

# 檀香心材总 RNA 提取方法的比较研究

牛美云<sup>1,2</sup>, 程庆伟<sup>1,2</sup>, 张月雅<sup>1,2</sup>, 张新华<sup>1</sup>, 马国华<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 为筛选檀香心材总 RNA 提取方法, 对 5 种提取方法进行比较研究, 包括 Trizol 法、改良 CTAB 法、SDS 酸酚法、异硫氰酸胍-CTAB 法、异硫氰酸胍-SDS 法。结果表明, Trizol 法和异硫氰酸胍-CTAB 法不能提取出檀香心材总 RNA, 而 SDS 酸酚法、改良 CTAB 法和异硫氰酸胍-SDS 法均能提取檀香心材总 RNA。SDS 酸酚法的  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  小于 2.0, 且 RNA 产率低, 仅为  $(27.94 \pm 1.06) \mu\text{g g}^{-1}$ , 不能满足后续实验要求。而改良 CTAB 法和异硫氰酸胍-SDS 法提取的总 RNA 带型清晰, 完整性好,  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  为 1.8~2.0,  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  大于 2.0, RNA 产率分别为  $(79.06 \pm 4.22)$  和  $(107.00 \pm 1.36) \mu\text{g g}^{-1}$ 。分别以改良 CTAB 法和异硫氰酸胍-SDS 法提取的总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 反应, 扩增檀香 *Actin* 基因片段, 结果二者扩增产物大小相同且条带单一, 说明改良 CTAB 法与异硫氰酸胍-SDS 法为檀香心材总 RNA 提取的较好方法。

**关键词:** 檀香; 心材; RNA; 改良 CTAB 法; 异硫氰酸胍-SDS 法

doi: 10.11926/jtsb.3627

## Comparison of Several RNA Extracting Methods from Heartwood of *Santalum album*

NIU Mei-yun<sup>1,2</sup>, CHENG Qing-wei<sup>1,2</sup>, ZHANG Yue-ya<sup>1,2</sup>, ZHANG Xin-hua<sup>1</sup>, MA Guo-hua<sup>1\*</sup>

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 10039, China)

**Abstract:** In order to screen RNA extracting method from heartwood of *Santalum album*, five methods were compared, including Trizol method, improved CTAB method, SDS-phenol method, guanidine isothiocyanate-CTAB method, and guanidine isothiocyanate-SDS method. The results showed that it was difficult to extract total RNA by Trizol method and guanidine isothiocyanate-CTAB method, and the improved CTAB method, SDS-phenol method and guanidine isothiocyanate-SDS method could successfully extract total RNA. The SDS-phenol method was not suitable for RNA extraction, because  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  was less than 2.0 and total RNA yield was low with  $(27.94 \pm 1.06) \mu\text{g g}^{-1}$ . However, the 28S rRNA and 18S rRNA bands of total RNA extracted by improved CTAB method and guanidine isothiocyanate-SDS method were clear,  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  ranged from 1.8 to 2.0,  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  were more than 2.0, the yields were  $(79.06 \pm 4.22)$  and  $(107.00 \pm 1.36) \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively. The *Actin* segments in total RNA extracted by improved CTAB method and guanidine isothiocyanate-SDS method could amplified with the same size and single band. Therefore, the improved CTAB method and guanidine isothiocyanate-SDS method were effective methods to extract total RNA from heartwood of *S. album*.

**Key words:** *Santalum album*; Heartwood; RNA; Improved CTAB method; Guanidine thiocyanate-SDS method

收稿日期: 2016-05-18

接受日期: 2016-06-24

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31270720; 31100498); 广东省自然科学基金项目(S2012010009025); 广东省科技项目(2015B020231008); 中国科学院 STS 项目子课题(KFJ-EW-STS-118)资助

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31270720; 31100498), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (Grant No. S2012010009025), Projects for Science and Technology in Guangdong (Grant No. 2015B020231008), the STS Project of Chinese Academy of Sciences (Grant No. KFJ-EW-STS-118).

作者简介: 牛美云(1992~), 女, 硕士研究生, 主要从事檀香分子生物学方面的研究。E-mail: 497362954@qq.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: magh@scib.ac.cn

檀香(*Santalum album* L.)是檀香科(Santalaceae)檀香属的一种常绿半寄生小乔木<sup>[1]</sup>, 又名白檀, 原产于印度尼西亚的帝汶岛(Timor), 后来被引种到印度并得到大面积扩展<sup>[2]</sup>。它是一种重要的经济树木, 主要价值是具有芳香气味的心材和从心材提取的精油<sup>[3]</sup>, 可用于雕刻、香料、香水和药品等<sup>[4]</sup>。但是, 由于病虫害和过度开采, 檀香的自然资源遭到了严重的破坏, 1998年, 檀香被世界自然保护联盟(IUCN)列入《世界自然保护联盟受威胁植物红色名录》。檀香形成心材俗称“结香”<sup>[5]</sup>, 挥发油是其主要活性成分, 主要为萜烯类化合物<sup>[6]</sup>, 如  $\alpha$ -檀香醇(40%~55%)、 $\beta$ -檀香醇(12%~27%)<sup>[7]</sup>、 $\alpha$ -反式-香柠檬醇、 $\beta$ -顺式-檀香醇等<sup>[8]</sup>, 以及(+)- $\alpha$ -檀香烯、(-)- $\beta$ -檀香烯、(-)- $\alpha$ -香柠檬烯、(+)- $\beta$ -檀香烯和  $\beta$ -甜没药烯等倍半萜烯<sup>[9]</sup>。自然条件下, 檀香约在 10 龄时才开始形成具有芳香气味的心材<sup>[10]</sup>。研究表明, 利用激素如乙烯利、6-苄氨基腺嘌呤等处理未结香幼龄檀香, 可显著提高注射部位周围的檀香油含量<sup>[11-13]</sup>。目前关于激素促进檀香结香即檀香萜类化合物形成的分子机理还不清楚, 因此, 亟需阐明激素诱导檀香萜类化合物生成的代谢通路, 为研究人工促进檀香心材形成的技术或种植方案做准备, 最终实现缩短檀香人工林种植周期、提高心材产量和质量的目的, 从而保护檀香资源, 满足市场需求。通过提取 RNA 获取特异表达基因是功能基因组研究的重要方法, 从植物组织中提取纯度高、完整性好的 RNA 是顺利进行 Northern 杂交分析, 纯化 mRNA 以用于体外翻译或建立 cDNA 文库, RT-PCR 以及差示分析等分子生物学研究的关键所在<sup>[14]</sup>。目前提取 RNA 的方法很多种, 但不同植物或同种植物不同组织所含的成分, 如多糖、多酚等有很大差异, 其 RNA 提取方法必须通过实验才能确定, 目前还未见关于檀香心材总 RNA 提取方法的报道, 因此, 我们通过比较 Trizol 法<sup>[15]</sup>、改良 CTAB 法<sup>[16]</sup>、SDS 酸酚法<sup>[17]</sup>、异硫氰酸胍-CTAB 法<sup>[18]</sup>和异硫氰酸胍-SDS 法<sup>[19]</sup>, 以筛选并确定檀香心材总 RNA 提取的最佳方法, 为檀香油合成酶基因的表达、调控及其相关的分子生物学研究提供技术手段。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

檀香心材于 2015 年 12 月取自广东东莞金娃娃

檀香种植基地, 选取 6-BA 处理 1 年的 6 龄檀香树, 用内径为 5.15 mm 的生长锥从距离地面 30 cm 处钻取心材(图 1), 心材为浅黄色至深黄色, 边材为白色, 边材与心材可以直接用肉眼进行区分, 用已灭菌的手术刀直接切取浅黄色至深黄色部分用锡箔纸包裹后立即放入干冰速冻, 带回实验室保存于-70℃冰箱备用。



图 1 生长锥钻取的檀香茎干

Fig. 1 Stem of sandalwood drilled by increment borer

### 1.2 试验试剂

Trizol 购自 Invitrogen 公司; Dnase I、Rnase 抑制剂、RT-PCR 试剂盒、Taq DNA 聚合酶( $5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ )、 $\text{Mg}^{2+}$  ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ )、dNTPs ( $2.5 \text{ mmol L}^{-1}$ )、DL2000 Marker 等购自 TaKaRa 公司; Actin 引物由华大基因合成; 其它化学试剂为分析纯产品, 购自广州化学试剂公司。

试验所用手术刀、研钵、药匙、镊子、试剂瓶等器材均在  $180^\circ\text{C}$  下烘 4 h 以上, 所有试剂及一次性塑料耗材均经过 0.1% (W/V) DEPC (焦碳酸二乙酯) 水处理,  $121^\circ\text{C}$  高压灭菌 30 min 后备用。

### 1.3 檀香心材总 RNA 的提取

**Trizol 试剂法** 参照 TRIzol 试剂盒说明书进行提取。

**改良 CTAB 法** 参照 Chang<sup>[16]</sup> 等方法并适当修改。取檀香心材 0.5 g, 液氮中研磨成粉末后转入无 RNase 离心管中, 迅速加入 1 mL  $65^\circ\text{C}$  预热的 CTAB 提取缓冲液[2% CTAB (W/V), 2% PVPP (W/V),  $2 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl,  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  Tris-HCl (pH=8.0),  $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  EDTA (pH=8.0)]和  $25 \mu\text{L}$   $\beta$ -巯基乙醇, 剧烈振荡混匀后  $65^\circ\text{C}$  水浴 60 min, 期间上下颠倒混匀几次, 于  $4^\circ\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 10 min; 取上清, 加入等体积水饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)振荡混匀, 于  $4^\circ\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 10 min; 取上清, 加入等体积氯仿/异戊醇(24:1), 振荡混匀, 于  $4^\circ\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 10 min; 取上清, 加入 0.9

体积预冷的异丙醇和 0.1 体积的  $3 \text{ mol L}^{-1}$  的醋酸钠 ( $\text{pH}=5.2$ ),  $-20^{\circ}\text{C}$  沉淀 2 h; 于  $4^{\circ}\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 15 min; 弃上清, 沉淀用 500  $\mu\text{L}$  SDS 缓冲液 I [ $0.5\%$  SDS,  $1 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl,  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  Tris-HCl ( $\text{pH}=8.0$ ),  $0.001 \text{ mol L}^{-1}$  EDTA ( $\text{pH}=8.0$ )] 溶解后加入等体积氯仿, 振荡混匀并在  $4^{\circ}\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 10 min; 取上清, 加入 2 倍体积无水乙醇,  $-20^{\circ}\text{C}$  沉淀 1 h, 在  $4^{\circ}\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 15 min; 弃上清, 沉淀用 1 mL 70% 酒精漂洗 2 次, 于  $4^{\circ}\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 5 min; 尽量去除酒精, 风干后, RNA 用适量 DEPC 水溶解 ( $30 \mu\text{L}$ ),  $-70^{\circ}\text{C}$  贮存备用。

**SDS 酚法** 参照 Duan<sup>[17]</sup> 等的方法并适当修改。取檀香心材 0.1 g, 液氮中研磨成粉末后转入无 RNase 离心管中, 迅速加入 600  $\mu\text{L}$  SDS 酚提取缓冲液 [ $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  Tris-HCl ( $\text{pH}=8.0$ ),  $0.4 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl,  $0.2\%$  SDS,  $2\%$   $\beta$ -巯基乙醇(V/V)], 涡旋震荡混匀后再加入 200  $\mu\text{L}$  水饱和酚和 200  $\mu\text{L}$  氯仿, 震荡至彻底混匀, 冰上平放静置 15 min; 于  $4^{\circ}\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 10 min, 取上清, 加入等体积的氯仿, 震荡混匀, 于  $4^{\circ}\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 10 min, 取上清, 加入等体积的异丙醇, 温和混匀后,  $-20^{\circ}\text{C}$  放置 1 h, 于  $4^{\circ}\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 10 min; 小心倒掉上清, 沉淀漂洗方法同改良 CTAB 法。

**异硫氰酸胍-CTAB 法** 参照吴宏清等<sup>[18]</sup> 的方法并适当修改。取檀香心材 0.1 g, 液氮中研磨成粉末后迅速转入含有 600  $\mu\text{L}$  异硫氰酸胍-CTAB 提取液 [ $38\%$  水饱和酚,  $1 \text{ mol L}^{-1}$  异硫氰酸胍,  $2\%$  CTAB (W/V),  $2\%$  PVPP (W/V),  $2 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl,  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  NaAc-Hac ( $\text{pH}=5.2$ ),  $1\%$   $\beta$ -巯基乙醇(V/V)] 的离心管中, 剧烈震荡, 室温静置 15 min; 加入等体积的水饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 震荡混匀, 于  $4^{\circ}\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 10 min; 取上清, 加入等体积的水饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 震荡混匀, 于  $4^{\circ}\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 10 min; 取上清, 加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1), 于  $4^{\circ}\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 10 min; 取上清, 加入 0.5 倍体积无水乙醇和等体积  $4 \text{ mol L}^{-1}$  LiCl, 颠倒混匀,  $-20^{\circ}\text{C}$  静置 4 h 或过夜, 于  $4^{\circ}\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 10 min; 弃上清, 沉淀沉淀漂洗方法同改良 CTAB 法。

**异硫氰酸胍-SDS 法** 参照高志晖等<sup>[19]</sup> 等的方法并适当修改。取 0.5 g 样品放入液氮预冷的研钵中液氮研磨, 迅速分装到含有 1 mL 异硫氰酸胍-SDS 提取缓冲液 [ $4 \text{ mol L}^{-1}$  异硫氰酸胍,  $0.002 \text{ mol L}^{-1}$

Tris-HCl ( $\text{pH}=8.0$ ),  $1\%$   $\beta$ -巯基乙醇(V/V)] 的离心管中, 颠倒混匀, 冰上放置 15 min, 于  $4^{\circ}\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 20 min; 取上清, 加入 0.03 倍体积的  $3 \text{ mol L}^{-1}$  的醋酸钠( $\text{pH}=5.2$ )和 2.5 倍体积的无水乙醇, 颠倒混匀,  $-20^{\circ}\text{C}$  沉淀至少 2 h; 于  $4^{\circ}\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 20 min, 弃上清, 加入 10 mL SDS 缓冲液 II [ $0.2\%$  SDS,  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl,  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  Tris-HCl ( $\text{pH}=8.0$ ),  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  EDTA ( $\text{pH}=8.0$ )], 振荡混匀, 加入等体积的水饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 充分混匀, 于  $4^{\circ}\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 15 min; 将水相转入新离心管中, 加入等体积氯仿, 振荡数秒混匀, 于  $4^{\circ}\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 10 min; 将水相转入新离心管, 加入等体积的异丙醇和 0.5 体积的  $5 \text{ mol L}^{-1}$  的 NaCl,  $-20^{\circ}\text{C}$  放置 2 h; 于  $4^{\circ}\text{C}$  下  $13680\times g$  离心 20 min, 弃上清, 沉淀漂洗方法同改良 CTAB 法。

#### 1.4 RNA 浓度与质量的检测

5 种方法提取的 RNA 分别取 1  $\mu\text{L}$  用灭菌的 DEPC 水稀释 10 倍后, 用 Nano Drop 2000/2000C 核酸蛋白检测仪检测 RNA 浓度与纯度, 记录  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 、 $A_{260 \text{ nm}}/A_{230 \text{ nm}}$  以及浓度, 并计算产率。RNA 产率 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) = RNA 浓度 ( $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ )  $\times$  稀释倍数  $\times$  原液体积 ( $\mu\text{L}$ ) / 样品质量 (g)。每种方法提取的 RNA 样品重复检测 3 次, 取平均值。试验数据用 SPSS 20.0 分析软件进行分析。

取 5  $\mu\text{L}$  RNA, 与上样缓冲液混合后上样于  $1\%$  琼脂糖凝胶中, 用 120 V 电压电泳 15 min, 用凝胶成像系统观察电泳条带并拍照。

#### 1.5 RT-PCR 检测

以改良 CTAB 法、异硫氰酸胍-SDS 法提取的总 RNA, 参照 TaKaRa 公司 M-MLV 反转录说明书进行反转录合成 cDNA, 以合成 cDNA 为模板, 根据檀香 *Actin* 基因 (GI: 156972025) 设计引物进行扩增。正向引物: 5'-GGATTCTGGAGATGGTGTTAG-T-3'; 反向引物: 5'-CGGTGATTTCCTTGCTCATT-C-3'。20  $\mu\text{L}$  扩增体系为: ddH<sub>2</sub>O 12.8  $\mu\text{L}$ ,  $10\times$  PCR buffer 2  $\mu\text{L}$ ,  $2.5 \text{ mmol L}^{-1}$  dNTP 2  $\mu\text{L}$ ,  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  正向引物 1  $\mu\text{L}$ ,  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  反向引物 1  $\mu\text{L}$ ,  $5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$  Taq DNA 聚合酶 0.2  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ 。扩增程序为  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 然后  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $55^{\circ}\text{C}$  复性 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共 30 次循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。反应完成后, 取 9  $\mu\text{L}$  反应产物, 与上样缓冲液混合

后上样于 1%琼脂糖凝胶,用 140 V 电压电泳 20 min,用凝胶成像系统观察电泳条带并拍照。

2 结果和分析

2.1 RNA 完整性检测

凝胶电泳分析是检验 RNA 质量的一种重要手段,从凝胶图像上可以判断所得的 RNA 的完整性和降解程度。由图 2 可以看出,Trizol 法、异硫氰酸胍-CTAB 法提取的 RNA 无 28S rRNA、18S rRNA 条带,说明这两种方法不能提取出檀香心材 RNA;SDS 酸酚法提取的 RNA,有 3 条 5S rRNA、18S rRNA、28S rRNA 带,但荧光亮度相近且较弱,存在拖尾现象,表明 RNA 浓度低且严重降解;改良 CTAB 法和异硫氰酸胍-SDS 法提取的 RNA 能看见清晰的 3 条带,28S rRNA 和 18S rRNA 的荧光亮度接近 2:1,5S rRNA 条带相对较弱,条带清晰无弥散现象,说明 RNA 的完整性较好,未发生降解,改良 CTAB 法提取的 RNA 条带荧光亮度弱于异硫氰酸胍-SDS 法的。

2.2 RNA 纯度、浓度检测

高纯度的 RNA 的  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  应介于 1.8~2.0 之间,  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  应大于 2.0。从表 1 可以看出,改良 CTAB 法、异硫氰酸胍-SDS 法提取的 RNA,其  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  介于 1.8~2.0 之间,  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  大于 2.0,产率分别为  $(79.06\pm4.22)\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  和  $(107.00\pm1.36)\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ ,说明改良 CTAB 法和异硫氰酸胍-SDS 法提取的 RNA 样品中没有蛋白质、酚类物质和糖类、盐离子以及有机溶剂等其他杂质残余,且产量足够应用于后续研究;SDS 酸酚法提取的 RNA,其  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  介于 1.8~2.0 之间,但是  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$

小于 2.0,且产率低,仅为  $(27.94\pm1.06)\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ ,表明 RNA 样品中有抽提试剂,如异硫氰酸胍、 $\beta$ -巯基乙醇等,以及糖类和盐离子等的残留。而 Trizol 法、异硫氰酸胍-CTAB 法提取的 RNA,  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 、 $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  均小于 1.8 和 2.0,产率低,说明受到蛋白质、酚类、异硫氰酸胍和  $\beta$ -巯基乙醇等杂质污染严重。

2.3 目的基因的 PCR 扩增

用改良 CTAB 法、异硫氰酸胍-SDS 法提取的檀香心材总 RNA 经反转录后,用 PCR 扩增 *Actin* 基因片段,以进一步检测所提取的 RNA 是否可以用于后续研究。从图 3 可见,两种方法均可扩增出约 495 bp 大小的单一产物,带型清晰,说明改良 CTAB 法与异硫氰酸胍-SDS 法提取的 RNA 均能用于 RT-PCR 反应等以 RNA 为基础的研究分析。

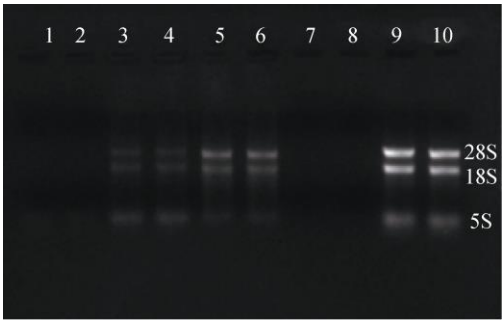


图 2 5 种方法提取檀香心材 RNA 的电泳图。1,2: Trizol 法; 3,4: SDS 酸酚法; 5,6: 改良 CTAB 法; 7,8: 异硫氰酸胍-CTAB 法; 9,10: 异硫氰酸胍-SDS 法。

Fig. 2 Electrophoresis diagram of total RNA extract from heartwood of *Santalum album* by five methods. 1,2: Trizol method; 3,4: SDS-phenol method; 5,6: Improved CTAB method; 7,8: Guanidine isothiocyanate-CTAB method; 9,10: Guanidine isothiocyanate-SDS method.

表 1 不同方法提取檀香心材总 RNA 的结果比较

Table 1 Comparison of total RNA from heartwood of *Santalum album* by different methods

| 方法 Method                                  | $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ | $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ | 浓度 Concentration (ng $\mu\text{L}^{-1}$ ) | 产率 Yield ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) |
|--------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------|
| Trizol                                     | $1.50\pm0.21$                         | $1.11\pm0.22$                         | $41.00\pm4.10$                            | $24.60\pm2.46$                    |
| 异硫氰酸胍-CTAB 法 Guanidine isothiocyanate-CTAB | $1.47\pm0.16$                         | $0.84\pm0.12$                         | $58.27\pm4.32$                            | $34.96\pm2.59$                    |
| SDS 酸酚法 SDS-phenol                         | $1.88\pm0.07$                         | $1.36\pm0.17$                         | $46.51\pm1.76$                            | $27.94\pm1.06$                    |
| 改良 CTAB 法 Improved CTAB                    | $1.96\pm0.04$                         | $2.22\pm0.08$                         | $131.77\pm7.03$                           | $79.06\pm4.22$                    |
| 异硫氰酸胍-SDS 法 Guanidine isothiocyanate-SDS   | $1.92\pm0.05$                         | $2.21\pm0.10$                         | $178.33\pm2.23$                           | $107.00\pm1.36$                   |

3 讨论

檀香心材细胞同其它木本植物细胞一样,具有

坚硬的细胞壁,破碎困难,富含单宁、萜类、酚类等多种次生代谢物质以及蛋白质和多糖等有机大分子<sup>[20]</sup>,其 RNA 的提取变得十分困难。抑制 RNA

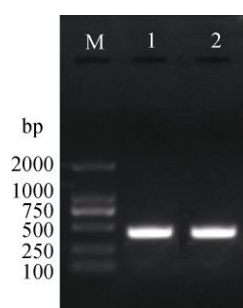


图 3 檀香心材总 RNA 的 RT-PCR 结果。M: DL2000 Marker; 1: 改良 CTAB 法; 2: 异硫氰酸胍-SDS 法。

Fig. 3 RT-PCR for total RNA extraction from heartwood of *Santalum album*. M: DL2000 Marker; 1: Improved CTAB method; 2: Guanidine isothiocyanate-SDS method.

酶活性、尽可能去除 DNA、蛋白质和次生代谢物质等是提取完整性好、浓度高 RNA 的关键所在。异硫氰酸胍是一种强 RNA 酶抑制剂<sup>[21]</sup>，能裂解细胞并释放核酸，CTAB 是一种阳离子去污剂，较高浓度的 CTAB 不仅可以裂解植物细胞，而且还能有效分离核蛋白与核酸，同时与  $\beta$ -巯基乙醇共同作用抑制 RNase 活性，而 SDS 是一种阴离子去污剂，可以解离核蛋白与核酸，同时抑制 RNA 酶和 DNA 酶活性。许多植物组织用一种裂解剂即可成功提取高质量的 RNA，如葡萄(*Vitis vinifera*)成熟叶片<sup>[22]</sup>等。由于檀香心材含有大量的次生代谢物质，用单一的裂解液、一次沉淀的方法，如 Trizol 法、异硫氰酸胍-CTAB 法和 SDS 酸酚法，不能提取出完整性好、纯度和浓度高的 RNA。而异硫氰酸胍与 SDS 或 CTAB 相结合，沉淀两次，可以大大提高 RNA 的纯度及浓度。此外，沉淀用 1 mL 70%乙醇洗两次，可以降低盐类物质及缓冲液的残留。

综上所述，改良 CTAB 法、异硫氰酸胍-SDS 法能有效从檀香心材中提取纯度较高、完整性较好的 RNA。经紫外光谱分析  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  为 2.0 左右， $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  大于 2.0，电泳 28S、18S 条带清晰。该法可以有效去除蛋白质、多糖和其它次生代谢物质等杂质，RT-PCR 结果表明，改良 CTAB 法、异硫氰酸胍-SDS 法提取的总 RNA 纯化后可用于檀香基因克隆等后续分子生物学实验。

## 参考文献

[1] Delectis Flora Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edit. Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 24 [M].

Beijing: Science Press, 1988: 57.

中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志, 第 24 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1988: 57.

- [2] State Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese Material Medica, Vol. 1 [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1996: 1–318.  
国家中医药管理局. 中华本草(上册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996: 1–318.
- [3] BARRETT D R, FOX J E D. Early growth of *Santalum album* in relation to shade [J]. Aust J Bot, 1994, 42(1): 83–93. doi: 10.1071/BT9940083.
- [4] YANG X Y, ZHANG X H, da SILVA J A T, et al. Ontogenesis of the collapsed layer during haustorium development in the root hemiparasite *Santalum album* Linn. [J]. Plant Biol, 2014, 16(1): 282–290. doi: 10.1111/plb.12026.
- [5] LI Y L. Research on Introduction of Sandalwood [M]. Beijing: Science Press, 2003: 1–154.  
李应兰. 檀香引种研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 1–154.
- [6] RANI A, RAVIKUMAR P, REDDY M D, et al. Molecular regulation of santalol biosynthesis in *Santalum album* L. [J]. Gene, 2013, 527(2): 642–648. doi: 10.1016/j.gene.2013.06.080.
- [7] VERGHESE J, SUNNY T P, BALAKRISHNAN K V. (+)- $\alpha$ -Santalol and (–)- $\beta$ -santalol(Z) concentration, a new quality determinant of east Indian sandalwood oil [J]. Flavour Frag J, 1990, 5(4): 223–226. doi: 10.1002/ffj.2730050407.
- [8] HOWES M J R, SIMMONDS M S J, KITE G C. Evaluation of the quality of sandalwood essential oils by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2004, 1028(2): 307–312. doi: 10.1016/j.chroma.2003.11.093.
- [9] JONES C G, GHISALBERTI E L, PLUMMER J A, et al. Quantitative co-occurrence of sesquiterpenes; a tool for elucidating their biosynthesis in Indian sandalwood, *Santalum album* [J]. Phytochemistry, 2006, 67(22): 2463–2468. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.09.013.
- [10] JONES C G, PLUMMER J A, BARBOUR E L. Non-destructive sampling of Indian sandalwood (*Santalum album* L.) for oil content and composition [J]. J Essent Oil Res, 2007, 19(2): 157–164. doi: 10.1080/10412905.2007.9699250.
- [11] LIU X J, XU D P, YANG Z J, et al. Effects of plant growth regulators on growth, heartwood formation and oil composition of young *Santalum album* [J]. Sci Silv Sin, 2013, 49(7): 143–149. doi: 10.11707/j.1001-7488.20130721.

刘小金, 徐大平, 杨曾奖, 等. 几种生长调节剂对幼龄檀香生长、心材形成和精油成分的影响 [J]. 林业科学, 2013, 49(7): 143–149. doi:

- 10.11707/j.1001-7488.20130721.
- [12] LI Y L, CHEN F L. Studies on forcing heartwood formation in *Santalum album* [J]. J Trop Subtrop Bot, 1994, 2(3): 39–45.  
李应兰, 陈福莲. 人工促成檀香结香的研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 1994, 2(3): 39–45.
- [13] LIN L, WEI M, XIAO S E, et al. The influence of external stimulation on content and quality of volatile oil in Lignun Santali Albi [J]. J Chin Med Mat, 2000, 23(3): 152–154. doi: 10.3321/j.issn:1001-4454.2000.03.013.  
林励, 魏敏, 肖省娥, 等. 外界刺激对檀香挥发油含量及质量的影响 [J]. 中药材, 2000, 23(3): 152–154. doi: 10.3321/j.issn:1001-4454.2000.03.013.
- [14] LI H, WANG X L. The difficulties in the isolation of RNA from plant tissues and their resolving strategies [J]. Biotechn Inform, 1999(1): 36–39. doi: 10.3969/j.issn.1002-5464.1999.01.008.  
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. doi: 10.3969/j.issn.1002-5464.1999.01.008.
- [15] SIMMS D, CIZDZIEL P E, CHOMCZYNSKI P. TRIZOL<sup>TM</sup>: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA [J]. Focus, 1993, 15(4): 99–102.
- [16] CHANG S, PURYEAR J, CAIRNEY J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees [J]. Plant Mol Biol Rep, 1993, 11(2): 113–116. doi: 10.1007/BF02670468.
- [17] DUAN J B, CAI X, ZHOU L M, et al. Single-step method of total RNA isolation by sodium dodecyl sulfate/phenol extraction from cultured cells [J]. Anal Biochem, 1997, 251(2): 291–292. doi: 10.1006/abio.1997.2275.
- [18] WU H Q, WANG L, TAO M H, et al. Transcriptome library construction and sequencing from chemically induced *Aquilaria sinensis* [J]. Biotechn Bull, 2013(8): 63–67.  
吴宏清, 王磊, 陶美华, 等. 化学诱导后白木香转录组文库的构建与测序 [J]. 生物技术通报, 2013(8): 63–67.
- [19] GAO Z H, WEI J H, XIONG H Y, et al. Comparison of several methods for RNA extraction from stems of *Aquilaria sinensis* [J]. Lett Biotechn, 2012, 23(5): 718–721. doi: 10.3969/j.issn.1009-0002.2012.05.023.  
高志晖, 魏建和, 熊焕英, 等. 几种提取白木香茎干总 RNA 方法的比较 [J]. 生物技术通讯, 2012, 23(5): 718–721. doi: 10.3969/j.issn.1009-0002.2012.05.023.
- [20] WILKINS T A, SMART L B. Isolation of RNA from plant tissue [M]// KRIEG P A. A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis. New York: Wiley-Liss, 1996: 21–42.
- [21] CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156–159. doi: 10.1016/0003-2697(87)90021-2.
- [22] ZHANG J J, WANG Y J, WANG X P, et al. An improved method for rapidly extracting total RNA from *Vitis* [J]. J Fruit Sci, 2003, 20(3): 178–181. doi: 10.3969/j.issn.1009-9980.2003.03.006.  
张今今, 王跃进, 王西平, 等. 葡萄总 RNA 提取方法的研究 [J]. 果树学报, 2003, 20(3): 178–181. doi: 10.3969/j.issn.1009-9980.2003.03.006.