

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07H 21/02 (2006.01)
C07H 1/08 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410060637.6

[43] 公开日 2006年2月1日

[11] 公开号 CN 1727357A

[22] 申请日 2004.7.27

[21] 申请号 200410060637.6

[71] 申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

[72] 发明人 张献龙 朱龙付 涂礼莉 聂以春
郭小平 曾范昌 刘迪秋

[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所
代理人 王敏锋

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

[54] 发明名称

从棉花组织中抽取 RNA 的方法

[57] 摘要

本发明属于棉花分子生物学中 RNA 抽提技术领域。公开了一种新的利用硫氰酸胍 - 氯仿抽提, 酚纯化棉花 RNA 的抽提方法。针对棉花的酚类、多糖类等和次生代谢物质对抽提纯化高质量 RNA 样品的影响, 制备了新的裂解液和抽提工艺。利用高浓度的硫氰酸胍裂解细胞同时抑制细胞内源核酸酶的活性。该裂解液中含有聚乙烯吡咯烷酮 4000 和 β - 巯基乙醇, 用于抑制棉花中多酚类物质的氧化。利用氯仿抽提以除去部分多糖, 多酚和蛋白质。将粗提物用裂解液溶解后利用水饱和酚以更有效地去除多糖和蛋白质。本发明具有经济、快速、稳定的特点, 抽提的 RNA 样品质量较高。

1、一种从棉花组织抽提RNA的方法，其特征在于它包括以下步骤：

(1) 将1重量份的棉花组织，用清水洗净后或直接于液氮或玻璃匀浆器中研磨成粉，组织材料以体积/重量计按比例1:5-15与预冷的RNA抽提缓冲液混合并加入0-0.2份的 β -巯基乙醇和0.8-1.2份体积的醋酸钠上下颠倒以混匀，放置冰上，得到样品混合液；

(2) 将步骤(1)得到的混合液中加入等体积的氯仿，上下颠倒使混匀成一相，冰上放置10-15分钟后于4°C离心15分钟，回收上清液；

(3) 取步骤(2)的上清液，加入等体积的经-20°C的异丙醇，上下颠倒混匀，在-20°C中放置0.5-1小时来沉淀RNA，4°C离心15分钟得到沉淀物；

(4) 用1-5体积份的RNA抽提缓冲液将步骤(3)所得沉淀物彻底溶解，再加入1-5体积份的酸酚溶液，上下颠倒混匀，冰浴10-15分钟，4°C离心15分钟，回收上清液；

(5) 在步骤(4)的上清液中加入1-5体积份氯仿溶液，混匀并冰浴10-15分钟，4°C离心15分钟，回收上清；

(6) 在步骤(5)的上清中加入1/10体积的醋酸钠和2.5-3倍体积的无水乙醇，混匀，在-20°C中放置0.5-1小时来沉淀RNA，4°C离心15分钟得到沉淀物；

(7) 用75%的乙醇溶液洗步骤(6)的沉淀物2-3次，然后于室温放置5-10分钟使其干燥，得到纯RNA；

其中：所述的RNA抽提缓冲液是用472.64克的硫氰酸胍，7.352克的柠檬酸钠，5-10克的十二烷基肌氨酸钠，0.5-20克聚乙烯吡咯烷酮4000(PVP4000)加水至950毫升，用冰醋酸调pH6.0-6.5后加水定容到一升制备得到的；

所述的醋酸钠溶液是用408克的醋酸钠用水溶解，用冰醋酸调pH到5.0-5.2并加水定容到一升，经高压灭菌后制备得到；

所述的离心为9000 \times g-12000 \times g；

所述的氯仿溶液为24体积份的氯仿和1体积份的异戊醇混合而成；

所述的酸酚溶液为1体积份的水饱和酚(pH4.7-5.2)和1体积份的上述氯仿溶液混合而成；

所述的75%的乙醇是由3份的无水乙醇和1份的水混合而成；

所述的水为用0.1%的DEPC处理并经高压灭菌的纯水。

2、根据权利要求1所述的从棉花组织中抽提RNA的方法，其特征在于，其中的棉花组织选自棉花的根、下胚轴，叶片、幼苗、花、愈伤组织和纤维。

3、权利要求1所述的从棉花组织中抽提RNA的方法在棉花分子生物学上的应用。

从棉花组织中抽提 RNA 的方法

技术领域

本发明涉及棉花分子生物学技术领域。具体涉及从棉花组织中抽提与纯化用于分子生物学的 RNA 的方法。

背景技术

RNA 的抽提是进行分子生物学研究的基础。高质量 RNA 的获得对于功能基因组学以及遗传学研究具有重要意义。有关植物 RNA 的抽提方法较多, 现有的方法主要有硫氰酸胍-酚-氯仿抽提和纯化法、酚-SDS 法和 CTAB 法等几种, 其中硫氰酸胍-酚-氯仿抽提和纯化法在多种动、植物中抽提 RNA 上具有广泛的应用, 是一种有效、经济抽提 RNA 的方法。棉花是一种灌木类木本植物, 其组织和器官中富含多酚、多糖和次生代谢物质, 按照传统方法抽提 DNA、RNA 和蛋白质等抽提方法在棉花上应用比较困难。

近年来有关棉花生物大分子(例如 DNA、RNA 和蛋白质等)的分离纯化受到分子生物学技术领域科技人员的重视, 有关 DNA 的抽提方法的改良促进了棉花分子生物学在 DNA 水平的发展。近年来国内外有关从棉花组织和器官中抽提 RNA 的方法已有较多的报道, 如利用改良的热硼法(YingRu Wu 等., *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 213~218; 李继刚等, 棉花学报, 2004, 16(1): 3~7); CTAB 法(蒋建雄等, 棉花学报, 2003, 15(3): 166~167; 温小杰等, 分子植物育种, 2004, 2(1): 147~150), 酚-SDS 法(夏兰芹等, 棉花学报, 2000, 12(4): 205~207)等。改良热硼法结合了热硼法的粗抽和 RNA 纯化试剂盒的纯化, 从质量上保证了 RNA 以后的分子操作。但该方法抽提成本较高。蒋建雄等, 李继刚等, 夏兰芹等分别用改良的 CTAB 法、热硼法和酚-SDS 法来抽提棉花组织的总 RNA, 他们主要是通过多次高浓度的 LiCl 长时间或过夜的沉淀来提高 RNA 样品的质量, 因此整个抽提过程(时间)较长。由于抽提时间过长, 将大大增加了 RNA 被降解的可能性。

硫氰酸胍-酚-氯仿的 RNA 抽提法在多种植物中广泛应用, 但蒋建雄, 徐亚浓, 夏兰芹等多位学者在研究中发现传统的硫氰酸胍-酚-氯仿抽提法在棉花中不能或不适合于 RNA 的抽提(蒋建雄等, 棉花学报, 2003, 15(3): 166~167; 夏兰芹等, 棉花学报, 2000, 12(4): 205~207)。王文锋等针对棉花中次生物质(如多酚类)的生理生化特点提出了利用高 pH 值而非传统的低 pH 值的来改良硫氰酸胍-酚-氯仿抽提法以适应棉花组织。高 pH 值的应用对于棉花多酚的氧化有一定的效用, 但抽提过程中 DNA 和 RNA 在高 pH 值的缓冲液同时存在, 还需进一步去除 DNA。

众所周知, 棉花中的多酚、多糖及次生代谢物的影响, 相对于其它植物如水稻, 油菜等作物, 从富含多酚棉花在 RNA 抽提过程中会遇到较多的困难。这主要表现在多酚的氧化、多糖与核酸的共沉淀、次生代谢物及蛋白质的去除等几个方面。多酚在细胞破裂后极易氧化并形成醌等衍生物, 这些物质可以与核酸不可逆的结合并与核酸共沉淀或者被有机溶剂如氯仿和酚等抽提。这将大大影响 RNA 的质和量并对以后相关分子生物学操作形成障碍。由于未知因素的影响, 在 DNA 和 RNA 抽提起始阶段不能利用苯酚来去除多糖和蛋白质。因此传统硫氰酸胍-酚-氯仿抽提和纯化法不能在棉花上有效应用。而单独利用氯仿抽提得到的核糖核酸中含有较多的多糖和蛋白质, 影响核糖核酸的质量。同时由于没有利用酚的纯化, 利用所得到的

核酸中同时会含有次生代谢物质，这可能是以后的分子操作如 RNA 的反转录效率低下的原因。由于这些客观因素的限制，获得高质量的核酸也就成了进行棉花分子生物学研究首要解决的问题。

现有的从棉花组织中抽提 RNA 的技术中普遍采用的硫氰酸胍-酚抽提-氯仿抽提顺序不适合于棉花组织 RNA 的抽提，采用现有技术，在酚抽提过程中 RNA 容易流失，不能满足棉花的分子生物学研究。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术的缺陷，建立一种新的从棉花组织中抽提高质量 RNA 的方法，该方法采用硫氰酸胍-氯仿抽提，样品沉淀并溶解后再用酚纯化，以获取棉花组织高质量的 RNA 样品。本发明的方法快速、经济，适用于棉花分子生物学操作。利用本方法可以同时从裂解液中长期保存组织样品，并较好地保证 RNA 样品不被降解。

本发明人经过大量的研究对比和实验，研制出满足本发明目的的一种从棉花组织中抽提 RNA 的方法。它包括下述步骤：

(1) 匀浆：取 1 重量份的棉花组织，用清水洗净后或直接用液氮或玻璃匀浆器中研磨成粉，组织材料以体积 / 重量计按比例 1:5-15 与预冷的 RNA 抽提缓冲液 (pH6.0-6.5) 混合并加入 0-0.2 份的 β -巯基乙醇和 0.8-1.2 份体积的醋酸钠 (pH 5.0-5.2) 上下颠倒以混匀，放置冰上，得到样品混合液；

(2) 将步骤 (1) 得到的样品混合液中加入等体积的氯仿，上下颠倒使混匀成一相，冰上放置 10-15 分钟后于 4° C 离心 15 分钟，回收上清液；

(3) 取步骤 (2) 的上清液，加入等体积的冷冻 (-20° C) 异丙醇，上下颠倒混匀，在 -20° C 中放置 0.5-1 小时来沉淀 RNA，4° C 离心 15 分钟得到沉淀物；

(4) 用 1-5 体积份的 RNA 抽提缓冲液 (pH6.0-6.5) 将步骤 (3) 所得沉淀物彻底溶解，再加入 1-5 体积份的酸酚溶液 (pH 4.7-5.2)，上下颠倒混匀，冰浴 10-15 分钟，4° C 离心 15 分钟，回收上清液；

(5) 在步骤 (4) 的上清液中加入 1-5 体积份氯仿溶液，混匀并冰浴 10-15 分钟，4° C 离心 15 分钟，回收上清液；

(6) 在步骤 (5) 的上清液中加入 1/10 体积的醋酸钠 (pH 5.0-5.2) 和 2.5-3 倍体积的无水乙醇，混匀，在 -20° C 中放置 0.5-1 小时来沉淀 RNA，4° C 离心 15 分钟得到沉淀物；

(7) 用 75% 的乙醇洗步骤 (6) 的沉淀 2-3 次，然后于室温放置 5-10 分钟使其干燥，这样得到本发明的纯 RNA。

其中：所述的 RNA 抽提缓冲液是用 472.64 克的硫氰酸胍，7.352 克的柠檬酸钠，5-10 克的十二烷基肌氨酸钠，0.5-20 克聚乙烯吡咯烷酮 4000 (PVP4000) 加水至 950 毫升，调 pH6.0-6.5 后加水定容到一升抽提得到的；

所述的醋酸钠溶液是用 408 克的醋酸钠用水溶解，用冰醋酸调 pH 5.0-5.2 并加水定容到一升，经高压灭菌后抽提得到；

所述的离心为 $9000 \times g$ - $12000 \times g$ ；

所述的氯仿溶液为 24 体积份的氯仿和 1 体积份的异戊醇混合而成；

所述的酸酚溶液 (pH4.7-5.2) 为 1 体积份的水饱和酚 (pH4.7-5.2) 和 1 体积份的上述氯仿溶液混合而成；

所述的75%的乙醇是由3份的无水乙醇和1份的水混合而成；

所述的水为用0.1%的DEPC处理并经高压灭菌的纯水。

优选地，所用的棉花组织材料是新鲜的，健康的，对于根组织则应先用清水洗净。

本发明的有益效果是：

本发明对传统的硫氰酸胍-酚-氯仿RNA抽提法作了许多改进工作：

在RNA抽提缓冲液中加入了聚乙烯吡咯烷酮4000，并可根据材料中多酚的含量适当调整其用量，并且还利用了 β -巯基乙醇有效防止了多酚的氧化。

在组织样品与RNA抽提缓冲液混合后可以在超低温冰箱长时间保存并保证了RNA的完整性，解决了RNA只能利用新鲜组织的限制。

在利用氯仿溶液对样品混合液进行了第一次的抽提后利用异丙醇进行了一次RNA粗抽物的沉淀，一方面有效减少了后续操作中溶液的体积，同时通过氯仿的抽提减少了溶液中次生代谢物质的含量。

与传统的硫氰酸胍-酚-氯仿不同，本发明创新之处在于先用氯仿抽提，再用异丙醇沉淀得到粗提物RNA后再利用酚和氯仿抽提来纯化，最后用乙醇沉淀还有效减少了多糖的共沉淀，提高了RNA的质量。

本发明对于棉花的不同组织都适用。已经利用本发明从棉花的叶片（例如子叶，真叶），根，愈伤组织，花（花瓣或花蕾），下胚轴，纤维等不同组织中成功抽提出高质量的RNA。

本发明经济，高效。本发明所使用的药品大都为普通的生化试剂，价格低廉，没有利用试剂盒或昂贵的药品。从时间上来看，没有过夜沉淀或长时间处理，一般一个工作日内即可完成全部实验。

附图说明

图1 海岛棉幼苗接种黄萎病菌后从根部抽提的总RNA在非变性的琼脂糖胶上的电泳（1X TAE，1.5%）

图2 棉花不同组织来源的总RNA在变性的琼脂糖胶上的电泳（1x MOPS，1.5%）。图中的组织来源分别为：1-6为根，7-8为下胚轴，9-12为真叶。

图3 棉花根部总cDNA的电泳图。1为总cDNA，M为分子量标准（#SM0321，MBI）。

图4 根部全长cDNA文库部分克隆的插入片段电泳。图中1到32为不同的克隆cDNA插入片段，M为分子量标准（#SM0321，MBI）。

图5 棉花抗病相关基因基因（AY560551）的RT-PCR和基因组PCR检测。样品1-10为cDNA模板，样品11为基因组DNA模板；M为分子量标准（#SM0321，MBI）。

图6 棉花线虫诱导表达基因MIC-3受黄萎病诱导表达的northern blotting结果。1为棉花未接种病原对照；2-9分别为棉花接种黄萎病后1小时、2小时、4小时、8小时、12小时、24小时、48小时、72小时时的表达情况。

具体实施方式

实施例1：利用棉花根抽提RNA样品

（1）取新鲜的棉花根2克，用清水洗净后用液氮将其研磨成粉末；快速将样品转移至离心管中，并加入20毫升预冷的RNA抽提缓冲液（pH6.0）（含0.5% PVP4000）和200微升 β -巯基乙醇，上下颠倒以混合均匀，加入2毫升的醋酸钠，混合均匀；

(2) 加入等体积的氯仿溶液, 上下颠倒混匀使其成为均匀的一相, 于冰上放置15分钟, 4° C, 12000×g 离心15分钟, 回收上清液;

(3) 取上清液到新管中, 加入等体积的冷冻(-20° C) 异丙醇来沉淀RNA, 于-20° C冰箱中放置30分钟, 4° C, 10000 ×g 离心15 分钟;

(4) 弃去上清液, 将沉淀用3mlRNA抽提缓冲液彻底溶解, 再加入3毫升的酸酚溶液(pH 4.7-5.2), 上下颠倒混匀, 冰浴15分钟, 4° C, 12000 ×g 离心15分钟, 回收上清液;

(5) 用在步骤(4)的上清液中加入3毫升氯仿溶液, 混匀并冰浴15分钟, 4° C 12000 ×g离心15分钟, 回收上清液;

(6) 在步骤(5)的上清液中加入上清液中加入1/10体积的醋酸钠(pH 5.0)和2.5倍体积的无水乙醇, 混匀, 在-20° C中放置0.5小时来沉淀RNA, 4° C, 10000 ×g 离心15分钟得到沉淀物;

(7) 用75%的乙醇洗对步骤(6)的沉淀洗涤2次, 然后于室温放置5-10分钟使其干燥, 这样得到本发明的纯RNA。

欢迎用本实施例, 得到棉花RNA样品总量为820微克, 产率为410微克/克

质量检测: RNA经电泳检测保持完整, 其 $A_{260/280}=1.85$, 满足分子生物学实验需要。

实施例 2: 利用棉花真叶抽提 RNA 样品

(1) 取新鲜的棉花真叶1克, 用液氮将其研磨成粉末; 快速将样品转移至离心管中, 并加入15毫升预冷的RNA抽提缓冲液(pH6.5)(含2% PVP4000)和200微升β-巯基乙醇, 上下颠倒以混合均匀, 加入1毫升的醋酸钠, 混合均匀;

(2) 加入等体积的氯仿溶液, 上下颠倒混匀使其成为均匀的一相, 于冰上放置15分钟, 4° C, 12000×g 离心15分钟, 回收上清液;

(3) 取步骤(2)的上清液到新管中, 加入等体积的冷冻(-20° C) 异丙醇来沉淀RNA, 于-20° C冰箱中放置1小时, 4° C, 12000 ×g 离心15 分钟, 回收沉淀;

(4) 弃去上清液, 将沉淀用5mlRNA抽提缓冲液彻底溶解, 再加入5毫升的酸酚溶液(pH 4.7-5.2), 上下颠倒混匀, 冰浴15分钟, 4° C, 12000 ×g 离心15分钟, 回收上清液;

(5) 用在步骤(4)的上清液中加入5毫升氯仿溶液, 混匀并冰浴15分钟, 4° C 12000 ×g离心15分钟, 回收上清液;

(6) 在步骤(5)的上清液中加入上清液中加入1/10体积的醋酸钠(pH5.2)和3倍体积的无水乙醇, 混匀, 在-20° C中放置0.5小时来沉淀RNA, 4° C 12000 ×g离心15分钟得到沉淀物;

(7) 用75%的乙醇洗对步骤(6)的沉淀洗涤3次, 然后于室温放置5-10分钟使其干燥, 这样得到本发明的纯RNA。

应用本实施例得到棉花RNA样品总量为730微克, 产率为730微克/克

质量检测: RNA经电泳检测保持完整, 其 $A_{260/280}=1.74$, 满足分子生物学实验需要。

实施例 3: 从棉花愈伤组织中抽提 RNA 样品

(1) 取新鲜的棉花愈伤0.3克放入玻璃匀浆器, 并加入3毫升预冷的RNA抽提缓冲液(pH6.3)(含0.5% PVP4000), 将其研磨, 加入0.24毫升的醋酸钠, 混合均匀, 倒入离心管中;

(2) 加入等体积的氯仿溶液，上下颠倒混匀使其成为均匀的一相，于冰上放置10分钟，4° C，12000×g离心10分钟，回收上清液；

(3) 取步骤(2)的上清液到新管中，加入等体积的冷冻(-20° C)异丙醇来沉淀RNA，于-20° C冰箱中放置0.5小时，4° C，10000×g离心10分钟，回收沉淀；

(4) 弃去上清液，将沉淀用0.5mlRNA抽提缓冲液彻底溶解，再加入0.5毫升的酸酚溶液(pH 4.7-5.2)，上下颠倒混匀，冰浴10分钟，4° C，12000×g离心15分钟，回收上清液；

(5) 用在步骤(4)的上清液中加入0.5毫升氯仿溶液，混匀并冰浴10分钟，4° C 12000×g离心15分钟，回收上清液；

(6) 在步骤(5)的上清液中加入上清液中加入1/10体积的醋酸钠(pH 5.0)和2.5倍体积的无水乙醇，混匀，在-20° C中放置1小时来沉淀RNA，4° C 10000×g离心15分钟得到沉淀物；

(7) 用75%的乙醇洗对步骤(6)的沉淀洗涤2次，然后于室温放置5-10分钟使其干燥，这样得到本发明的纯RNA。

应用本实施例得到棉花RNA样品总量为338微克，产率为1014微克/克

质量检测：RNA经电泳检测保持完整，其 $A_{260/280}=1.92$ ，满足分子生物学实验需要。

实施例 4：从棉花花中抽提 RNA 样品

(1) 取新鲜的棉花花瓣0.8克，用液氮将其研磨成粉末；快速将样品转移至离心管中，并加入12毫升预冷的RNA抽提缓冲液(pH6.4)(含2% PVP4000)，加160微升β-巯基乙醇，上下颠倒以混合均匀，加入0.9毫升的醋酸钠，混合均匀；

(2) 加入等体积的氯仿溶液，上下颠倒混匀使其成为均匀的一相，于冰上放置15分钟，4° C，12000×g离心10分钟，回收上清液；

(3) 取步骤(2)的上清液到新管中，加入等体积的冷冻(-20° C)异丙醇来沉淀RNA，于-20° C冰箱中放置0.5小时，4° C，10000×g离心15分钟，回收沉淀；

(4) 弃去上清液，将沉淀用6mlRNA抽提缓冲液彻底溶解，再加入6毫升的酸酚溶液(pH 4.7-5.2)，上下颠倒混匀，冰浴15分钟，4° C，12000×g离心15分钟，回收上清液；

(5) 用在步骤(4)的上清液中加入6毫升氯仿溶液，混匀并冰浴15分钟，4° C 12000×g离心15分钟，回收上清液；

(6) 在步骤(5)的上清液中加入上清液中加入1/10体积的醋酸钠(pH 5.2)和3倍体积的无水乙醇，混匀，在-20° C中放置1小时来沉淀RNA，4° C 10000×g离心15分钟得到沉淀物；

(7) 用75%的乙醇洗对步骤(6)的沉淀洗涤3次，然后于室温放置5-10分钟使其干燥，这样得到本发明的纯RNA。

应用本实施例得到棉花RNA样品总量为435微克，产率为544微克/克

质量检测：RNA经电泳检测保持完整， $A_{260/280}=1.83$ ，满足分子生物学实验需要。

实施例 5：从棉花的下胚轴中抽提 RNA 样品

(1) 取新鲜的棉花下胚轴0.2克，放入玻璃匀浆器，并加入3毫升预冷的RNA抽提缓冲液(pH6.5)(含1% PVP4000)和40微升β-巯基乙醇，将其研磨，加入0.2毫升的醋酸钠，混合均匀，倒入离心管中；

(2) 加入等体积的氯仿溶液, 上下颠倒混匀使其成为均匀的一相, 于冰上放置15分钟, 4° C, 12000 × *g* 离心15分钟, 回收上清液;

(3) 取步骤(2)得到的上清液到新管中, 加入等体积的冷冻(-20° C)异丙醇来沉淀RNA, 于-20° C冰箱中放置0.5小时, 4° C, 12000 × *g* 离心15分钟, 回收沉淀;

(4) 弃去步骤(3)剩余的上清液, 将沉淀用0.6ml RNA抽提缓冲液彻底溶解, 再加入0.6毫升的酸酚溶液(pH 4.7-5.2), 上下颠倒混匀, 冰浴15分钟, 4° C, 12000 × *g* 离心15分钟, 回收上清液;

(5) 用步骤(4)得到的上清液中加入0.6毫升氯仿溶液, 混匀并冰浴15分钟, 4° C 12000 × *g*离心15分钟, 回收上清液;

(7) 用步骤(5)得到的上清液中加入上清液中加入1/10体积的醋酸钠(pH 5.0)和3倍体积的无水乙醇, 混匀, 在-20° C中放置0.5小时来沉淀RNA, 4° C 10000 × *g*离心15分钟得到沉淀物;

7 用75%的乙醇洗对步骤(6)的沉淀洗涤3次, 然后于室温放置5-10分钟使其干燥, 这样得到本发明的纯RNA。

应用本实施例, 得到棉花RNA样品总量为95微克, 产率为475微克/克

质量检测: RNA经电泳检测保持完整, 其 $A_{260/280}=1.78$, 满足分子生物学实验需要。

实施例6: 从新鲜棉纤维中抽提 RNA 样品

(1) 从新鲜的棉铃中剥取受粉后10天的棉花纤维0.2克, 放入玻璃匀浆器, 并加入3毫升预冷的RNA抽提缓冲液(pH6.4)(含1% PVP4000)和30微升β-巯基乙醇, 将其研磨, 加入0.2毫升的醋酸钠, 混合均匀, 倒入离心管中;

(2) 加入等体积的氯仿溶液, 上下颠倒混匀使其成为均匀的一相, 于冰上放置15分钟, 4° C, 12000 × *g* 离心15分钟, 回收上清液;

(3) 取步骤(2)的上清液到新管中, 加入等体积的冷冻(-20° C)异丙醇来沉淀RNA, 于-20° C冰箱中放置0.5小时, 4° C, 12000 × *g* 离心15分钟, 回收沉淀;

(4) 弃去上清液, 将沉淀用0.6ml RNA抽提缓冲液彻底溶解, 再加入0.6毫升的酸酚溶液(pH 4.7-5.2), 上下颠倒混匀, 冰浴15分钟, 4° C, 12000 × *g* 离心15分钟, 回收上清液;

(5) 用在步骤(4)的上清液中加入0.6毫升氯仿溶液, 混匀并冰浴15分钟, 4° C 12000 × *g*离心15分钟, 回收上清液;

(6) 在步骤(5)的上清液中加入上清液中加入1/10体积的醋酸钠(pH 5.1)和2.5倍体积的无水乙醇混匀, 在-20° C中放置0.5小时来沉淀RNA, 4° C 10000 × *g*离心15分钟得到沉淀物;

(7) 用75%的乙醇洗对步骤(6)的沉淀洗涤3次, 然后于室温放置5-10分钟使其干燥, 这样得到本发明的纯RNA。

应用本实施例, 得到RNA总量为96微克, 产率为480微克/克

质量检测: RNA保持完整, $A_{260/280}=1.88$, 满足分子生物学实验需要。

实施例7: 从棉花幼苗中抽提 RNA 样品

(1) 取新鲜的棉花幼苗整株3克, 用液氮将其研磨成粉末; 快速将样品转移至离心管中, 并加入45毫升预冷的RNA抽提缓冲液(pH6.2)(含2% PVP4000)和600微升β-巯基乙醇, 上下颠倒以混合均匀, 加入4.5

毫升的醋酸钠，混合均匀；

(2) 将步骤(1)中的混合液平分为两等份，每份放于一新管中，每管中加入等体积的氯仿溶液，上下颠倒混匀使其成为均匀的一相，于冰上放置15分钟，4° C，12000×*g*离心15分钟，回收上清液；

(3) 取步骤(2)的两管上清液到两新管中，分别加入等体积的冷冻(-20° C)异丙醇来沉淀RNA，于-20° C冰箱中放置1小时，4° C，12000×*g*离心15分钟，回收沉淀；

(4) 弃去上清液，将每管沉淀用7.5mlRNA抽提缓冲液彻底溶解，将两管溶液合并为一管，加入15毫升的酸酚溶液(pH 4.7-5.2)，上下颠倒混匀，冰浴15分钟，4° C，12000×*g*离心15分钟，回收上清液；

(5) 用在步骤(4)的上清液中加入15毫升氯仿溶液，混匀并冰浴15分钟，4° C 12000×*g*离心15分钟，回收上清液；

(6) 在步骤(5)的上清液中加入上清液中加入1/10体积的醋酸钠(pH5.2)和2.5倍体积的无水乙醇，混匀，在-20° C中放置1小时来沉淀RNA，4° C 12000×*g*离心15分钟得到沉淀物；

(7) 用75%的乙醇洗对步骤(6)的沉淀洗涤3次，然后于室温放置5-10分钟使其干燥，这样得到本发明的纯RNA。

应用本实施例，得到棉花根RNA总量为1650微克，产率为550微克/克

质量检测：RNA经电泳检测保持完整，其 $A_{260/280}=1.77$ ，满足分子生物学实验需要。

实施例8：从长期保存在裂解液中棉花根中抽提RNA样品

(1) 取新鲜的棉花根1克，用清水洗净后用液氮将其研磨成粉末；快速将样品转移至离心管中，并加入10毫升预冷的RNA抽提缓冲液(pH6.5)和200微升β-巯基乙醇，上下颠倒以混合均匀，将其用液氮快速冷冻后放入-73° C冰箱中保存15天；

(2) 将冷冻的材料混和液放于冰上融化，加入1毫升醋酸钠，加入等体积的氯仿溶液，上下颠倒混匀使其成为均匀的一相，于冰上放置15分钟，4° C，12000×*g*离心15分钟，回收上清液；

(3) 取上清液到新管中，加入等体积的冷冻(-20° C)异丙醇来沉淀RNA，于-20° C冰箱中放置30分钟，4° C，10000×*g*离心15分钟；

(4) 弃去上清液，将沉淀用2mlRNA抽提缓冲液彻底溶解，再加入2毫升的酸酚溶液(pH 4.7-5.2)，上下颠倒混匀，冰浴15分钟，4° C，12000×*g*离心15分钟，回收上清液；

(5) 用在步骤(4)的上清液中加入2毫升氯仿溶液，混匀并冰浴15分钟，4° C12000×*g*离心15分钟，回收上清液；

(6) 在步骤(5)的上清液中加入上清液中加入1/10体积的醋酸钠(pH 5.0)和2.5倍体积的无水乙醇，混匀，在-20° C中放置0.5小时来沉淀RNA，4° C，10000×*g*离心15分钟得到沉淀物；

(7) 用75%的乙醇洗对步骤(6)的沉淀洗涤2次，然后于室温放置5-10分钟使其干燥，这样得到本发明的纯RNA。

应用本实施例，得到RNA总量为370微克，产率为370微克/克

质量检测：RNA经电泳检测保持完整，其 $A_{260/280}=1.82$ ，满足分子生物学实验需要。

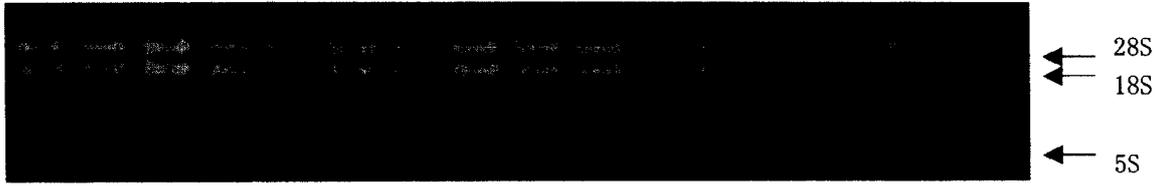


图1

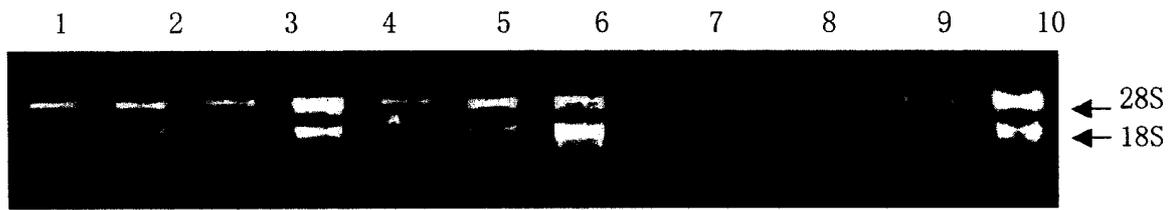


图2

图3

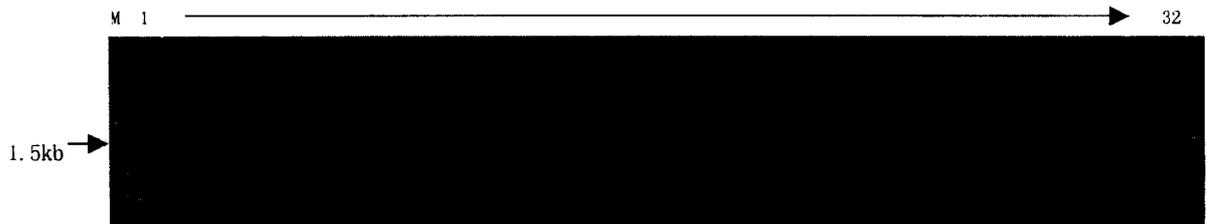
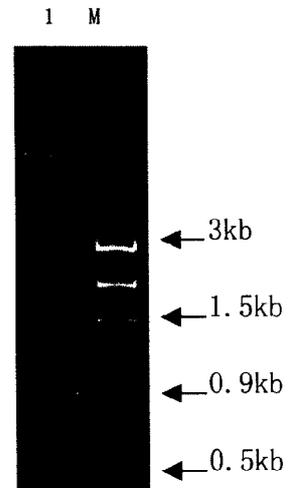


图4

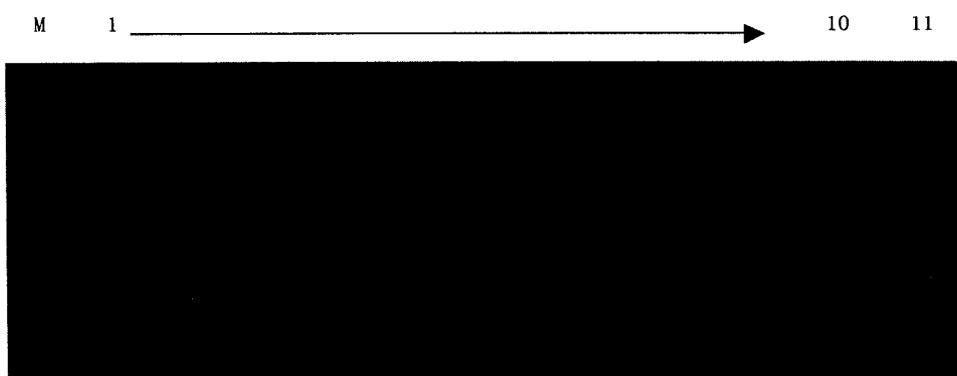


图 5

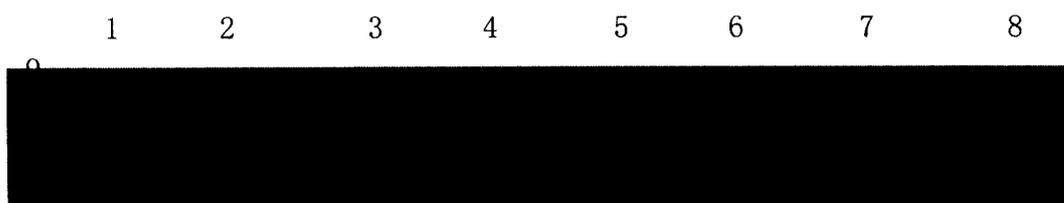


图 6