一种简捷提取植物总RNA的准备和操作方法*

崔秋红 罗 莹 祁晓廷**
(首都师范大学生命科学学院 北京 100048)

摘要 提取RNA是分子生物学实验中的常用技术,而RNA酶抑制程度成为提取RNA的主要决定因素。准备和操作不当造成的RNA酶污染是实验失败的重要原因。介绍一种简捷的"烧、烤"提取植物总RNA的准备和操作方法,可以有效地抑制外源RNA酶的污染,提取的RNA成功率很高。

关键词 RNA提取 RNA酶污染 烧 烤
中国图书分类号:Q343.2 文献标识码:B

提取RNA是分子生物学实验中的常用技术,在各种文献和专著中均有论述,但并没有详尽准备和操作方法以防止RNA酶的污染。RNA酶可来自提取的材料,也可来自外源的污染。RNA提取液中含有异硫氰酸胍等RNA酶变性剂,内源的RNA酶可以高效地被抑制,因此外源的RNA酶抑制程度成为提取RNA的主要决定因素。本实验室在长期实践的基础上总结出一种简捷的"烧、烤"提取植物总RNA的准备和操作方法,可以有效地抑制外源RNA酶的污染,提取的RNA成功率很高。

1 方法

以下操作均戴一次性手套和口罩。

1.1 器皿和耗材的处理

1)首先把提取RNA所用的研钵、不锈钢小铲、不锈钢盒、500 mL烧杯和1 L锥形瓶洗净,并用锡纸包好后在烘箱中200℃烘烤至少5 h。

2)待烧杯冷却后,加入300 mL重蒸水,在通风橱中加入300 μL DEPC(焦炭酸二乙酯),然后用在酒精灯火焰上烤过的玻璃棒搅拌,直到DEPC完全溶解。将离心管、枪头等浸入。特别注意的是离心管底部容易产生空气柱,应排除气泡以保证离心管充满DEPC,这样处理效果好。处理过夜后,将烧杯中的DEPC-H_2O倒入锥形瓶中(用于后续步骤中的材料冲洗和电泳),然后将离心管、枪头等转入不锈钢盒中,并摇动不锈钢盒将多余的水转入锥形瓶中。

3)将上述材料于121℃高压灭菌1 h,灭菌前把灭菌锅中的水换为新的蒸馏水。

1.2 RNA提取

1)提取RNA所用的植物材料需新鲜采取,之后用DEPC-H_2O冲洗3次,在灭菌的滤纸上吸干水分,然后研磨。这样可以除去植物材料表面的细菌等微生物。

2)植物材料的研磨和后续操作均在超净台里操作,点上酒精灯。打开和关闭离心管以及取枪头时均用长柄镊子,镊子在使用前用酒精擦拭并在酒精灯上烧过消毒。研钵和研磨棒在使用前用酒精灯火焰烤一下,然后用液氮冷却。上述操作可以避免外源细菌等微生物的污染。

3)移液器和离心机转头在使用之前用75%酒精擦洗消毒。实验过程中最好采用商品化的冰盒,而不是直接放在冰块上,这样可以避免冰融化后浸入离心管中。

1.3 RNA电泳检测

1)电泳槽的预处理:先用洗涤灵清洗电泳槽,之后用自来水和双蒸水冲洗,加入5% SDS溶液浸泡过夜后用DEPC-H_2O淋洗数次。齿梳和托子用0.1 mol NaOH浸泡6 h,然后用DEPC-H_2O冲洗3次。

2)琼脂糖凝胶制备:称取1.2 g琼脂糖加入2 mL 50×TAE,用DEPC-H_2O定容至100 mL,然后高压灭菌。在1.5 mL离心管中加入适量E.B(溴化乙锭)母液(1 mg/mL),再加入200 μL DEPC-

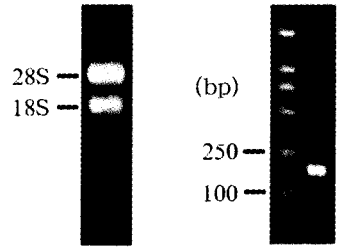
* 国家自然科学基金(30770181),北京市教委科技计划面上项目(08224010011),北京市优秀人才培养资助项目(20061D0501600234),北京市中青年骨干教师资助项目和首都师范大学生物综合实验技术教改项目资助

** 通讯作者

H_2O 处理过夜，将离心管放入小锥形瓶中高压灭菌，这样可以防止 RNA 酶污染。将处理过的 E.B 转入灭菌的琼脂糖凝胶中，摇匀后倒胶。

2 结果与讨论

按照以上实验准备和操作要点，首先采用植物总 RNA 提取试剂盒(北京博大泰克生物技术公司)提取了烟草叶片总 RNA。为了检测该 RNA的完整性，按照上述 RNA 电泳操作技术要点，获得的结果如图 a 所示，可以看出 RNA 28S 和 18S条带清晰，表明 RNA 没有降解。选用 TaKaRa mRNA Selective PCR kit 将 RNA 反转录成为cDNA，并扩增看家基因 β-肌动蛋白(Actin)基因片段。为了区分来自 cDNA(206 bp)和基因组 DNA(501 bp)的 PCR 产物，采用了跨内含子的引物。扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1b 所示，仅获得一条对应于 cDNA 的 RT-PCR 产物，说明反转录成功。



烟草叶片 RNA 电泳(a)和 Actin 基因 RT-PC

需要说明的是按照这种策略在多次成功实践基础上可以不进行繁杂的 RNA 电泳检测而直接进行反转录即可。

主要参考文献

1 印莉萍,祁小廷.细胞分子生物学技术教程(第 2 版).北京:科学出版社,2005:66—68.
2 卢圣栋等.现代分子生物学实验技术(第 2 版).北京:中国协和医科大学出版社,2001:65.
3 李宏,王新力. 植物组织 RNA 提取的难点及对策.生物技术通报,1999,15(1):36—39.
4 谷守芹,解灵君,范永山. 植物组织总 RNA 提取的常用方法及优化策略.保定师范专科学校学报,2005,18(02):40—43.
5 梁德勇,徐国恒,崔振中等. RNA 快速提取一步法的建立.北京医科大学学报,1999,31(5):461—463.
6 谭雪梅,申彦晶,严萍等. 何首乌总 RNA 提取方法的比较及改进.生物技术通讯,2008,19(3):414—416.
7 史公军,侯喜林,王彦华.植物组织 RNA 的几种提取方法.西南农业学报,2005,18(2):225—227.
8 张年辉,韦振泉,何军贤等.一种高效经济的高质量植物 RNA 提取方法.生物化学与生物物理进展,2004,31(10):947—950.
9 王玉成,张国栋,姜静.一种适用范围广的总 RNA 提取方法.植物研究,2006,26(1):84—87.
10 赵双宜,吴耀荣,夏光敏.介绍一种简单高效的植物总 RNA 提取方法.遗传,2002,24(3):337—338.

(祁晓廷　E-mail:qixiaoting@mail.cnu.edu.cn;
qxt-163@163.com)

问:蚊子为什么不能传播艾滋病

答:艾滋病的医学全名为“获得性免疫缺陷综合症(AIDS)”，它是由人类免疫缺陷病毒(HIV)引起的，艾滋病感染者的血液、精液、阴道分泌物、乳汁等都携带有病毒。艾滋病的传染性很强，它的传播途径主要有性接触、血液和母婴 3 种，共用注射器吸毒和性滥交是传播艾滋病的主要危险行为。因此，预防艾滋病要拒绝毒品、洁身自爱。众所周知，蚊子的叮咬会传染多种疾病，如疟疾、丝虫病等。由于蚊子叮咬人时都要吸血，因此，有很多人担心它会传播艾滋病。那么蚊子能传播艾滋病吗?根据研究表明，艾滋病病毒在蚊子体内既不发育也不繁殖，所以，不可能通过生物性的方式进行传播。而机械的传播方式在蚊子身上也不可行。因为，蚊子吸食人的血液是单向的，即吸入血后便不会再吐出。另外，蚊子嘴上残留的血液，因其仅有 0.00004 mL，要反复叮咬 2 800 次后，才能引起艾滋病病毒的感染。而且，即使蚊子吸入了带有艾滋病病毒的血液，艾滋病病毒在 2~3 d 内即可被蚊子消化、破坏而完全消失。根据蚊子的生理特点，蚊子一旦吸饱血后，要待完全消化后才会再叮人的血。目前，世界范围内尚未发现因蚊子或昆虫叮咬而感染艾滋病的报道。

南非是世界上艾滋病流行很严重的国家，也是热带蚊子活动非常猖獗的地方，蚊子在那里经常传播可怕的致命疾病，包括致命的埃波拉病毒，但从来没有报道因蚊子传播艾滋病。假如蚊子能传播艾滋病，南非到处都有蚊子，传染源(艾滋病人)又十分广泛，那么艾滋病的传播和流行就极为可怕，足可以毁灭人类，这是一个很简单而又非常现实的证据。所以，艾滋病只有性接触、血液和母婴 3 种传播途径，蚊子不会传播艾滋病。

主要参考文献

1 刘凌云,郑光美.普通动物学.北京:高等教育出版社,292—293.

管明星　(江苏省阜宁中学　江苏阜宁　224400)
(E-mail:fngmx@163.com)