 的损失是分离这类植物组织中 RNA 的关键。

根据现有方法的特点以及杉树类植物材料的特殊性,我们选用几种不同的方法,从不同来源的杉树类植物组织中提取总 RNA,并进行 RT-PCR,以摸索出一种有效的适宜于 RT-PCR 杉树类植物总 RNA 的提取方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

东北红豆杉、水杉和南方红豆杉的幼嫩叶及茎尖于 2003 年 6 月中旬分别采自大连及中国科学院武汉植物园。采样后立即放入液氮中保藏备用。

### 1.2 实验方法

(1) **TRIZOL 法** TRIZOL 试剂购自 Invitrogen 公司,其 RNA 提取方法参照 Invitrogen 公司的试剂说明书,得到的总 RNA 溶于 100  $\mu$ L DEPC 水中。

(2) **乙二醇丁醚法** 参照文献[3]的方法进行。取 300 mg 的叶片,在液氮中迅速研成粉状,转入 10 mL 离心管中,加入 3.3 mL 抽提缓冲液(Tris · HCl 3 mL, pH8.0; 25% SDS 300  $\mu$ L;  $\beta$ -巯基乙醇 60  $\mu$ L),迅速振荡 1 min;加入 3.3 mL 酚/氯仿/异戊醇混合液(以 0.4 mol/L NaAc, pH4.0 饱和苯酚,然后与氯仿、异戊醇以 25 : 24 : 1 比例混合)振荡 1 min,收集上层水相,重复此过程,直至界面无白色蛋白层为止;加入 0.8 倍体积的异丙醇,混合均匀后于 -20°C 放置 30 min 后,经 10 000 g 4°C 离心 15 min;弃上清,沉淀物用 75% 乙醇洗 2 次,干燥后加入 300  $\mu$ L DEPC 水。待沉淀物溶解完后加入 12  $\mu$ L NaAc(2 mol/L, pH4.0),再加入 0.4 倍体积乙二醇丁醚,0°C 下放置 30 min;10 000 g 4°C 离心 10 min;移上清,弃沉淀,加入 1 倍体积乙二醇丁醚,混匀后 0°C 放置 30 min,10 000 g 4°C 离心 15 min;弃上清,沉淀物用 75% 乙醇淋洗 2 次后吹干,溶于 100  $\mu$ L DEPC 水中。

(3) **普通 CTAB 法** 参照文献[4]的方法。先在 3 mL 含 CTAB 的提取缓冲液中(2% CTAB; 100 mmol/L Tris · HCl, pH8.0; 1.4 mol/L NaCl; 20 mmol/L EDTA, pH8.0)加入 60  $\mu$ L 巯基乙醇,置 65°C 预热,再将 600 mg 经液氮研磨的叶片粉末放入其中,用力混匀后,置于 65°C 中保温 30 min(每 10 min 摆匀 1 次);然后取出样品,自然冷却至室温,用等体积氯仿/异戊醇混合液(24 : 1)抽提 2 次;加等体积酚/氯仿/异戊醇混合液(以 0.4 mol/L NaAc, pH4.0 来饱和苯酚,然后与氯仿、异戊醇以 25 : 24 : 1 比例混合)抽提至界面无白色蛋白层,4°C 10 000 g 离心 20 min;取上清,加入 4/5 体积的 13% (m/v) PEG8000 以及 8/50 体积的 4 mol/L NaCl,混匀后置冰上 20~30 min;于 4°C 16 000 g 离心 15 min,去上清;沉淀用 75% 乙醇淋洗 2 次,干燥后溶于适量体积的 DEPC 水中。可加步骤:每 20~50  $\mu$ g RNA 用 2  $\mu$ L DNase I (RNase-free, 5U/ $\mu$ L) 进行消解,反应体系为 TaKaRa 公司的 DNase I (RNase free),步骤按产品说明书进行,以除去在总 RNA 中残余的基因组 DNA。

用等体积氯仿/异戊醇混合液(24 : 1)抽提至无界面无白色蛋白层,室温下 10 000 g 离心 20 min;取上清,加入 10 mol/L LiCl 至终浓度为 3 mol/L;于 -20°C 放置 4 h(或过夜),经 16 000 g 4°C 离心 20 min,去上清液,沉淀用 1 mL DEPC 水溶解,再用等体积酚/氯仿/异戊醇(25 : 24 : 1)抽提;取上清液,再经氯仿/异戊醇(24 : 1)抽提;取上清,按 1/30 体积加入 3 mol/L NaAc (pH5.2) 以及 1/10 体积的无水乙醇,混匀后冰浴 30 min,16 000 g 4°C 离心 20 min;取上清液,按 1/10 体积加入 NaAc(3 mol/L, pH5.2) 以及 3 倍体积的无水乙醇, -70°C 下放置 4 h;经 16 000 g 4°C 离心 20 min,沉淀物用 75% 乙醇淋洗 2 次,干燥后溶于适量体积的 DEPC 水中。

(4) **改良 CTAB 法** 在 3 mL 含 CTAB 的提取缓冲液中(2% CTAB; 100 mmol/L Tris · HCl, pH8.0; 1.4 mol/L NaCl; 20 mmol/L EDTA, pH8.0)加入 60  $\mu$ L 巯基乙醇,置 65°C 预热,再将 600 mg 经液氮研磨的叶片粉末放入其中,用力混匀后,置于 65°C 中保温 30 min(每 10 min 摆匀 1 次);然后取出样品,自然冷却至室温,用等体积氯仿/异戊醇混合液(24 : 1)抽提 2 次;加等体积酚/氯仿/异戊醇混合液(以 0.4 mol/L NaAc, pH4.0 来饱和苯酚,然后与氯仿、异戊醇以 25 : 24 : 1 比例混合)抽提至界面无白色蛋白层,4°C 10 000 g 离心 20 min;取上清,加入 4/5 体积的 13% (m/v) PEG8000 以及 8/50 体积的 4 mol/L NaCl,混匀后置冰上 20~30 min;于 4°C 16 000 g 离心 15 min,去上清;沉淀用 75% 乙醇淋洗 2 次,干燥后溶于适量体积的 DEPC 水中。可加步骤:每 20~50  $\mu$ g RNA 用 2  $\mu$ L DNase I (RNase-free, 5U/ $\mu$ L) 进行消解,反应体系为 TaKaRa 公司的 DNase I (RNase free),步骤按产品说明书进行,以除去在总 RNA 中残余的基因组 DNA。

(5) **抽提上清液粘度的测量及总 RNA 提取质量的检测** 分别取 10 mL 第一次抽提的上清液,测量上清液粘度(NDJ-79 型旋转式粘度计,上海);用乙二醛化 RNA 的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 的完整性;分别取 60  $\mu$ L 总 RNA 加入比色杯,测定总 RNA 分别在 260 nm 和 280 nm 的紫外吸收值(BioMate 5 型紫外分光光度计, Thermo-Spectronic),RNA 浓度( $\mu$ g/mL) =  $OD_{260} \times$  稀释倍数  $\times 37 \mu$ g/mL。

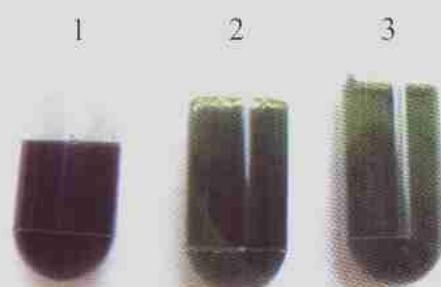
(6) **cDNA 的合成及 P450 基因的 PCR 扩增** 反转录按照 Invitrogen 公司的产品操作程序进行(反

转录体系为 SuperScript™ II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase。将制备的红豆杉总 RNA 进行反转录, 合成 cDNA 第一链。反转录所用的锚定引物为 Oligo(dT)15 primer(Promega 公司)。PCR 扩增采用的引物为以 Genbank 所发表的 P450 基因 cDNA 序列而设计的一对互补特异性引物。25 μL PCR 反应体系为: Premix Taq(Ex Taq™ Version, TaKaRa 公司)12.5 μL, 互补引物各 0.5 μL, cDNA 模板 1.5 μL, 无菌去离子水 10 μL。PCR 条件: 94℃, 30 s; 52℃, 45 s; 72℃, 2.5 min; 35 个循环后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。

## 2 结果

4 种不同方法的粗提液(植物材料与抽提液直接接触的反应)和第一次抽提产物(粗提液与有机抽提试剂的反应)的颜色比较见图 1, 图 2。4 种不同方法提取的总 RNA 的相关特性见表 1。

采用 TRIZOL 法提取杉树类植物总 RNA 时, 植物组织与 TRIZOL 试剂反应时颜色呈深褐色(图 1:1), 这是由于植物组织中的酚类物质氧化所致。加入氯仿离心后, 上清液很粘稠, 其粘度为 4 mpa/s; 异丙醇沉淀后出现大量白垩色絮状沉淀物; 用 DEPC 水溶解时, 需在 50~60℃ 下才能溶解, 且溶解时间长, 约 20~30 min, 溶解液仍是粘稠的胶状物。用 RNase 对其进行消化, 胶状物并无降解; 加入 2% CTAB 并在 65℃ 下反应 30 min, 产生大量白色沉淀, 溶液澄清, 无粘性, 由此可以初步确定这种胶状物主要是多糖与核酸的复合物。使用 TRIZOL 法不能有效地去除多糖类物质, 用乙二醛化 RNA 的



1. Coarse extract by TRIZOL method; 2. Coarse extract by ethyleneglycol monobutyl ether method; 3. Coarse extract by CTAB method(改良 CTAB 法粗提物与普通 CTAB 法的相同。Coarse extracts by improved CTAB method is the same as general CTAB method's)

图 1 3 种方法获得的粗提物的颜色比较  
Fig. 1 Comparison of colors of coarse extracts by three methods



1. The first extract by TRIZOL method; 2. The first extract by ethyleneglycol monobutyl ether method; 3. The first extract by CTAB method(改良 CTAB 法第一次抽提产物与普通 CTAB 法的相同。The first extracts by improved CTAB methods is the same as general CTAB method's)

图 2 3 种方法获得的第一次抽提产物的颜色比较

Fig. 2 Comparison of colors of the first extracts by three methods

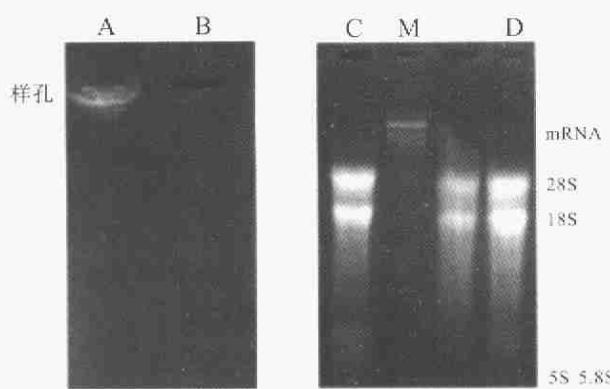
表 1 4 种不同方法提取杉树类植物总 RNA 特性的比较  
Table 1 Comparison of characters of total RNA extracted from fir plant tissues by four methods of RNA

特性 Characters	TRIZOL 法 TRIZOL method	乙二醇 丁醛法 EME* method	两种 CTAB 法 Two CTAB methods
与试剂反应时植物材料颜色 Plant materials' color reacting with reagents	深褐色	绿色	绿色
抽提液有机相颜色 Extract's organic phase colors	褐色	褐色	深绿色
抽提液上清液粘度 Extract supernatant viscosity	4 mpa/s	3 mpa/s	1.5 mpa/s
白垩色絮状沉淀 Chalky floccules	有, 最后一次 沉淀出现	有, 第一次沉 淀出现	无
总 RNA 的特性 Total RNA characters	量多、粘稠 且不易吸 取、不易溶 于水	几乎无、 不粘稠 且易溶 于水	量较多、不 粘稠、且易 溶于水

注: 植物材料为杉树类植物幼叶; \* 乙二醇丁醛。

Note: Plant materials are fir plant tender leaves; \* Ethyleneglycol monobutyl ether.

琼脂糖凝胶电泳法可以对总 RNA 的质量进行比较分析。乙二醛可以消除单链 RNA 的二级结构, 在微酸的条件下, 乙二醛的 2 个乙醛基与鸟苷的亚氨基相互作用形成环状化合物, 在室温下且 pH≤7.0 时, 这种化合物很稳定, 能很好地防止电泳时 RNA 的降解, 因而能很好地反映 RNA 的提取结果<sup>[1]</sup>。如图 3:A 所示, TRIZOL 提取的总 RNA 经乙二醛处理后, 用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳, 结果只在凝胶样孔处出现荧光, 即使上样后先用高电压 8 V/cm 电泳 10~15 min, 也难以使样孔内的 RNA 迁移出。显然这是样品含有大量多糖所致。



A. Total RNA extracted by TRIZOL method; B. Total RNA extracted by ethyleneglycol monobutyl ether method; C. Total RNA extracted by general CTAB method; D. Total RNA extracted by improved CTAB method; M. Marker

图 3 4种不同方法提取总RNA的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis pattern of total RNA extracted with four methods

在乙二醇丁醚法提取杉树类植物 RNA 的过程中, 抽提缓冲液与植物组织反应时, 没有出现 TRIZOL 法提取 RNA 时的酚氧化现象, 组织材料保持青绿色(图 1:2), 但是在用酚/氯仿/异戊醇混合液进行第一次抽提时, 植物材料反应后呈褐色, 这是植物材料被苯酚氧化的结果(图 2:2)。第一次抽提得到的上清液粘稠, 其粘度为 3 mpa/s, 说明上清液含有大量的多糖物质(表 1)。第一次用酒精沉淀时, 出现大量的絮状白垩色沉淀物, 说明多糖并未除尽。乙二醇丁醚处理后, 几乎无任何沉淀。其 RNA 提取物用乙二醛处理, 再经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后基本上观察不到任何核酸带(图 3:B)。

在两种 CTAB 法提取 RNA 过程中, 提取缓冲液与植物材料反应时, 材料仍保持青绿色(图 1:3), 第一次抽提得到的上清液呈淡绿色且不粘稠, 其粘度为 1.5 mpa/s(表 1), 分别比 TRIZOL 法和乙二醇丁醚法得到的上清液的粘度下降了 62.5% 和 50%。说明在提取缓冲液裂解植物组织细胞的同时, 也去除了大量的多糖, 而且没有发生酚氧化现象。如表 1 所示, 用 LiCl 沉淀 RNA 或用聚乙二醇沉淀 RNA 时, 两种沉淀过程中无白垩色絮状沉淀, 表明多糖物质基本被去除。离心后得到白色透亮的沉淀物。改良 CTAB 法获取的提取样品较普通 CTAB 法得到的量多, 色素等杂质基本被去除。将沉淀物溶解

后, 用 DNase I(RNase free) 进行消化, 去除 RNA 中残存的 DNA, 得到纯度较高的 RNA 产物。两种 CTAB 法制备的杉树类植物组织总 RNA 用乙二醛处理后, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 3:C,D。从图 3 可知, 琼脂糖凝胶上显示出两种 CTAB 法的 28S rRNA、18S rRNA 两条带均很清晰, 28S rRNA 的荧光亮度约是 18S rRNA 的两倍, 而且可以见到弥散的 mRNA 区域。由于 LiCl 沉淀小分子 RNA 不完全<sup>[12]</sup>, 而 PEG 主要是引起溶液中大分子溶质分子的聚合<sup>[1]</sup>, 所以两种 CTAB 法所得的 5S、5.8S RNA 的量很少。

将 4 种不同提取方法得到的总 RNA 用紫外分光光度计测定 RNA 的紫外吸收值表明(表 2), 改良的 CTAB 法提取的总 RNA 的产量、质量都很高,  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  达到 1.8 以上, 传统的 CTAB 法提取的 RNA 电泳质量也很高, 但产量不高(RNA 的得率仅为改良法的 14.4%), 且 RNA 纯度偏低( $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  仅为 1.05)。TRIZOL 法提取的总 RNA 纯度偏低( $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  为 1.04), 产量低(RNA 得率仅为改良法的 13.3%), 且电泳质量也很低, 乙二醇丁醚法提取的 RNA 量太少, 这两种方法提取的总 RNA 不能用于 RT-PCR。

表 2 4 种不同方法提取杉树类植物总 RNA 质量的比较  
Table 2 Comparison of qualities of total RNA extracted from fir plant tissues by four methods of RNA

CD	TRIZOL 法 TRIZOL method	乙二醇 丁醚法 EME* method	普通 CTAB 法 General CTAB method	改良的 CTAB 法 Improved CTAB method
$OD_{260\text{ nm}}$	3.317	0.016	3.112	2.770
$OD_{280\text{ nm}}$	3.19	0.002	2.969	1.435
$OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$	1.04	9.18	1.05	1.93
RNA 浓度( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	0.123	$0.59 \times 10^{-3}$	0.133	0.922
RNA concentration				

\* EME: Ethyleneglycol monobutyl ether.

为了检验改良的 CTAB 法制备总 RNA 用于 RT-PCR 中的效果, 以两种 CTAB 法提取的总 RNA 作为模板进行反转录, 获得的 cDNA 产物再进行红豆杉 P450 基因特异性的 PCR 扩增, 均得到约 1.5 kb 的扩增产物(见图 4), 其分子量与 Tu J 等<sup>[13]</sup>在 NCBI 上所发表的 cDNA 大小一致。

由此可见, 比较 4 种不同的方法获得杉树类植物组织总 RNA 的效果明显不同, 其中改良的

1) Tu J, Cheng K. Molecular cloning, function expression and characterization of a cytochrome P450 from *Taxus chinensis* (Unpublished) [DB/OL]. NCBI(AF545833), 2002.

CTAB 法不仅可以从杉树类植物中提取高质量高纯度的总 RNA, 而且提取的 RNA 能有效地用于 RT-PCR。



1. RT-PCR products of P450 gene by improved CTAB method; 2. RT-PCR products of P450 gene by CTAB method; 3. Lambda DNA/Hind III + EcoR I markers

Fig. 4 RT-PCR 产物 0.7% 琼脂糖凝胶电泳图谱  
Fig. 4 0.7% agarose gel electrophoresis pattern of RT-PCR products

### 3 讨论

杉树类植物组织中含有大量的酚类及其代谢物, 在氧化条件下, 酚类物质会产生褐化效应 (browning effect)<sup>[5]</sup>, 酚类物质氧化后不可逆地结合到核酸上并与 RNA 共沉淀, 这导致 RNA 产量和质量均很差<sup>[6,7]</sup>。防止酚类物质被氧化的方法主要有还原剂法、螯合剂法、Tris-硼酸法、BSA 法和丙酮法等, 而还原剂法一般是在提取液中加入  $\beta$ -巯基乙醇、DTT 或半胱氨酸等来防治酚类物质被氧化,  $\beta$ -巯基乙醇等还可以打断多酚氧化酶的二硫键而使之失活<sup>[8]</sup>。TRIZOL 试剂中含有苯酚等强氧化物质, 不含上述去除酚类物质的组分, 所以去除酚类物质的效果很差, 植物组织材料与 TRIZOL 反应后呈褐色, 使 RNA 进一步丢失。乙二醇丁醚法采用了  $\beta$ -巯基乙醇来保护 RNA 免受多酚类物质的干扰, 但是乙二醇丁醚法在第一步抽提过程中, 使用了酚:氯仿:异戊醇混合液, 苯酚直接与植物材料接触, 使植物组织被强氧化, 发生褐化效应; 为了防止褐化效应的发生, 我们采用  $\beta$ -巯基乙醇来防止酚类物质的氧化; 而且在前两步抽提中, 采用氯仿:异戊醇(24:1)作为抽提剂, 使植物材料不与苯酚这种强氧化剂直接接触, 在以后的步骤中再使用苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)(pH4.0)进行抽提, 可以有效地防止褐化效应的产生。同时我们发现如果第一步就采用苯酚进

行抽提, 以后沉淀得到的产物有明显的褐化现象。

杉树类植物组织中还含有大量的多糖物质。提取杉树类植物的 RNA, 需在植物组织细胞裂解、内容物与抽提缓冲液反应时就去除细胞中的次生代谢物如多糖、多酚等物质, 否则这些次生代谢物易与 RNA 结合形成粘稠难溶的胶状物。由于多糖可以抑制许多酶的活性<sup>[9]</sup>, 因此污染了多糖的 RNA 样品无法用于进一步的分子生物学研究。而且此胶状物一旦形成, 很难用其它试剂使其与 RNA 分开, 这是因为多糖的许多理化性质与 RNA 十分相似, 去除多糖的同时 RNA 也被携带走<sup>[8]</sup>。TRIZOL 不含能有效去除多糖和多酚类物质的组分, 提取的 RNA 纯度不高; 在钠离子浓度为 80 mmol/L 时, 0.4 倍体积的乙二醇丁醚能选择性沉淀多糖, 而且 1 倍体积的乙二醇丁醚能在溶解多酚类物质的同时沉淀核酸<sup>[1]</sup>。1991 年 Kenneth 等采用乙二醇丁醚去除抽提液中的多糖和多酚物质, 并从富含次生物质的草莓中获得质量较好的 RNA<sup>[10]</sup>。李大力改良 Kenneth 的方法, 也从草莓中提取了纯度较高的 RNA<sup>[3]</sup>。虽然乙二醇丁醚可以在不同浓度下选择性的沉淀多糖及多酚类物质, 但是由于在乙二醇丁醚法的抽提缓冲液中不含能去除多糖等的物质, 以致在以后几步中用乙二醇丁醚来除去多糖和多酚的同时, 损失了大部分 RNA, 其 RNA 得率很低。所以这两种方法均不宜用于提取含多糖和多酚类物质较多的材料的总 RNA, 不能用于 RT-PCR 等分子生物学操作。

用两种 CTAB 法提取杉树类植物组织总 RNA 较上述另外两种方法有明显效果。两种 CTAB 方法不仅能够去除植物组织内多糖物质, 也能去除酚类物质, 从而获得质量较高的总 RNA。两种 CTAB 方法是在抽提液中加入了一种阳离子去污剂 CTAB, 它具有从低离子强度的溶液中沉淀核酸和酸性多聚糖的特性, 而在高离子强度的溶液里, CTAB 与蛋白质和大多数酸性多聚糖以外的多聚糖形成复合物, 只是不能沉淀核酸<sup>[1]</sup>, 所以能够有效地去除多糖。普通 CTAB 法使用一种强脱水剂 LiCl 作为沉淀剂, 它可以选择性沉淀高分子量的 RNA, 沉淀效果好, 但是其沉淀时间过长, 往往需要过夜沉淀。而且样品中残余的 LiCl 会干扰 RNA 的反转录和体外翻译, 所以一般需要再次抽提, 乙醇沉淀以纯化样品<sup>[11]</sup>。而改良的 CTAB 法中采用 PEG8000 作为沉淀剂, 由于 PEG 可以引起水溶液中大分子溶质分子的聚合, 可以依据其分子大小来沉淀核酸<sup>[1]</sup>。实验证明, PEG 沉淀的除杂效果远高于乙醇和异丙醇, 且沉淀

时间短,仅为 20~30 min。可用 70% 的酒精漂洗 2 次以除去沉淀中 PEG,这种方法简便而且效果很好<sup>[12]</sup>。而且改良的 CTAB 法利用酸酚进行抽提, RNA 在水相,而 DNA 在有机相,去除 DNA 彻底,有效地避免了 DNA 的污染<sup>[1,13]</sup>;而且酸性环境能部分抑制 RNA 酶的活性。经 PEG8000 沉淀后得到的 RNA 已完全可用于 RT-PCR 等分子生物学操作。若将得到的 RNA 再经过 DNase(RNase-free) 消化去除残存的 DNA 后,即可得到高纯度的 RNA。改良 CTAB 法所需时间较短,能有效去除多糖物质,而且成本低廉,获得的 RNA 量较大,且质量较好,适用于 RT-PCR 等分子生物学操作。我们也曾用此方法有效地提取出如冷杉、三尖杉、花生种子、玉米种子等植物中的 RNA,所以我们认为改良的 CTAB 法是一种制备杉树类植物总 RNA 的有效方法,而且可能也适宜于其他含次生代谢物较多的植物组织的 RNA 制备。

#### 参考文献:

- [1] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [2] 彭秀玲,袁汉英,谢毅,王洪海.基因工程实验技术 [M].长沙:湖南科学技术出版社,1998. 197~198.
- [3] 李大力.一种从富含次生物质的植物中提取 RNA 的方法 [J].南京理工大学学报,2001,25(5):547~549.
- [4] 山蓝,王保莉,张继澍.从富含多糖和多酚的柿果中提取具转录活性 RNA 的方法 [J].植物生理学通讯,2002,38(5):463~466.
- [5] Su X, Gibor A. A method for RNA isolation from marine macroalgae [J]. *Anal Biochem*, 1988, 174: 650~657.
- [6] Katterman F R H, Shttuck V I. An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amount of pheolic terpenoids and tannins [J]. *Prep Biochem*, 1983, 13: 347~359.
- [7] Schneiderbauer A H, Sandermann J, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds [J]. *Anal Biochem*, 1991, 197: 91~95.
- [8] 李宏,王新力.植物组织 RNA 提取的难点及对策 [J].生物技术通报,1999,1:36~39.
- [9] Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA [J]. *BioTechniques*, 1992, 13: 52~56.
- [10] Kenneth M. Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation [J]. *Anal Biochem*, 1991, 195: 45~50.
- [11] 王玉成,杨传平,姜静.木本植物组织总 RNA 提取的要点与原理 [J].东北林业大学学报,2002,30(2): 1~4.
- [12] 卢圣栋等.现代分子生物学实验技术 [M].北京:高等教育出版社,1993. 50.
- [13] Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156~159.