

一种简易的植物核酸提取方法*

——从干叶和新鲜叶中快速提取 RNA 和 DNA

施苏华 章 群 陈月琴 唐绍清 屈良鹤

(中山大学生命科学学院, 广州, 510275)

摘 要 本文介绍了一种植物核酸提取的简易方法, 该法只需在常温下按常规的分子生物学操作条件从已干燥的和新鲜的植物叶中快速提取总 RNA 和 DNA, 所获得的 RNA 和 DNA 能顺利用于下一步的 PCR、测序及小分子 RNA 研究等分子生物学实验.

关键词 植物核酸提取, 硅胶干燥保存, RNA 和 DNA

分类号 Q781

核酸提取是分子生物学研究最基本的一步. 从植物材料中提取核酸, 尤其是从乔木(如富含酚类化合物的松柏类等)材料中提取核酸有着较大的难度, 而从植物的干叶中提取 RNA 则曾经是不可能的. 现有的植物核酸提取方法很多, 但绝大多数方法都涉及到酚处理^[1~2]或 CTAB^[3~4], RNA 的提取则更要求绝对清洁和保持低温操作以防止 RNA 酶的降解作用^[5]. 本方法不需要采用以上两种毒性较大的试剂, 只需按常规的分子生物学实验要求在室温下进行操作, 不必将试管、离心管等作特殊的清洁处理, 如硅化等, 能成功地从各种类型的植物(如乔木(包括松柏类等)、草本(包括蕨类和苔藓)以及水生植物等等)的硅胶干燥叶和新鲜叶中提取出总 RNA(包括 26s, 18s 和小分子 RNA)和 DNA 来. 该方法简便而效率高, 所有步骤均在 1.5 mL 离心管中操作, 约 0.1~0.2 g 干叶和 0.2~0.3 g 新鲜叶能提取约 50 μ g 的核酸, 并能顺利用于 PCR 扩增(见图 1—6)、测序(图 2)以及小分子核 RNA 研究等进一步的实验. 整个过程只需 1.5~2 h 即可完成.

植物材料的干燥处理; ① 采集新鲜叶约 5 g, 放入可封口的塑料小袋中. 对于叶片较长的材料, 可以将其撕成小片, 去掉中脉, 再放入袋中. ② 袋中放入约 50 g 的硅胶(硅胶: 叶为 10:1). 如果 12 h 以内, 有些特别肉质或革质的叶不能彻底干燥, 则需更换硅胶, 继续干燥.

RNA 提取步骤: ① 取植物叶(干叶约 0.15 g, 新鲜叶约 0.25 g)加液氮研磨成细粉, 分装于 2 个 1.5 mL 离心管中, 各加 1 mL 提取缓冲液(100 m mol/L Tris, pH8.0; 50 m mol/L EDTA, 500 m mol/L NaCl; 10 m mol/L Mercaptoethanol)和 SDS(终浓度为 1%), 剧烈震荡 2

* 国家自然科学基金, 国家教委博士点基金, 中山大学科研基金资助项目

收稿日期: 1995-10-08 施苏华, 女, 38 岁, 副教授

min, 65℃, 保温 10~20 min. ② 加 5 mol/L KAc(终浓度为 1 mol/L), 震荡后冰浴 20 min, 8 000 r/min 离心 15 min. ③ 上清用绸布(380 目)过滤换管, 以 0.6 倍体积的异丙醇沉淀核酸, -20℃ 或室温 15 min. ④ 用 70% 和 100% 的乙醇洗沉淀 1 次, 晾干, 以 40 μL 重蒸水溶解, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检查(见图 1—1, 3, 4).

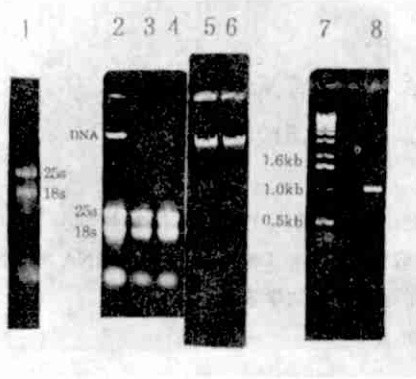


图 1 本方法所提取的核酸样品

Fig. 1 RNA and DNA isolation from silica-gel-dried and fresh leaves of plants

1 由硅胶干燥叶所提取的半枫荷(*Semiotium cathayensis*)的总 RNA; 2 由新鲜叶提取的马尾松(*Pinus massoniana*)总 DNA 和 RNA; 3, 4 由新鲜叶提取的马尾松和湿地松(*P. elliotii*)的总 RNA; 5, 6 加丙酮处理后提取的木贼麻黄(*Ephedra equisetina*)和西藏中麻黄(*Ephedra intermedia* var. *tibetica*)的 DNA; 7 1kb 的标准 DNA; 8 由该法所提木麻黄(*Casuarina equisetifolia*)DNA 经 PCR 扩增后的产物(1% 琼脂糖凝胶电泳, 1× TAE, 110V 电压, 室温, 约 1 h, EB 染色 5 min)

DNA 提取步骤与 RNA 提取方法基本相同, 不同之处在于: ① 加液氮研磨时间较 RNA 提取时长 2~3 min. 经验表明, 对于部分较难提取 DNA 的植物材料, 可在研磨时加少量(约 0.5g)灭菌石英砂, 以帮助破坏细胞壁, 效果显著. ② 在加提取缓冲液之前用预冷(-20℃)丙酮抽提二次后提取效果更好, 即加 1mL 预冷丙酮, 温和震荡 30 s, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 并重复以上步骤. 其它步骤同 RNA 提取. 若提取 DNA 中含有 RNA, 则需用 RNase 处理. 电泳检查结果见图 1—2, 5, 6. ③ 将 65℃ 保温时间延长到 20~30 min, 有利于 DNA 的提取.

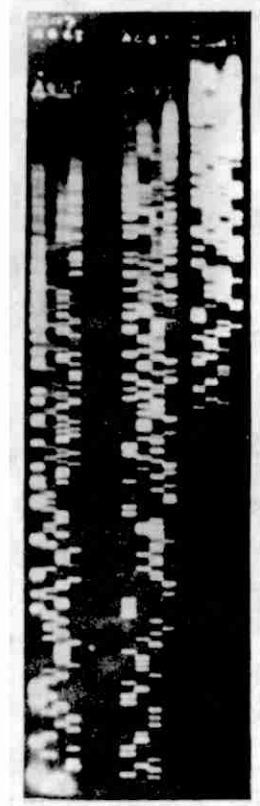


图 2 本方法所提小叶买麻藤(*Guetum parvifolium*) DNA 用于测序的结果

Fig. 2 The sequence of 26S rRNA 5' terminal region from *Guetum parvifolium* which DNA obtained following this protocol

图中序列为 26 s rDNA 5' 末端区的放射自显影图

参 考 文 献

- 1 Verwoerd T C, Dekker B M M, Hoekema A. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(6):2362~2363
- 2 Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull*, 1987, 19:11~25
- 3 Hillis D M, Larson A, Davis S K et al. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 1990, 318~370
- 4 Möller E M, Bahnweg G, Sandermann H et al. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(22):6115~6116

A Simple Method for Isolation of Total RNA and DNA from Silicagel-dried and Fresh Leaves of Plants

Shi Suhua * *Zhang Qun* *Chen Yueqin* *Tang Shaoqing* *Qu Lianghu*

Abstract A simple and rapid method was proposed for the isolation of total DNA and RNA from silicageldried leaves as well as fresh leaves of various groups of plants, without special clearing treatments of solutions, glassware and plasticware, and the use of poisonous phenol. This method is fairly suitable for the isolation of DNA and RNA from collection of plant leaves dried in silicagel in field which is convenient for international exchange. The isolated total DNA and RNA can be applied effectively in PCR, sequencing, SnRNA studies and other molecular biological researches.

Keywords efficient method, isolation, total DNA and RNA

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275