第 34 卷第 2 期
2010 年 2 月

水 产 学 报
JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA

Vol. 34, No. 2
Feb., 2010

文章编号:1000-0615(2010)02-0220-07 DOI:10.3724/SP.J.1231.2010.06512

# 坛紫菜叶状体 RNA 提取方法的改良与比较

谢潮添, 梅高尚, 陈昌生*, 纪德华
(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

**摘要**:为提取高质量的坛紫菜叶状体总 RNA,对常用的几种植物 RNA 提取方法(CTAB 法、SDS 法、异硫氰酸胍法)按照去除多糖、多酚的方法进行了改良,并对分离的总 RNA 根据吸光值、电泳图谱及 RT-PCR 检测等结果与两种试剂盒(离心柱试剂盒法,RNAiso 法)的提取结果进行了比较。结果表明,SDS 法、异硫氰酸胍法和 RNAiso 法 3 种方法提取的 RNA 纯度低,质量差,部分 RNA 已经发生了降解。而改良 CTAB 法和离心柱试剂盒法提取的总 RNA 质量可靠,完整性好,纯度高,并且成功去除了可能影响逆转录酶活性的物质,可以进一步应用于 cDNA 文库构建,基因表达分析等后续实验,但这两种方法各有优缺点,应根据实际情况选用合适方法进行坛紫菜叶状体总 RNA 的分离。

**关键词**:坛紫菜; 叶状体; RNA 提取; RT-PCR
**中图分类号**:Q 946; S 917 **文献标识码**:A

紫菜是目前世界上人工养殖经济价值最高的一类海藻,全世界年总产值接近 20 亿美元,约占人工养殖海藻的 2/3,而我国的紫菜产量位居世界首位[1]。坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是我国两个主要紫菜栽培品种之一,是我国特有的暖温带性种类,原产于福建,在闽、浙、粤沿海地区被广泛栽培,其产量约占全国紫菜总产量的 75%[1]。

近年来,随着生物技术的发展与进步,从分子水平理解或解释植物的各种生命现象已经成为生命科学研究的热点,而从植物组织中分离得到纯度高、完整性好的 RNA 是进行 Northern 杂交分析,纯化 mRNA 以用于体外翻译或建立 cDNA 文库,基因表达调控分析及基因克隆等分子生物学研究的关键,很多植物就是由于未能有效地分离纯化其组织中的 RNA,而阻碍了其分子生物学方面研究的进展[2]。坛紫菜叶状体细胞壁厚实且成分复杂,富含多糖、多酚等次生代谢物质,在分离 RNA 时,这些次生代谢物质,尤其是多糖很容易与 RNA 发生共沉淀或造成 RNA 的降解失活,难以获得高质量的 RNA。因此能否有效去除多糖、多酚是坛紫菜叶状体 RNA 提取的关键所在。

当前国内外的报导大都局限于从紫菜丝状体中提取 RNA,如徐民俊等[3]和杨官品等[4]利用改进的 TRIzol 法提取条斑紫菜丝状体总 RNA, 并构建了条斑紫菜丝状体的 cDNA 表达文库;庞国兴等[5]和 Fan 等[6]用改进的一步法提取了坛紫菜丝状孢子体总 RNA,构建了坛紫菜丝状孢子体的 cDNA 文库;胡晓静等[7]比较了 5 种常用 RNA 提取方法提取的条斑紫菜丝状体总 RNA 的质量和纯度,结果认为 RNAplant 法更适于条斑紫菜丝状体总 RNA 的提取;而对于叶状体 RNA 的分离,目前大多采用 GE 公司的 QuickPrep 微量 mRNA 分离试剂盒直接分离条斑紫菜叶状体的 mRNA[8-9]。由于坛紫菜叶状体的多糖含量远高于丝状体和条斑紫菜的叶状体,RNA 的分离更为困难,目前只有王丽等[10]通过先分离获得营养细胞,再采用 Tiangen 公司的植物 RNA 分离试剂提取了坛紫菜叶状体的总 RNA。但很多分子生物学研究必须直接以叶状体为起始材料提取总 RNA(如不同环境胁迫下叶状体中的基因表达情

**收稿日期**:2009-07-10 **修回日期**:2009-08-24
**资助项目**:国家自然科学基金项目(40676077,40806065);国家"八六三"高技术研究发展计划(2006AA10A413);福建省科技平台建设项目(2007N2011);福建省自然科学基金项目(2007J0064)
**通讯作者**:陈昌生,E-mail:cschen@jmu.edu.cn

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

况分析等),因此本研究对常用的几种富含多糖、多酚植物组织 RNA 的提取方法进行了优化和改进,并同一些商业化的试剂盒进行比较,以期建立一套适用于坛紫菜叶状体总 RNA 提取的方法,为后续坛紫菜的分子生物学研究奠定技术基础。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

坛紫菜叶状体均为保存于福建省坛紫菜种质资源库中的新鲜藻体,培养条件为 20 ℃,光照强度 1 000 ~ 1 500 lx,光暗周期为 12 h∶12 h。

多糖多酚植物总 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)购于北京百泰克生物技术有限公司,RNAiso 富含多糖植物组织 RNA 提取试剂以及 Primescript™ RT-PCR 试剂盒购于大连宝生物(Takara)工程有限公司,实验所用其余生化试剂均购于上海生工生物工程有限公司。RT-PCR 检测第二步扩增引物依据坛紫菜 18*S rRNA* 基因设计,由大连宝生物(Takara)工程有限公司合成。引物序列为 Phf:5′-AATGTCGACAG-GGCAAGTCTGGTGAA-3′,Phr:5′-TAACCC-GGGCTCCATTAGAGTCTCTGAAG-3′。

### 1.2　方法

*RNA 酶活性的灭除*　用于 RNA 提取的研钵、药匙、镊子、试剂瓶、Tip 头、eppondrof 管等用具均经 1.1 MPa(121 ℃)高压灭菌 2.5 h 后,在 90 ℃烘干备用。实验用试剂均采用 DEPC 水配制。实验过程佩戴手套和口罩,并在超净工作台中进行。

*RNA 提取方法*　离心柱试剂盒法按照多糖多酚植物总 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)的操作说明书进行。

RNAiso 试剂法按照 RNAiso 富含多糖植物组织 RNA 提取试剂的操作说明书进行。

改良 CTAB 法,改良 SDS 法和改良异硫氰酸胍法除所使用的抽提缓冲液不同外,其余操作步骤均相同,具体步骤如下:

取 1 g 新鲜幼嫩藻体于研钵中液氮研磨至粉末状,转移至 50 mL 离心管中,加入 -70 ℃预冷的丙酮 5 mL,2% β-巯基乙醇,震荡 30 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min;弃上清,离心管中再加入 5 mL 抽提缓冲液,微型匀浆机匀浆,并剧烈震荡 15 min 后,缓慢加入 1/4 体积无水乙醇和 1/9 体积 3 mol/L 醋酸钾(pH 4.8),轻柔摇动;等体积氯仿∶异戊醇(24∶1)抽提,4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min;取上清液加入 0.4 倍体积乙二醇丁醚,冰上放置 30 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min;取上清,加入等体积异丙醇,-20 ℃沉淀 30 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min,沉淀用 75% 酒精洗涤,室温干燥后,加入 50 μL DEPC 水溶解备用。各方法所采用的抽提缓冲液配方如下:

改良 CTAB 法:100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),25 mmol/L EDTA,2 mol/L NaCl,2%(w/v) CTAB,2%(w/v) PVP,2% β-巯基乙醇,使用前须 65 ℃预热。

改良 SDS 法:100 mmol/L Tris,25 mmol/L EDTA,1%(w/v) SDS,2%(w/v) PVP,2% β-巯基乙醇。

改良异硫氰酸胍法:4 mol/L 异硫氰酸胍,25 mol/L 柠檬酸钠(pH 7.0),0.5%(w/v)十二烷基肌氨酸钠,2%(w/v) PVP,2% β-巯基乙醇。

*总 RNA 电泳分析*　取 5 μL RNA 样品加 3 μL 溴酚兰,在 1.0% 琼脂糖凝胶,电压 120 V 的条件下电泳 30 min,EB 染色,在凝胶成像仪上观察 RNA 条带的清晰度和完整性、并拍照。

*总 RNA 含量和纯度的测定*　取 5 μL RNA 样品稀释 30 倍,在 Cary50 紫外分光光度计上分别测定 $OD_{230}$,$OD_{260}$ 和 $OD_{280}$ 值,并根据测定结果计算 RNA 的浓度,判断核酸和蛋白质的污染情况。RNA 浓度的计算公式:

浓度 $N$(ng/μL) = $OD_{260}$ × 40 × 稀释倍数

*RNA 的逆转录检测*　将检测合格的总 RNA 先经 DNA 酶消化,以避免微量 DNA 对检测结果的影响,再按照 Primescript™ RT-PCR 试剂盒的操作说明进行逆转录检测,以进一步确定所提取总 RNA 的质量。去除总 RNA 溶液中微量 DNA 污染的实验步骤如下:

(1)在离心管中配制下列混合液,总 RNA 13 μL,DNase Ⅰ Buffter 3 μL,DNase Ⅰ(1 U/μL)1 μL,RNase Inhibitor 1 μL,RNase-free $ddH_2O$ 3 μL,37 ℃下消化 30 min。

(2)往上述溶液中加入 3 μL 25 mmol/L EDTA,37 ℃温浴 1 h 终止反应,然后再在 65 ℃下温浴 10 min,使 DNase 失活。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

## 2 结果

### 2.1 叶状体总 RNA 不同提取方法结果比较

从提取的总 RNA 溶液的色泽和透明度上看:离心柱试剂盒法和改良 CTAB 法提取的总 RNA 溶液澄清透明,说明杂质含量较少;改良 SDS 法和改良异硫氰酸胍法提取的总 RNA 溶液呈乳白色粘稠状,说明可能还有一些多糖类的胶状物未能彻底去除;RNAiso 试剂法提取的总 RNA 溶液则呈淡红色,说明还有一些色素等次级代谢产物未能除净。

从总 RNA 的电泳图谱上看(图 1),5 种方法提取的总 RNA 电泳图谱均有条带出现。图 1-A 和图 1-B 分别为离心柱试剂盒法和改良 CTAB 法提取的总 RNA 电泳图,各泳道中在 28S,18S 和 5S 处均出现了清晰明亮条带,且没有拖尾现象,只是在 28S 和 18S 所在的位置出现了多条带,这可能与细胞质基因组转录而来的 RNA 有关;而且这两副图加样孔中没有出现明显亮斑,说明这两种方法可以有效去除多糖或蛋白质。图 1-C,图 1-D 和图 1-E 分别为 RNAiso 试剂法,改良 SDS 法和改良异硫氰酸胍法提取的总 RNA 电泳图,从图中可以看出这些方法提取的总 RNA 条带不清晰,有明显拖尾现象,说明总 RNA 已经发生降解,而且加样孔中有明显亮斑,说明这 3 种方法提取的总 RNA 溶液中残留有较高浓度的多糖或蛋白质。

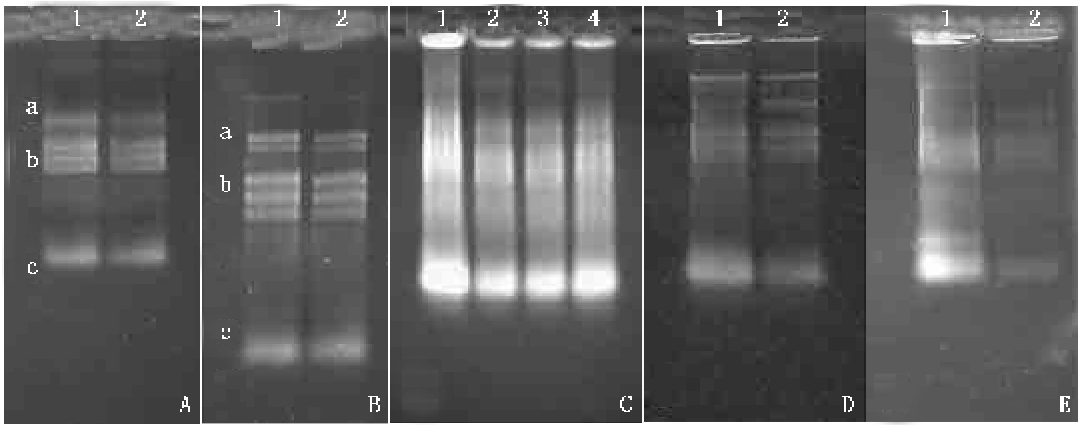


**图 1 不同方法提取的坛紫菜叶状体总 RNA 电泳图谱**

A:离心柱试剂盒法;B:改良 CTAB 法; C:RNAiso 试剂法;D:改良 SDS 法;E:改良异硫氰酸胍法;a,b,c 分别指 28S,18S 和 5S RNA 所在位置。

**Fig. 1 Agrose electrophoresis of total RNA of *P. haitanensis* thalli by different methods**

A: spin column kit method; B: CTAB method; C: RNAiso method; D: SDS method; E: Guanidine thiocyante method; a, b, c was show the location of 28S,18S and 5S respectively.

离心柱试剂盒法和改良 CTAB 法提取的总 RNA,其溶液 $OD_{260}/OD_{280}$ 值均在 1.9 ~ 2.1,且 $OD_{260}/OD_{230}$ 值大于 2.0(表 1),说明这两种方法提取的总 RNA 纯度高,质量较好。改良 SDS 法和改良异硫氰酸胍法提取的总 RNA,其溶液 $OD_{260}/OD_{280}$ 值均在 2.2 以上,且 $OD_{260}/OD_{230}$ 值小于 2.0,说明大部分 RNA 已经降解成了单核苷酸,且纯度较差,溶液中含有较高浓度的多糖、盐离子等杂质。RNAiso 试剂法提取的总 RNA,其溶液的 $OD_{260}/OD_{280}$ 值均小于 1.65,且 $OD_{260}/OD_{230}$ 也都小于 2.0,说明该方法提取的 RNA 纯度较低,溶液中同样含有较高浓度的多糖、盐离子等杂质。

再从提取的 RNA 溶液的浓度上看(表 1),改良 CTAB 法提取的总 RNA 溶液浓度最高,分别达到了 455 ng/μL 和 429 ng/μL,而离心柱试剂盒法提取的总 RNA 溶液浓度最低,分别为 205 ng/μL 和 196 ng/μL,得率不到改良 CTAB 法的 1/2。其余 3 种方法提取的 RNA 浓度均在 315 ~ 453 ng/μL。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 1　不同方法提取的坛紫菜叶状体总 RNA 紫外吸光值测定结果

Tab.1　Spectrophotometric evaluation results of total RNA of *P. haitanensis* thalli by different methods

| 提取方法 isolation methods | 样品 samples | $OD_{230}$ | $OD_{260}$ | $OD_{280}$ | $OD_{260}/OD_{230}$ | $OD_{260}/OD_{280}$ | RNA 浓度(ng/μL) RNA concentration |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 离心柱试剂盒法 spin column kit method | 1 | 0.083 5 | 0.170 8 | 0.088 1 | 2.045 5 | 1.938 7 | 205 |
| | 2 | 0.079 8 | 0.163 5 | 0.079 4 | 2.048 9 | 2.059 2 | 196 |
| 改良 CTAB 法 CTAB method | 1 | 0.182 6 | 0.379 5 | 0.193 6 | 2.078 3 | 1.960 2 | 455 |
| | 2 | 0.168 2 | 0.357 3 | 0.185 7 | 2.124 3 | 1.924 0 | 429 |
| RNAiso 试剂法 RNAiso method | 1 | 0.283 1 | 0.293 8 | 0.190 3 | 1.037 8 | 1.543 9 | 353 |
| | 2 | 0.207 7 | 0.268 9 | 0.160 8 | 1.294 7 | 1.672 3 | 323 |
| | 3 | 0.280 8 | 0.262 5 | 0.160 6 | 0.934 8 | 1.634 5 | 315 |
| | 4 | 0.253 5 | 0.272 1 | 0.171 0 | 1.073 4 | 1.591 2 | 327 |
| 改良 SDS 法 SDS method | 1 | 0.382 2 | 0.377 3 | 0.140 1 | 0.987 2 | 2.693 1 | 453 |
| | 2 | 0.425 6 | 0.325 2 | 0.108 7 | 0.764 1 | 2.991 7 | 390 |
| 改良异硫氰酸胍法 guanidine thiocyante method | 1 | 0.292 0 | 0.336 5 | 0.128 8 | 1.152 4 | 2.612 5 | 404 |
| | 2 | 0.321 0 | 0.310 7 | 0.138 1 | 0.967 9 | 2.249 8 | 373 |

### 2.2　RNA 的逆转录检测

为进一步确定所提取的 RNA 能否满足后续相关分子生物学实验的要求,对离心柱试剂盒法和改良 CTAB 法提取的坛紫菜叶状体总 RNA 进行了逆转录检测,结果如图 2 所示。从图中可以看出两种提取方法获得的 RNA 均能成功进行逆转录反应,并扩增出一条与预期片段大小(约 500 bp)相符的清晰亮带。

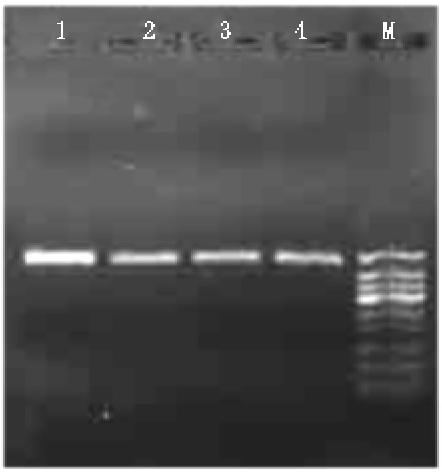


图 2　坛紫菜叶状体总 RNA 的逆转录检测结果

1,2. 离心柱试剂盒法提取的总 RNA;
3,4. 改良 CTAB 法提取的总 RNA。

Fig.2　RT-PCR results of total RNA of *P. haitanensis* thalli

1,2. total RNA was isolated by spin column kit method;
3,4. total RNA was isolated by CTAB method.

## 3　讨论

### 3.1　叶状体 RNA 不同分离方法的比较分析

一般用于判断 RNA 质量高低的方法主要有两种[11]:一是根据 RNA 电泳图谱来判断,如果 28S 和 18S 条带明亮、清晰、锐利(指条带的边缘清晰,没有拖尾现象),并且 28S 条带亮度在 18S 条带的两倍以上,就认为 RNA 质量较好;二是通过检测 RNA 溶液的吸光值来判断,RNA 溶液在 280、320、230、260 nm 的吸光值分别代表了核酸、背景(溶液浑浊度)、盐浓度和蛋白等有机物的值。一般,如果 $OD_{260}/OD_{280}$ 值为 1.9 ~ 2.1,且 $OD_{260}/OD_{230}$ 值 > 2.0,就可以认为 RNA 质量较好,溶液中蛋白、小分子杂质或其他有机物的污染是可以接受;如果 $OD_{260}/OD_{280}$ 值 < 1.8 时,就说明溶液中蛋白或者其他有机物的污染比较严重,杂质含量较高;如果 $OD_{260}/OD_{280}$ 值 > 2.2 时,说明 RNA 已经水解成单核酸了;如果 $OD_{260}/OD_{230}$ 值 < 2.0,则表明溶液中有残存的盐和小分子杂质,如核苷酸、氨基酸、酚等。

实验采取 5 种方法提取坛紫菜叶状体总 RNA 时,离心柱试剂盒法和改良 CTAB 法提取的总 RNA,电泳条带明亮、清晰,没有拖尾现象,加样孔中没有出现明显亮斑,而且 $1.9 < OD_{260}/OD_{280} < 2.1$,$OD_{260}/OD_{230} > 2.0$,表明这两种方法提取的总 RNA 完整性好、纯度高,成功去除了多糖等次生代谢物和小分子杂质。而其它 3 种方法提取的 RNA 电泳图谱均出现了条带不清晰、拖尾、加样孔有亮斑等现象,$OD_{260}/OD_{280} < 1.8$ 或 > 2.2,$OD_{260}/OD_{230} < 2.0$,说明这些方法尽管已经进行了优化,但对多糖、多酚等次生代谢物及小分子杂质的去除效果仍不理想,不适用于坛紫菜叶状体总 RNA 的分离。

此外在离心柱试剂盒法和改良 CTAB 法提取的总 RNA 电泳图谱中也发现了在 28S 和 18S

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

所在的位置都分离成了几条带,而且 28S 与 18S 条带亮度的比例并非大多数生物的 2∶1 等异常现象。总 RNA 电泳图谱出现多条亮带的情况在植物中比较常见,因为植物叶绿体和线粒体中的基因转录而来的 RNA(23S,16S)也可以随基因组转录而来的 RNA 一起被分离出来[11]。此外,还有研究认为一种 L-rRNA 大亚基的体内缺口现象(nick)也会造成 18S 位置处出现多条亮带,即核糖体大亚基合成完成后,在特定位点产生缺口,使大亚基呈现大小 2 条片段,其中大片段与 18S 小亚基的大小相近,电泳时共同迁移[12]。也正因为分离成了多条亮带,28S 与 18S 条带亮度的比例无法表现为大多数生物的 2∶1。这些现象都不会影响 RNA 质量[11]。

尽管从以上两种常用方法可以判断所提取的 RNA 纯度和质量,但这两种方法都无法检测 RNA 溶液中是否残留有可能影响逆转录酶等酶活性的物质,还无法判断所提取的总 RNA 是否适用于后续的 cDNA 文库构建,基因表达分析等。因此我们进一步将离心柱试剂盒法和改良 CTAB 法两种方法提取的总 RNA 进行了 RT-PCR 检测,结果发现这两种方法提取的总 RNA 均逆转录扩增出了一条与预期片段大小(约 500 bp)相符的清晰亮带,说明这两种方法分离的总 RNA 质量可靠,完整性好,纯度高,并且成功去除了可能影响逆转录酶等酶活性的物质,可以进一步应用于后续的各项分子生物学实验。

综上所述,离心柱试剂盒法和改良 CTAB 法两种方法均可从坛紫菜叶状体中分离得到纯度高,完整性好,质量可靠的总 RNA,但两种方法各有优缺点:离心柱试剂盒法操作简单、方便,在 2 h 内即可完成整个操作流程,但得率低;而改良 CTAB 法得率较高,是离心柱试剂盒法的两倍以上,但操作过程较为繁琐,耗时长。因此,在具体实验时应根据实际需要选用合适的方法。

### 3.2 多糖等次生代谢物对坛紫菜叶状体总 RNA 提取的影响

多糖类物质的干扰是植物总 RNA 提取中的棘手问题,在完整的植物细胞中,多糖与核酸在空间上是分离的,当组织被研磨,细胞被破碎后,它们就会释放出来与 RNA 相互作用[13]。坛紫菜叶状体中多糖的含量尤其丰富,这些多糖的密度和离子结合性质与核酸相似,很难将二者分开,在去除多糖的同时 RNA 也被裹携走,造成 RNA 产量的减少;或在沉淀 RNA 时,产生含多糖的凝胶状沉淀,难以再溶于水;或残余的多糖抑制各种酶的活性,使提取的 RNA 无法进一步用于相关分子生物学研究[11,13],因此如何去除多糖,是坛紫菜叶状体 RNA 提取的关键。国内外已经有很多报导针对富含多糖植物材料 RNA 的提取提出了一些对策,常见的有:(1)用 SDS-盐酸胍、高浓度 $Na^+$ 或 $K^+$ 离子改变多糖的溶解特性,使其主要分配在有机相中,再通过苯酚和氯仿抽提去掉部分多糖[14]。(2)选择性沉淀多糖或 RNA[13],如 LiCl 沉淀 RNA,多糖则留在上清液中;低浓度乙醇(10% ~30%)沉淀多糖,而 RNA 则要在 75% 乙醇中才能沉淀下来;醋酸钾溶液沉淀多糖;低浓度乙醇和醋酸钾溶液共同沉淀多糖;在高浓度 $Na^+$ 条件下,用低浓度乙醇或 2-丁氧乙醇沉淀多糖等。(3)在沉淀 RNA 之前,再采用乙二醇丁醚分相把多糖去掉[15]。

多酚和色素等次生代谢物质是 RNA 提取的另一个棘手问题,它们极易被氧化成红褐色物质,然后与核酸不可逆的结合。目前常用的对策有:(1)加入巯基乙醇或二硫苏糖醇(DTT)等,防止酚类物质被氧化[16]。(2)加螯合剂 PVP 或 PVPP,其 CO – N = 基有很强的结合多酚化合物的能力,两者形成稳定的复合物,使之不能成为多酚氧化酶的底物而被氧化[17]。(3)加 Tris-硼酸(pH 7.5),硼酸可以与酚类化合物依靠氢键形成复合物,从而抑制了酚类物质的氧化及其与 RNA 的结合[18]。(4)–70 ℃丙酮抽提冷冻研磨后的植物材料[19]。(5)低 pH 值(pH 5.5)的提取缓冲液可以防止酚类化合物的氧化[20]。

因此本研究就根据以上这些常用的去除多糖、多酚和色素干扰的对策,对常用的 RNA 提取方法进行了改良和优化:–70 ℃丙酮抽提去除色素,抽提缓冲液中加入巯基乙醇和 PVP 防止多酚氧化,低浓度乙醇和醋酸钾溶液共同沉淀多糖,在沉淀 RNA 之前再采用乙二醇丁醚分相去掉多糖。通过这些措施,结果表明改良的 CTAB 法可以很好地去除坛紫菜叶状体中的多糖、多酚和色素等杂质,分离得到纯度高、完整性好的总 RNA。而改良异硫氰酸胍法和改良 SDS 法的提取效果较差,仍无法分离得到符合要求的总 RNA。这主要是因为 CTAB 是一种阳离子去污剂,在高离子

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

强度的溶液中( >0.7 mol/L NaCl),能与蛋白质和多糖等次生代谢物形成复合物,产生沉淀,但不会沉淀核酸,通过有机溶剂抽提,进一步去除蛋白、多糖和酚类等杂质后加入乙醇沉淀即可分离得到高纯度的核酸[2]。而异硫氰酸胍和 SDS 都是蛋白质变性剂,只能使核酸-蛋白结构发生改变,对多糖、多酚等次生代谢物没有作用,只能通过其它有机试剂抽提来达到去除这些次生代谢物质的目的[11],因此在本实验中对多糖、多酚的去除效果较差。

### 3.3　叶状体的生长状态对总 RNA 提取的影响

由于 RNA 是 DNA 经过转录后形成的,转录后的 RNA 还需要经过加工,因此它们在空间上是分离的。而且 RNA 的寿命一般都很短,几乎在表达后就会自动降解。除此之外,在幼嫩的植株或生长旺盛的生命体中其 RNA 的含量会异常的多,因为在此期间,生物需要大量合成所需的物质以满足生长,而 RNA 是合成这些物质的模版。由此在分离坛紫菜叶状体总 RNA 时,首先要选择生长性状良好,而且比较幼嫩的植株,这样分离得到纯度高、质量好的 RNA 的机会就会大大增加。而如果选用了生长状态较差,已经开始衰老或者发生了病烂的植株,其 RNA 已经开始降解,不仅如此,很多次级代谢产物也会增多,这些都会影响到总 RNA 提取的结果。

### 参考文献:


[1] 张学成,秦松,马家海,等. 海藻遗传学[M]. 北京:农业出版社,2005.

[2] Michael G S, Helen E C. Extraction of plant RNA [J]. Methods in Molecular Biology, 2007, 362: 309 – 314.

[3] 徐民俊,茅云翔,庄筠昀,等. 条斑紫菜孢子体 cDNA 文库构建及表达序列标签的初步分析[J]. 大连水产学院学报,2006,21(1):7 – 12.

[4] 杨官品,刘永健,孙雪,等. 条斑紫菜丝状孢子体 cDNA 文库构建及抗病相关基因鉴定[J]. 青岛海洋大学学报,2003,33(1):47 – 55.

[5] 庞国兴,王广策,胡松年,等. 坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)丝状孢子体 EST 的获取及其生物信息学分析[J]. 海洋与湖沼,2005,36(5):452 – 459.

[6] Fan X L, Fang Y J, Hu S N, *et al*. Generation and analysis of 5318 expressed sequence tags from the filamentous sporophyte of *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta)[J]. Journal of Phycology, 2007, 43 (6):1287 – 1294.

[7] 胡晓静,何培民. 条斑紫菜丝状体总 RNA 提取方法比较[J]. 生物技术通讯,2007,8(4):604 – 607.

[8] Kakinuma M, Coury D A, Nakamoto C, *et al*. Molecular analysis of physiological responses to changes in nitrogen in a marine macroalga, *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta)[J]. Cell Biol Toxicol, DOI 10.1007/s10565.007.9053.7.

[9] Makoto K, Izumi K, Daniel A C, *et al*. Isolation and identification of gametogenesis-related genes in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) using subtracted cDNA libraries[J]. J Appl Phycol, 2006, 18:489 – 496.

[10] 王丽,沈颂东,李艳燕,等. 坛紫菜孢子体和配子体世代之间的 SSH 分析[J]. 海洋学报,2008,30(5):171 – 176.

[11] 郑晓飞. RNA 实验技术手册[M]. 北京:科学出版社,2004.

[12] Cox R A. Structure and function of prokaryotic and eukaryotic ribosomes[J]. Prog Biophs Mol Biol, 1977, 32(3):193.

[13] 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.

[14] Vanessa D R F, Angela P T, Mariana C O, *et al*. RNA isolation method for polysaccharide rich algae: agar producing *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta)[J]. J Appl Phycol, 2008, 20:9 – 12.

[15] 周波,张旸,李玉花. 富含多糖草莓果实总 RNA 提取方法的改进[J]. 生物技术通讯,2004,15(1):48 – 50.

[16] Yao J T, Fu W D, Wang X L, *et al*. Improved RNA isolation from *Laminaria japonica* Aresch (Laminariaceae, Phaeophyta)[J]. J Appl Phycol, 2009, 21: 233 – 238.

[17] Wang C S, Vodkin L O. Extraction of RNA from tissues containing high levels of procyanidins that bind RNA[J]. Plant Mol Biol Rep, 1994, 12:132 – 145.

[18] Su X, Gibor A. A method for RNA isolation from marine macro-algae[J]. Anal Biochem, 1988, 174: 650 – 657.

[19] Schneiderbauer A, Sandermann H J, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds[J]. Anal Biochem, 1991, 197: 91 – 95.

[20] Ains W C. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (sorrel)[J]. Plant Mol Biol Rep, 1994, 12:198 – 203.


PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

# Improvement and comparison of extraction methods of total RNA from thalli in *Porphyra haitanensis*

XIE Chao-tian, MEI Gao-shang, CHEN Chang-sheng*, JI De-hua
(*College of Fisheries, Jimei University, Xiamen* 361021, *China*)

**Abstract**: In order to develop a simple and efficient protocol for isolating total RNA from thalli of *Porphyra haitanensis*, three methods (CTAB method, SDS method, Guanidine thiocyante method) which were commonly used to isolate and purify total RNA were improved based on the methods of wiping off polysaccharides and polyphenol, and absorbency method, electrophoresis method and RT-PCR method were employed to determine the quality and quantity of RNA. RNA isolated by spin column kit method and RNAiso method was also compared with the RNA by the three methods. The results show the total RNA isolated by SDS method, guanidine thiocyante method and RNAiso method was of poor purity, retained some protein and polysaccharide and some RNA have dissolved into single nucleotide acid. But the total RNA which isolated by CTAB method and spin column kit method was of good quality and high purity, the substance which can restrain the active of reverse transcription enzyme also was cleared. These results suggest that CTAB method and spin column kit method are fit for the isolation of total RNA from the thalli of *P. haitanensis*, but each of the two methods has its advantages and disadvantages, we should choose the appropriate method based on the situation.

**Key words**: *Porphyra haitanensis*; thalli; RNA isolation; RT-PCT

**Corresponding author**: CHEN Chang-sheng. E-mail: cschen@jmu.edu.cn

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn