

一种广泛适用的 RNA 提取方法*

淳 俊 郑彦峰 王胜华** 陈 放

(四川大学生命科学院, 成都 610064)

摘要 分离提取高质量的 RNA 是基因表达、调控与基因工程等研究的基础, 而 RNase、多糖及多酚类物质严重干扰 RNA 的分离提取过程。现利用硅藻土对 RNase 的吸附性, 结合 PVP、高盐及乙二醇丁醚沉淀等处理, 建立了一种广泛适用的 RNA 提取方法。在富含多糖的玉米胚乳, 富含 RNase 的动物肝脏, 多酚多油脂的银杏、麻疯树以及木霉、酵母等 10 多种 RNA 提取困难的动、植物与微生物材料中都提取出完整性好, 得率高的 RNA。RT-PCR 实验表明, 提取的 RNA 能够用于后续分子生物学研究。硅藻土-苯酚法提取 RNA 的得率是异硫氰酸胍法的 3 倍多。此外, 将分离提取的总 RNA 经过 LiCl 与 PEG8000 加 NaCl 沉淀步骤有效地去除了大片段 RNA, 以水稻 Osa-mir-156 的成熟序列设计特异引物做茎环 RT-PCR, 结果证明, 富集得到的小 RNA 可以用于 miRNA 克隆等后续实验。

关键词 硅藻土, RNA 提取, 小 RNA, 乙二醇丁醚

学科分类号 Q781

获得完整性良好的 RNA 一直都是致力于基因表达调控研究的分子生物学者所面临的挑战性课题。尽管已经建立起许多 RNA 分离提取方法^[1~3]并开发出若干 RNA 分离提取试剂盒, 但是, 仍有不少实验材料由于富含的 RNA 酶、多糖、多酚等物质或者降解 RNA, 或者与 RNA 形成难溶物等方式严重干扰 RNA 的提取^[4,5], 常常导致实验的失败。

另一方面, miRNA, snoRNA, snRNA 等小 RNA 是基因表达调控的重要分子, 广泛调控生物的发育、代谢以及抵抗异常 DNA(病毒、转座因子和某些高重复的基因组序列)的侵害及逆境适应性^[6,7]。有关小 RNA 与基因表达调控关系的研究以及基因工程与基因治疗等方面的应用研究已经成为国内外的研究热点^[8~10]。因此, 小 RNA 的分离纯化也是一项重要的基础工作。目前, 小 RNA 的提取是利用 SDS-PAGE 从总 RNA 中分离纯化^[11~13], 其纯化过程繁琐复杂, 得率低。

本文报道利用硅藻土能够有效吸附 RNA 酶^[14,15]的特性, 结合高盐、PVP 及乙二醇丁醚沉淀等过程, 建立了高效高质量 RNA 提取方法。该方法适用性广, 可以从富含 RNase 及多糖、多酚等代谢产物提取 RNA 困难的动、植物及微生物材料中提取高质量总 RNA, 通过结合 LiCl 与 PEG8000 加 NaCl 沉淀去除大片段 RNA, 有效富集了小 RNA。

1 材料和方法

1.1 实验材料

植物: 富含多酚的麻疯树幼叶、蓖麻树幼叶、乌桕树幼叶、银杏树幼叶、芦荟叶片, 富含多糖的灌浆期玉米胚乳, 水稻幼苗以及油脂丰富的麻疯树种子。动物: 富含 RNase 的家兔肝脏。微生物: 木霉、酵母。

1.2 主要仪器

冷冻离心机: Centrifuge 5804 R(Eppendorf 公司)。电泳仪: DYY-III 1 型稳压仪(北京六一仪器厂)。紫外凝胶成像系统: Bio IMAGING SYSTEM (SYNGENE)。紫外可见分光光度计: TU-1800(北京普析通用仪器有限责任公司)。PCR 仪: Personal cycler(Biometra 公司)。

1.3 方法

1.3.1 主要试剂。DEPC、EDTA 购自 Amresco 公

* 国家自然科学基金(30270090)和四川大学科研启动基金资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 028-85417281, E-mail: shwang200@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-09-13, 接受日期: 2007-11-05

司; 琼脂糖为 Sigma 公司产品; 硅藻土、水饱和酚 (pH 4.7)、氯仿、异戊醇、5 mol/L KAc (pH 4.8)、75%乙醇、无水乙醇、乙二醇丁醚、SDS、柠檬酸钠、Tris、HCl、2- 巯基乙醇、水不溶性聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、5 mol/L NaCl、8 mol/L LiCl、50% PEG 8 000、1 mol/L MgCl₂ 等均为国产分析纯试剂。

1.3.2 溶液制备.

a. 硅藻土的处理: 5 g 硅藻土用 50 ml 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6) 溶解, 于 100℃ 放置 5 min. 室温 2 500 g 离心 5 min. 弃上清, 沉淀用 40 ml 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6) 重悬. 重复离心和重悬的步骤两次. 超声 1 min. 室温 3 500g 离心 15 min. 沉淀用 30 ml 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6) 重悬^[16]. 4℃ 储存.

b. 硅藻土提取缓冲液: 20 mmol/L 柠檬酸钠 (pH 7.0), 10 mmol/L EDTA, 0.5% SDS, 1% 2- 巯基乙醇, 100 mmol/L NaCl, 1.9 g/L 处理过的硅藻土. (121℃ 高压灭菌 20 min, 冷却后再加入 1% 2- 巯基乙醇, 4℃ 保存).

c. 异硫氰酸胍提取缓冲液: 按文献[17]的方法进行.

实验所用的塑料制品均经氯仿处理 5 min 后, 121℃ 高压灭菌 20 min, 玻璃、陶瓷器皿 200℃ 干热灭菌 8 h.

1.3.3 总 RNA 的提取.

全过程均在冰上操作, 保持样品温度在 0~4℃.

a. 硅藻土 - 苯酚法. 样品液氮速冻, 于研钵中研磨成细微粉末并转入预冷的离心管, 按照 4 ml/g 的比例加入硅藻土提取缓冲液, 充分震荡后加入 1/2 体积的水饱和酚和 1/2 体积的氯仿: 异戊醇 (24:1), 震荡混匀. 4℃ 12 000g 离心 10 min, 取上清加入等体积 5 mol/L KAc (pH 4.8), 混匀后冰浴 10 min, 4℃ 13 000g 离心 10 min. 液相转入新管, 重复上述酚仿抽提, 直至界面清亮. 上清移入新管, 加入等体积乙二醇丁醚, 混合均匀后, 冰上放置 1 h. 4℃ 14 000 g 离心 15 min. 沉淀用 75%乙醇洗 2 次, 空气干燥后用适量 DEPC-H₂O 溶解, -70℃ 保存.

对于银杏等多酚材料则在研磨及加提取缓冲液过程中添加 2%~4% 的 PVP. 先进行氯仿抽提, 再酚 / 氯仿抽提, 其他同上.

b. 异硫氰酸胍法. 实验操作按照文献[17]的方法进行.

c. TRIZOL 法. 试剂盒购自 Invitrogen 公司, 实验方法按说明书进行.

1.3.4 RNA 完整性分析及质量检测.

a. RNA 电泳分析. RNA 的完整性用 1% 非变性琼脂糖凝胶电泳, 然后用紫外凝胶成像系统观察.

b. RNA 纯度鉴定. 取 1 μl 样品, 用 DEPC-H₂O 稀释 30 倍, 紫外分光光度计测量其在 230、260 和 280 nm 处的紫外吸光值(A). 每个样品重复 3 次, 取平均值. 以 A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} 比值做纯度分析^[18].

1.3.5 硅藻土 - 苯酚 - LiCl-PEG 法提取小 RNA. 水稻幼苗在液氮中研磨成粉末并倒入预冷的离心管, 根据样品质量按照 3~4 ml/g 的比例加入硅藻土提取缓冲液, 充分震荡混匀. 酚仿抽提后加入 1/3 体积的 8 mol/L LiCl, 混匀, -20℃ 放置至少 30 min. 2℃ 15 000g 离心 10 min. 上清用 50% PEG 8000 和 5 mol/L NaCl (每 400 μl 上清加入 50% PEG 8000 50 μl 和 5 mol/L NaCl 50 μl) 混匀, -20℃ 放置至少 30 min. 2℃ 15 000g 离心 10 min. 上清再重复一次 PEG-NaCl 沉淀步骤. 上清移入新管, 加入 2.5 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 1 mol/L MgCl₂, -20℃ 放置至少 2 h. 2℃ 15 000 g 离心 30 min. 弃液相, 沉淀用 75%乙醇洗 2 次, 干燥后溶于适量 DEPC-H₂O 中, -70℃ 保存备用.

1.3.6 RT-PCR.

RT-PCR 按 TaKaRa 公司 AMV 反转录酶操作手册进行. 所用引物 (由 TaKaRa 公司合成) 根据麻疯树 18 S 核糖体 RNA 基因序列设计^[19]. 5' 引物 P1, 5' ATT TCT GCC CTA TCA ACT TT 3', 3' 引物 P2, 5' CCA AGG TCC AAC TAC GAG C 3'. cDNA 模板在 94℃ 变性 4 min 后, 按 94℃ 30 s, 53℃ 1 min, 72℃ 1 min 程序扩增 35 个循环, 最后 72℃ 保温 10 min. 以未经反转录的 PCR 和不加模板的 RT-PCR 产物为对照. 扩增结束后于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测.

Osa-miR156 是已经证明可在水稻幼苗中检测出来的 miRNA^[20], 本研究用于验证小 RNA 富集方法的可靠性. 富集的水稻小 RNA 的 RT-PCR 实验依据序列 5' UGA CAG AAG AGA GUG AGC AC 3' (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index.shtml>) 设计 Osa-miR156 的茎环 RT 引物, 5' CTC AAC TGC GTG GAG TCG CAG TTG AGG TGC TCA C 3' 和一对 PCR 引物 (正向引物: 5' ACA CTC CAG CTG GGT GAC AGA AGA GAG TGA 3'

及反向引物: 5' CT CAA CTG CGT GGA GT 3', 方法参见文献[21]. 扩增片段大小为 60 bp 左右. RT-PCR 反应按 TaKaRa 公司 ExScript™ RT reagent Kit 说明书进行. RT-PCR 反应步骤为 42℃ 10 min, 95℃ 2 min. cDNA 模板在 95℃ 变性 4 min, 扩增 (95℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min) 35 个循环; 72℃ 保温 10 min. 以未经反转录的 PCR 和不加模板的 RT-PCR 产物为对照. 扩增结束后 1% 琼脂糖凝胶电泳检测.

2 结 果

2.1 硅藻土提取缓冲液配方筛选

在本方法设计过程中, 首先考虑的是缓冲剂的选择. 我们选用 H₂O、200 mmol/L 的 Tris-HCl^[22] 和 25 mmol/L 的柠檬酸钠^[19]. 由 1% 琼脂糖凝胶电泳图可以看出(图 1), 三种方案都可以从麻疯树叶片中提取出 RNA. 但是, 以柠檬酸钠为缓冲剂的提取产量最高, Tris-HCl 次之. 故而选定柠檬酸钠作为提取液中的缓冲剂成分, 进一步筛选最佳浓度. 实验设计了 5、10、15、20、25、30、35、40、45 mmol/L 等 9 种不同的柠檬酸钠浓度. 结果表明, 柠檬酸钠浓度在 15~30 mmol/L 范围时效果均很好, 表现为 RNA 条带清晰, 亮度高, 无弥散带, 28 S 条带是 18 S 条带的 2 倍(图 2). 在后续实验中选用缓冲剂柠檬酸钠的浓度为 20 mmol/L.

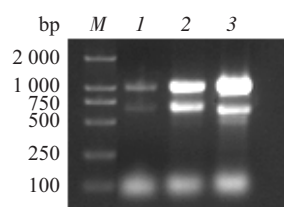


Fig. 1 Agarose electrophoresis of total RNA extracted by different extraction buffer

M: DNA marker; 1: H₂O; 2: 200 mmol/L Tris-HCl; 3: 25 mmol/L sodium citrate.

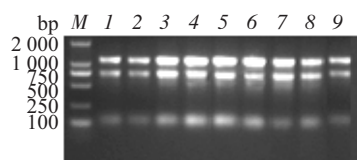


Fig. 2 Agarose electrophoresis of total RNA extracted by different concentration of sodium citrate in extraction buffer

M: DNA marker; 1: 5 mmol/L; 2: 10 mmol/L; 3: 15 mmol/L; 4: 20 mmol/L; 5: 25 mmol/L; 6: 30 mmol/L; 7: 35 mmol/L; 8: 40 mmol/L; 9: 45 mmol/L.

2.2 提取缓冲液中硅藻土浓度的确定

接下来考察 RNA 提取缓冲液中硅藻土的最佳浓度. 我们分别在 1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2 g/L 等不同的硅藻土浓度下提取麻疯树叶片的 RNA. 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 硅藻土浓度为 1.9 g/L 时 RNA 产量最高, 效果最好(图 3).

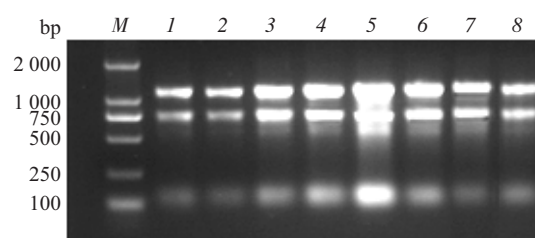


Fig. 3 Agarose electrophoresis of total RNA extracted by different concentration of macaloid suspension in extraction buffer

M: DNA marker; 1: 1.5 g/L; 2: 1.6 g/L; 3: 1.7 g/L; 4: 1.8 g/L; 5: 1.9 g/L; 6: 2.0 g/L; 7: 2.1 g/L; 8: 2.2 g/L.

2.3 RNA 沉淀试剂及沉淀时间的确定

RNA 提取过程中, 广泛应用的沉淀剂主要有无水乙醇、异丙醇. 最近的研究报道, 乙二醇丁醚具有不错的沉淀效果^[20]. 我们在建立本方法过程中也引入这 3 种沉淀剂沉淀 30 min. 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 乙二醇丁醚的沉淀效果最好(图 4).

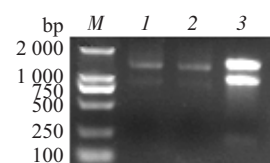


Fig. 4 Agarose electrophoresis of total RNA extracted by different precipitation reagent

M: DNA marker; 1~3: RNA precipitated respectively by ethanol, isopropanol and ethylene glycol monobutyl ether for 30 min.

在沉淀时间上, 10~60 min 范围内随着沉淀时间的加长, 乙二醇丁醚沉淀效果增强(图 5), 而沉淀 2 h 的效果基本与沉淀 1 h 相同.

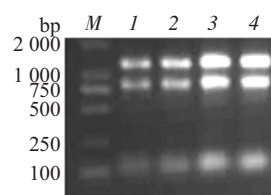


Fig. 5 Agarose electrophoresis of total RNA deposited by ethylene glycol monobutyl ether in different time

M: DNA marker; 1: 10 min; 2: 30 min; 3: 60 min; 4: 120 min.

2.4 离心时间的筛选

对于离心力大小与离心时间, 我们选用了 4℃ 12 000 *g* 及 13 000 *g* 离心 20 min, 选用 13 000 *g* 与 14 000 *g* 离心 15 min 等条件. 结果显示, 14 000 *g* 离心 15 min 的效果较好(图 6).

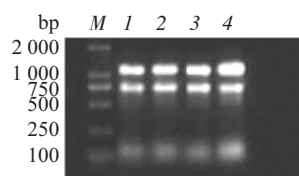


Fig. 6 Agarose electrophoresis of total RNA extracted in different centrifugal condition

M: DNA marker; *1*: 12 000 *g*, 20 min; *2*: 13 000 *g*, 15 min; *3*: 13 000 *g*, 20 min; *4*: 14 000 *g*, 15 min.

2.5 硅藻土-苯酚法与其他方法对比

与异硫氰酸胍法、TRIZOL 法等实验室常用方法比较, 本文建立的方法分离提取多糖、多酚的麻疯树绿色叶片 RNA 的效果明显较好(图 7).

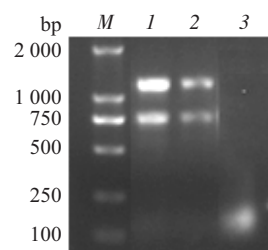


Fig. 7 Agarose electrophoresis of total RNA extracted by different methods

M: DNA marker; *1*~*3*: RNA extracted respectively by Macaloid-phenol, Guanidinium isothiocyanate and TRIZOL.

用紫外分光光度计分别检测 RNA 提取样品的 A_{230} 、 A_{260} 、 A_{280} 及 A_{260}/A_{280} 与 A_{260}/A_{230} 比值, 结果显示, 本文建立的方法与异硫氰酸胍法提取的 RNA 样品纯度都较高, 没有蛋白质及多糖和酚类物质的污染. 但本方法 RNA 得率很大, 每克材料可得 232.2 μg , 是异硫氰酸胍法的 3 倍多(表 1).

Table 1 Ratio of A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} of RNAs extracted by macaloid

Method	A_{230}	A_{260}	Yield($\mu\text{g/g}$)	A_{280}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Macaloid-phenol	0.268	0.387	232.2	0.193	2.005	1.444
Guanidinium isothiocyanate	0.074	0.126	75.6	0.063	2.000	1.703

* $P < 0.05$.

另一方面, 以硅藻土-苯酚法提取的 RNA 为模板, 用麻疯树 18 S rRNA 基因特异引物 P1、P2 做 RT-PCR, 能扩增出预期长度为 350 bp 的目的片段(图 8). 这说明硅藻土-苯酚法提取的 RNA 完整性好, 可以进一步用于后续实验.

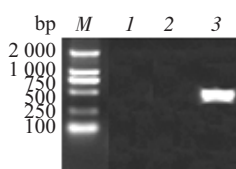


Fig. 8 Agarose electrophoresis of RT-PCR products

M: DNA marker; *1*: non-reverse-transcribed RNA; *2*: H_2O ; *3*: RNA extracted by macaloid-phenol method.

2.6 RNA 提取困难材料的提取效果

为了考察本方法的适应性, 我们提取了富含 RNase 的动物材料家兔肝脏, 富含油脂与多酚的麻疯树种子、乌柏、银杏、芦荟的绿色叶片, 灌浆期的玉米胚乳以及木霉等多种 RNA 提取困难的动、

植物及微生物材料(图 9), 另外还提取了水稻幼苗、麻疯树幼叶、蓖麻树幼叶等多种植物的 RNA, 都获得了很好的效果. 因此, 硅藻土-苯酚法具有广泛的适用性.

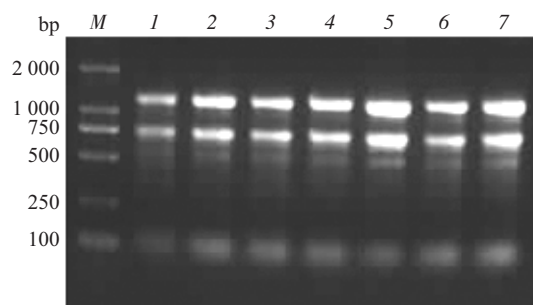


Fig. 9 Agarose electrophoresis of total RNA extracted from many materials by macaloid-phenol method

M: DNA marker; *1*: RNA extracted from rabbit liver; *2*: Seeds of *Jatropha curcas* L.; *3*: Young leaves of *Ginkgo biloba*; *4*: Maize endosperm; *5*: Young leaves of *Sapium sebiferum* L.; *6*: *Trichoderma*; *7*: Leaves of *Aloe Vera*.

2.7 硅藻土-苯酚-LiCl-PEG 法提取水稻幼苗小 RNA

在建立上述总 RNA 分离提取方法的基础上，我们利用提取的水稻总 RNA，通过高浓度 LiCl 及二步高浓度 PEG-NaCl 沉淀大片段 RNA，试图富集小 RNA。1%非变性琼脂糖凝胶电泳显示，大片段 RNA 被有效地清除了，小 RNA 得到很好地富集(图 10)，每克材料的得率为 14.032 μg。对所富集的水稻小 RNA 样品，根据文献[23]设计引物，RT-PCR 扩增检测是否存在 Osa-miR156 序列。电泳结果表明，扩增出的条带与预期的条带 60 bp 左右相符(图 11)。表明本方法提取的水稻小 RNA 含有 miRNA 等信息。

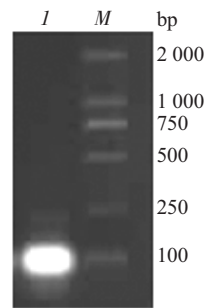


Fig. 10 Agarose electrophoresis of small RNA extracted by macaloid-phenol-LiCl-PEG method
M: DNA marker; I: Small RNA extracted by macaloid-phenol-LiCl-PEG method.

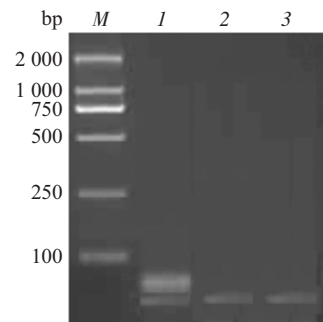


Fig. 11 Agarose electrophoresis of stem-loop RT-PCR from small RNA extracted by macaloid-phenol-LiCl-PEG method
M: DNA marker; I: Small RNA extracted by macaloid-phenol-LiCl-PEG method; 2: non-reverse-transcribed small RNA; 3: H₂O.

3 讨 论

RNA 酶、多糖、多酚等物质均是造成 RNA 难以成功提取的重要因素。RNA 酶分为外源 RNA 酶

和内源 RNA 酶两种，前者虽说无处不在，但是可以通过高温干烘、RNA 酶抑制剂(比如氯仿、DEPC 水等)处理、勤换手套、戴口罩等方法加以解决，但内源 RNA 酶来自样品组织内部，不能通过前期处理和小心预防的方法来清除,这就要求 RNA 提取过程中，抑制内源 RNA 酶活性。依据硅藻土可以有效吸附 RNA 酶的特点，我们在提取缓冲液中引入了硅藻土，从而避免了样品 RNA 被降解，结合酚仿抽提有效地去除了 RNA 酶等蛋白质，大大地提高了 RNA 提取的得率(表 1)。同时，在提取过程中，采用高浓度的 KAc 和乙二醇丁醚沉淀等步骤，有效地去除了多糖多酚类物质，从而建立了有效提取样品 RNA 的方案。实验中采用富含 RNase 的家兔肝脏，富含多糖的灌浆期玉米胚乳，富含多酚多油脂的银杏叶片、麻疯树种子、蓖麻树、乌桕树、芦荟叶片等植物材料，以及微生物材料木霉与酵母等提取 RNA 困难的材料中提取出了高质量 RNA，表明本方法具有广泛的适用性。

miRNA，siRNA 等小 RNA 通过碱基互补的方式抑制或降解 mRNA 靶标，从而调控基因的表达水平，控制生物的多种发育途径以及细胞凋亡和抵抗外来病原物的入侵等^[6, 7, 11, 24, 25]，并在临床的基因诊断与治疗上具有极大的应用前景^[26]。有报道认为基因组基因中至少有 1/3 的基因受 miRNA 的调控^[27, 28]。分离纯化小 RNA 是开展小 RNA 与基因表达调控关系以及基因诊断和治疗的前提。目前，小 RNA 的分离常用的方法是在分离总 RNA 的基础上利用 SDS-PAGE 回收。该方法路线程序多，步骤繁琐复杂，且得率低。我们在建立总 RNA 提取方法的基础上进一步通过 LiCl 与 PEG 8000 加 NaCl 沉淀等步骤有效去除了大片段 RNA，富集了小分子 RNA。利用发表序列设计引物做 RT-PCR 实验能够检测出成熟 miR156 序列，证明我们富集的小 RNA 能够用于后续分子生物学实验研究。小 RNA 的富集过程简单，每克材料的得率为 14.032 μg，富集效果大大优于尿素-SDS-PAGE 电泳回收法。

总之，本研究以硅藻土为基础建立起来的 RNA 分离提取方法可以经济、高效、高质量地分离总 RNA，适合于广泛生物材料，尤其是富含 RNase，富含多糖多酚等次生代谢产物用一般方法提取 RNA 困难的材料中分离提取 RNA。同时，本文描述的方法可进一步有效地富集小 RNA，富集过程简便、经济、易行。

参 考 文 献

- 1 Baker S S, Rugh C L, Kamalay J C. RNA and DNA isolation from recalcitrant plant tissues. *BioTechniques*, 1990, **9**(3): 268~272
- 2 Mullin A E, Soukatcheva G, Verchere C B, *et al.* Application of in situ ductal perfusion to facilitate isolation of high-quality RNA from mouse pancreas. *Biol Techniques*, 2006, **40**(5): 617~621
- 3 Levi A, Galau G A, Wetzstein H Y. A rapid procedure for the isolation of RNA from high-phenolic-containing tissues of pecan. *Hort Sci*, 1992, **27**(12): 1316~1318
- 4 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
Li H, Wang X L. *Biotechnology Information*, 1999, **15**(1): 36~39
- 5 Lewinsohn E, Steele C L, Croteau R. Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms. *Plant Mol Biol Rep*, 1994, **12**(1): 20~25
- 6 Sunkar R, Zhu J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell*, 2004, **16**(8): 2001~2019
- 7 Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, **57**(1): 19~53
- 8 Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**(2): 281~297
- 9 Carrington J C, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 2003, **301**(18): 336~338
- 10 Kidner C A, Martienssen R A. Macro effects of microRNAs in plants. *TRENDS in Genetics*, 2003, **19**(1): 13~16
- 11 Llave C, Kasschau K D, Rector M A, *et al.* Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, 2002, **14**(7): 1605~1619
- 12 Lau N C, Lim L P, Weinstein E G, *et al.* An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, **294**(26): 858~862
- 13 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 2001, **294**(26): 853~858
- 14 Picard D, Schaffner W. Correct transcription of a cloned mouse immunoglobulin gene in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**(2): 417~421
- 15 Even S, Lindley N D, Coccagn-Bousquet M. Molecular physiology of sugar catabolism in *Lactococcus lactis* IL1403. *J Bacteriology*, 2001, **183**(13): 3817~3824
- 16 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: laboratory manual*, 2nd. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 931~932
- 17 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天. *植物基因与分子操作*. 北京: 北京大学出版社, 1995. 74~92
Gu H Y, Qu L J, Ming X T. *Plant Genes and Molecular Manipulations*. Beijing: Beijing University Press, 1995. 74~92
- 18 郑晓飞. *RNA 实验技术手册*. 北京: 科学出版社, 2004. 129~131
Zheng X F. *RNA Experimental Technique Manual*. Beijing: Science Press, 2004. 129~131
- 19 张容等. 一种简单有效的植物 RNA 提取方法. *遗传*, 2006, **28**(5): 583~586
Zhang R, *et al.* *Genetics*, 2006, **28**(5): 583~586
- 20 Sunkar R, Girke T, Jain P K, *et al.* Cloning and characterization of microRNAs from rice. *Plant Cell*, 2005, **17**(5): 1397~1411
- 21 Chen C F, Ridzon D A, *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(20): e179
- 22 张年辉, 杜林方, 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
Zhang N H, Du L F, He J X, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31**(10): 947~950
- 23 Chen C F, Ridzon D A, *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(20): e179.
<http://nar.oxfordjournals.org/cgi/reprint/33/20/e179>
- 24 Moberg K H, Hariharam I K. Big things from a little RNA. *Trends Cell Biol*, 2003, **13**: 455~457
- 25 Hutvagner G, Zamore P D. A microRNA in a multiple turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 2002, **297**: 2056~2060
- 26 Lu J, Getz G, Miska E A, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human. *Nature*, 2005, **435**(9): 834~838
- 27 Mallory A C, Vaucheret H. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature Genetics*, 2006, **38**(6s): S31~S36
- 28 Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005, **120**(1): 15~20

A RNA Isolation Method Suitable for a Wide Range of Materials*

CHUN Jun, ZHENG Yan-Feng, WANG Sheng-Hua**, CHEN Fang

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract High levels of RNase, polysaccharides and polyphenol compounds make isolation of high quality RNA difficult. Thus it is presented an effective RNA extraction method based on the nuclease adsorbent macaloid, poly vinyl pyrrolidone, and high concentration of KAc and ethylene glycol monobutyl ether, which has successfully extracted high-quality RNA from many materials difficult to RNA isolation, such as RNase-rich rabbit liver, plant and microbial tissues rich in polysaccharides, lipids and polyphenol compounds. This method was found to be better than the ones in common use-Trizol and Guanidinium isothiocyanate, the yield of which was at least three time higher. Furtherly, small RNA was enriched from total RNA sample from rice seedling through by repeat deposit which deals with high concentration of LiCl, PEG8000 and NaCl. The small RNA gained was confirmed to be used for following molecular biological research by RT-PCR with the primers designed on osa-mir-156 sequence from rice miRNA.

Key words macaloid, RNA extraction, small RNAs, ethylene glycol monobutyl ether

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30270090) and Fund for Promoting Scientific Research from Sichuan University.

**Corresponding author.

Tel: 86-28-85417281, E-mail: shwang200@yahoo.com.cn

Received: September 13, 2007 Accepted: November 5, 2007