

## 玻璃粉吸附核酸及其在植物核酸提取中应用的研究

何海旺<sup>1,2</sup>, 许春燕<sup>1</sup>, 李文<sup>1</sup>, 何龙飞<sup>1\*</sup>, 李创珍<sup>1</sup>, 韦善清<sup>1</sup>

1. 广西大学农学院, 南宁 530004;

2. 广西农业科学院经济作物研究所, 南宁 530007

**摘要:** 为研究玻璃粉在植物核酸提取中的应用, 比较了玻璃粉颗粒大小、离液盐种类及浓度、pH 等条件对玻璃粉吸附核酸的影响, 得出玻璃粉吸附核酸的各种最佳条件。结果表明, 普通玻璃粉吸附核酸能力强于硅胶和硅藻土, 玻璃粉颗粒的直径以 83  $\mu\text{m}$  为佳, pH 4.0 时吸附效果达到最大。提取 DNA 时, NaCl 浓度应大于 3 mol/L, 而提取 RNA 时, 异硫氰酸胍大于 2 mol/L 就能取得很好的效果, 此外, 在玻璃粉吸附 RNA 前, 需要加入 50% 以上的无水乙醇才能更好地吸附。利用玻璃粉制作简易纯化柱, 可用于植物组织核酸提取纯化, 所提取的核酸纯度高、完整性好, 可用于酶切、杂交和 PCR 等实验。与传统方法相比, 采用玻璃粉简易离心柱提取植物核酸, 效果好、环保、快速、经济。

**关键词:** 玻璃粉; 纯化柱; 吸附; 核酸

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2012.05.10

## The Research of Glass Powder Absorbing Nucleic Acid and its Application of Nucleic Acid Extraction from Plant Tissue

He Hai-wang<sup>1,2</sup>, Xu Chun-yan<sup>1</sup>, Wen Li<sup>1</sup>, He Long-fei<sup>1\*</sup>, Li Chuang-zhen<sup>1</sup>, Wei Shan-qing<sup>1</sup>

1. College of Agronomy, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China;

2. Cash Crops Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China

**Abstract:** In order to study the application of nucleic acid extraction from plant tissue, the optimum condition of glass powder binding to nucleic acid was gained by comparing the effects of diameter of glass powder, chaotropic salt kinds and concentrations, pH on nucleic acid binding to glass powder. The results showed that glass powder had higher ability to absorb nucleic acid than silica and diatomite, and glass powder with 83  $\mu\text{m}$  diameter was better. The glass powder has the strongest absorption ability under pH 4.0. The NaCl concentration should be higher than 3 mol/L in order to gain the highest yield of DNA, and glass powder can better absorb RNA with more than 2 mol/L guanidine thiocyanate. Besides, it was more effective by adding more than 50% anhydrous ethanol before glass powder absorb RNA. Nucleic acid extracted from plant tissue through the simple purification column, that was made by glass powder, can be applied for restriction digestion, hybridization and PCR. Compared with traditional methods, using glass powder column to extract nucleic acid from plant tissue is effective, environmentally friendly, fast and economic.

**Key words:** glass powder; purification columns; adsorb; nucleic acid

核酸提取纯化已经成为分子生物研究的必备工作, 疾病诊断、克隆、测序、扩增、杂交和分析等实验操作的首要步骤就是提取出完整性好、纯度高的核酸。植物细胞含有大量的酚类、多糖和色素等物质, 给植物组织核酸的提取纯化带来许多困难, 因此, 如何简便、快速提取高质量的核酸,

一直是植物生物技术研究者关注的问题。

酚氯仿抽提法是最经典的传统纯化核酸方法<sup>[1]</sup>, 在纯化过程中涉及多次离心操作, 耗时长、耗材多, 复杂繁琐, 不可避免地使用挥发性有毒化学试剂, 沉淀、烘干、溶解等步骤不易操作, 由于多次的样品转移, 容易导致部分核酸的丢失, 如果用

收稿日期: 2012-08-02; 接受日期: 2012-08-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30960181); 广西自然科学基金项目(桂科自 0832047)资助。

作者简介: 何海旺, 博士研究生, 从事植物生物技术研究。\* 通讯作者: 何龙飞, 教授, 主要从事植物生理生化研究。Tel: 0771-3235212-801; E-mail: lfhe@gxu.edu.cn

比较敏感的方法进行检测,如聚合酶链式反应(PCR),则有可能会出现假阴性的结果。

介质吸附法是另一种常用的纯化核酸方法,利用该法提取的核酸具有纯度高、完整性好、操作简单等优点,已成为大多数实验室常用的方法。介质吸附法中最常用的介质为二氧化硅。早在20世纪50年代,人们就知道在有离液盐存在时核酸能与硅胶可逆结合<sup>[2]</sup>,Vogelstein等<sup>[3]</sup>直接使用玻璃粉从琼脂糖凝胶中提取得到DNA;Marko等<sup>[4]</sup>使用玻璃粉成功提纯质粒DNA;Boom等<sup>[5]</sup>对该方法加以改进,用二氧化硅和硅藻土为固相吸附剂,用来提取纯化人血清或尿液中的微量病原体基因组DNA。利用硅介质的形式有两类,一类是直接将颗粒状的介质放到液相中吸附核酸;另一类是柱式的,即介质被预先装填在离心柱中。目前已有多种商品试剂盒,将硅胶膜填充在离心柱中,采用吸附原理纯化核酸,大大地简化了实验步骤,所得核酸纯度很高。生产试剂盒的成本不高,但由于试剂盒厂家普遍对所用药品种类及浓度等信息进行封锁,所以试剂盒产品一般价格不低,进口试剂盒则价格更高。

针对上述核酸纯化方法的缺点,本文在前人研究的基础上,采用回收废弃的普通玻璃磨成的粉末制成简易纯化柱,通过实验摸索了玻璃粉吸附核酸的最佳条件,总结出一套简单易行的提取植物核酸的方法,具有高效、环保、经济等优点。利用该法所提取核酸纯度高、完整性好,可用于酶切、杂交、PCR等实验。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

所用的植物材料为:飞机草、烟草、甘蔗、山药的嫩叶,种植于广西大学农学院教学科研基地。

玻璃粉为将普通玻璃放于研钵中研磨而成的粉末。

2% CTAB 裂解液配制参照李荣化等<sup>[6]</sup>:称取CTAB 2 g、NaCl 8.182 g,量取1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 10 mL、0.5 mol/L EDTA 4 mL,定溶于100 mL 去离子水中灭菌后使用。

异硫氰酸胍裂解液配制参照王爱勤等<sup>[7]</sup>:异硫氰酸胍 150 g 溶于 198 mL CBS 缓冲液(42 mmol/L 柠檬酸钠 19.8 mL,8.3% 十二烷基肌氨

酸钠 19.8 mL,DEPC 处理水 158.4 mL)中。

所用试剂均为分析纯,经高压灭菌后使用,提RNA所用的药品和仪器均用DEPC处理,经高压灭菌后使用。

### 1.2 方法

**1.2.1 玻璃粉吸附核酸的最佳条件的研究** 参照谢云等<sup>[8]</sup>的方法提取飞机草嫩叶基因组DNA,以及参照潘华清等<sup>[9]</sup>的方法提取飞机草嫩叶总RNA,用于比较玻璃粉吸附核酸的最佳条件。比较了普通玻璃粉、硅胶和硅藻土,以及玻璃粉直径、离液盐种类、NaCl 浓度、pH、异硫氰酸胍浓度、无水乙醇用量等对核酸吸附的影响。纯化后的核酸用1%琼脂糖凝胶电泳检测,再用分光光度计测定波长为260 nm时的吸光度,并计算核酸的浓度。DNA浓度的计算公式为: $OD_{260} \times \text{稀释倍数} \times 50$ ,RNA浓度的计算公式为: $OD_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40$ 。

**1.2.2 简易纯化柱提取基因组DNA** ①称取约0.3 g植物材料剪碎放到研钵中,加入1.5 mL的2% CTAB 裂解液,研磨。②取1 mL研磨液转移到2 mL的离心管中,65℃水浴30 min。③加入等体积的饱和NaCl溶液12 000 r/min离心10 min,取上清。④将上清转移至做好的简易纯化柱中,静置2 min,8 000 r/min离心1 min,倒去收集管内的液体,重复该步操作,直至核酸混合物全部转移完毕。⑤加入500 μL 70%乙醇溶液,8 000 r/min离心1 min,倒去收集管内的液体,重复该步2~3次。⑥8 000 r/min离心1 min,以利于完全去掉离心柱内的乙醇。⑦把离心柱移到另一干净1.5 mL离心管中,往离心柱的中间加入60 μL 60℃预热的双蒸水,静置2 min,8 000 r/min离心1 min,即得纯化的核酸。⑧取纯化好的DNA 2 μL,用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.2.3 简易纯化柱提取总RNA** ①把约0.1 g飞机草嫩叶剪碎放到研钵中,加入1 mL的异硫氰酸胍裂解液,研磨。②取0.5 mL研磨液转移到1.5 mL的离心管中,冰上放置5 min。③加入850 μL DEPC 处理水,混匀,12 000 r/min离心5 min。④取上清,加入等体积的无水乙醇,混匀。⑤把混合物转移到做好的简易纯化柱中,静置2 min,8 000 r/min离心1 min,倒去收集管内的液体,重复该步操作,直至核酸混合物全部转移完毕。⑥加入500 μL 70%乙醇溶液,8 000 r/min离心

1 min,倒去收集管内的液体,重复该步 2~3 次。  
⑦8 000 r/min 离心 1 min,完全去掉离心柱内的乙醇。⑧把离心柱移到另一干净 1.5 mL 离心管中,加入 60  $\mu\text{L}$  DEPC 处理水,静置 2 min,8 000 r/min 离心 1 min,1.5 mL 离心管中即为纯化的核酸。⑨取纯化好的 RNA 2  $\mu\text{L}$ ,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.2.4 核酸质量检查** 将用玻璃粉简易纯化柱提取的 DNA 和 RNA 样品分别用于 ISSR 分子标记<sup>[10]</sup>实验、烟草基因组杂交检测<sup>[11]</sup>和 RT-PCR 实验<sup>[9]</sup>,以观察应用效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 简易纯化柱的制作

取 1.5 mL 离心管,用尖的物品(如镊子等)在管底穿几个小孔,然后在离心管内放入一小团棉花,塞到管底压实,以防止上面的玻璃粉往下漏,再往离心管内加入大约 0.5 g 磨好的玻璃粉末,即为简易纯化柱,盖上盖子,经高温高压灭菌后使用。使用时,外面套上一个去盖的 2.0 mL 离心管做为收集管,用于收集废液。简易纯化柱的示意图见图 1。

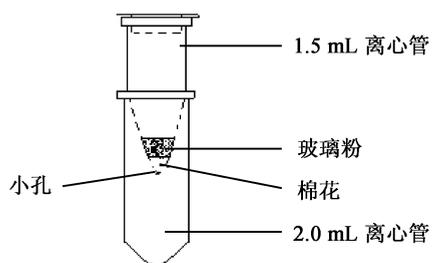


图 1 简易纯化柱示意图

Fig. 1 The diagram of simple purification columns.

### 2.2 不同来源的 $\text{SiO}_2$ 做成的纯化柱对 DNA 的吸附效果

玻璃粉、硅胶和硅藻土均含有相同的成分——二氧化硅,我们比较了以三者制作成的简易离心柱对核酸的吸附效果。结果显示,纯化 DNA 效果无明显差异。用紫外分光光度计测定  $\text{OD}_{260}$ ,发现玻璃粉吸附的 DNA 能力最高,浓度为 129.6  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ,硅胶次之(99.6  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ),而硅藻土最低(97.2  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ),但三者之间无显著差异(图 2)。因此,玻璃粉、硅胶和硅藻土均可用于特

异性地吸附核酸进行核酸纯化,但选用回收废弃的普通玻璃磨成的粉末,成本更低,材料更容易获得。

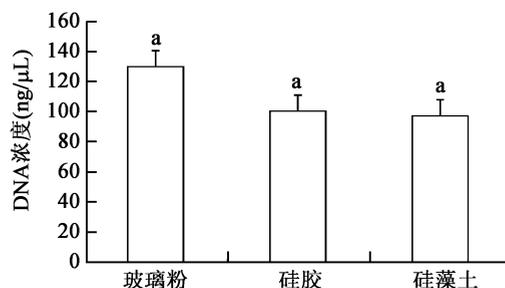


图 2 不同来源的  $\text{SiO}_2$  做成的纯化柱对 DNA 的吸附效果的影响

Fig. 2 Effects of purification column made by different material on DNA binding.

### 2.3 玻璃粉颗粒大小对 DNA 吸附的影响

玻璃粉颗粒的直径是影响玻璃粉吸附核酸的一个重要因素。从 DNA 浓度变化曲线可以看出(图 3),玻璃粉颗粒的直径对核酸的吸附能力影响很大,核酸的吸附能力与颗粒的直径成反比,颗粒直径小于 125  $\mu\text{m}$ (120 目)时,其吸附 DNA 的能力急剧上升,83  $\mu\text{m}$ (180 目)与 125  $\mu\text{m}$ (120 目)、250  $\mu\text{m}$ (60 目)差异极显著( $P < 0.01$ )。原因为同样重量的玻璃粉,其颗粒越细,表面积就越大,与核酸的接触面积也越大,所以吸附能力也大大增强。

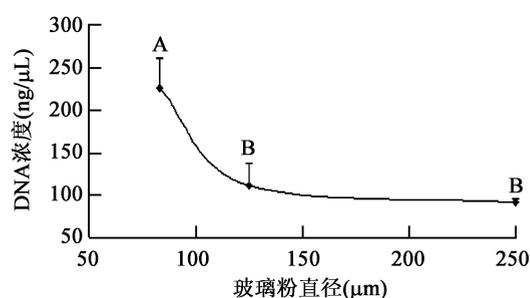


图 3 玻璃粉颗粒直径对 DNA 吸附的影响

Fig. 3 Effects of glass powder diameter on DNA binding.

### 2.4 离液盐种类对玻璃粉吸附 DNA 的影响

在提取的飞机草基因组 DNA 中,分别加入不同种类的离液盐溶液,使其最终浓度达到 4 mol/L,以研究离液盐种类对玻璃粉吸附 DNA 的影响。相同浓度条件下,NaI 使玻璃粉吸附 DNA 的能力最大,异硫氰酸胍次之,两者无显著

差异;NaCl 和 NaClO<sub>4</sub> 的能力较弱,与 NaI 和异硫氰酸胍均达到极显著差异( $P < 0.01$ ) (图 4)。由于 NaI 和异硫氰酸胍的价格相对较高,且 NaI 容易分解,贮藏时间过长,pH 会升高,从而影响玻璃粉对 DNA 的吸附能力,而异硫氰酸胍是蛋白质的强变性剂,对人体具有较大的毒性。因此,从高丰度的组织或细胞中提取纯化核酸时,可以考虑使用价格便宜、无毒、稳定的 NaCl 浓液促进核酸吸附到玻璃粉上。

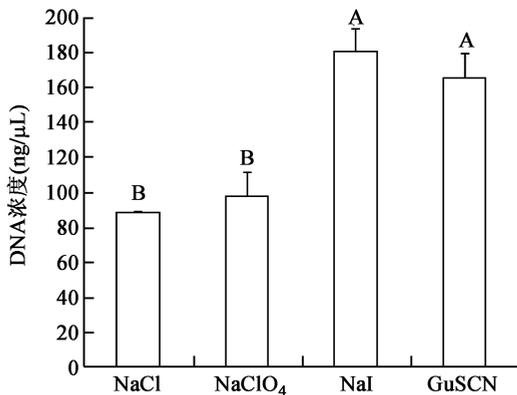


图 4 离液盐种类对玻璃粉吸附 DNA 的影响  
Fig. 4 Effects of different chaotropic salts on DNA binding to glass powder.

## 2.5 NaCl 浓度对玻璃粉吸附 DNA 的影响

为研究盐浓度对玻璃粉吸附 DNA 的影响,在提取的飞机草基因组 DNA 中,加入不同量的 5 mol/L NaCl 溶液,使 NaCl 的最终浓度分别达到 1 mol/L、2 mol/L、3 mol/L 和 4 mol/L,结果表明,随着盐溶液浓度升高时,DNA 的得率上升,盐浓度低于 2 mol/L 时,DNA 的得率比较低,超过 2 mol/L 后,DNA 的得率明显增高,3 mol/L 时,DNA 的得率与 2 mol/L 时达到显著差异( $P < 0.05$ ),浓度超过 3 mol/L 时,DNA 的得率虽然随着盐浓度的升高而继续升高,但不显著(图 5)。因此,为使玻璃粉更好地吸附 DNA,盐溶液浓度应采用大于 3 mol/L 的高浓度比较合适。

## 2.6 pH 对玻璃粉吸附 DNA 的影响

在相同盐浓度的条件下,待纯化的 DNA 及离液盐混合液在 pH 2 ~ 8 条件下,玻璃粉均能吸附 DNA,但在低 pH 下的吸附能力较强,pH 4 时最大,与 pH 6 时的 DNA 浓度有显著差异( $P < 0.05$ ),pH 为 8 时,所得的 DNA 浓度极低(图 6)。

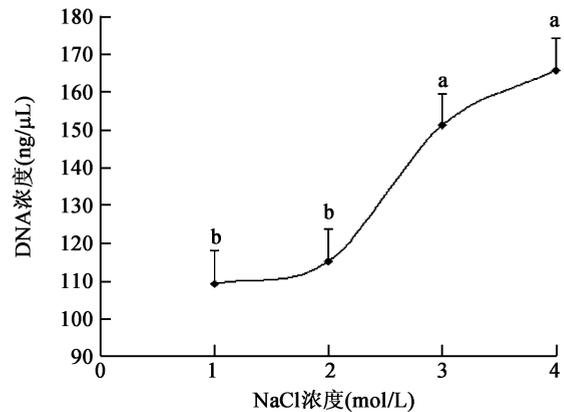


图 5 NaCl 浓度对玻璃粉吸附 DNA 的影响  
Fig. 5 Effects of NaCl concentration on DNA binding to glass powder.

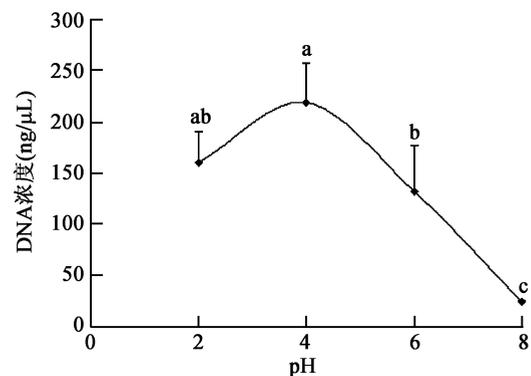


图 6 pH 对玻璃粉吸附 DNA 的影响  
Fig. 6 Effects of different pH on DNA binding to glass powder.

由于在较低的 pH 下,核酸易变性降解,所以在实际应用中,采用 pH 4 条件可使玻璃粉吸附 DNA 的能力达到最大值。

## 2.7 胍盐浓度对玻璃粉末吸附 RNA 的影响

RNA 与 DNA 同为核酸,理化性质比较相似,都在高盐低 pH 的条件下能被玻璃粉特异吸附,但不同的盐浓度对玻璃粉吸附 RNA 的影响与 DNA 相似但稍有不同。以异硫氰酸胍作为离液盐,浓度为 1 mol/L 时,RNA 浓度较低。随着浓度的上升吸附 mRNA 浓度上升,大于 2 mol/L 时,所得 RNA 浓度无显著差异(图 7)。因此,异硫氰酸胍 2 mol/L 时就能取得很好的效果。

## 2.8 乙醇用量对玻璃粉吸附 RNA 的影响

在待纯化的 RNA 及离液盐混合液中加入无水乙醇,其用量对玻璃粉吸附 RNA 的影响很大

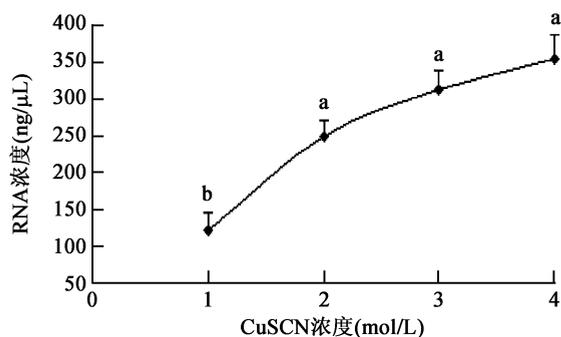


图7 异硫氰酸胍浓度对玻璃粉末吸附 RNA 的影响

Fig. 7 Effects of guanidine thiocyanate concentration on RNA binding to glass powder.

(图8),无无水乙醇时,所得 RNA 的浓度极低,仅为  $45.0 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ;33.3% 乙醇(无水乙醇用量为混合液体积的0.5倍)时, RNA 的浓度为  $169.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,与无无水乙醇时差异极显著( $P < 0.01$ );50% 时(无水乙醇用量为混合液体积的1倍),玻璃粉吸附 RNA 的能力达到最大值,与33.3% 时差异极显著( $P < 0.01$ ),但超过50% 时, RNA 浓度则略有下降。因此,为使 RNA 的得率最高,乙醇的用量应以50% 时比较合适。

## 2.9 利用简易纯化柱提取不同植物基因组 DNA 的质量检验

为检验用玻璃粉制作的简易纯化柱提取植物

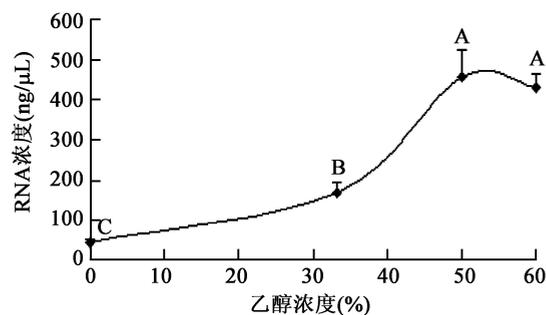


图8 乙醇用量对玻璃粉末吸附 RNA 的影响

Fig. 8 Effects of anhydrous ethanol on RNA binding to glass powder.

基因组 DNA 的可行性,我们分别用简易纯化柱提取飞机草(*Eupatorium odoratum*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、甘蔗(*Saccharum*)、淮山(*Dioscorea opposita*)等4种植物叶片的基因组 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示,用简易纯化柱能够成功提取这几种植物的基因组 DNA,且 DNA 的浓度,纯度和完整度均较高(图9)。

为进一步验证用简易纯化柱提取的 DNA 对后续实验是否有影响,我们分别用甘蔗的 DNA 进行 ISSR 分子标记以及用烟草的 DNA 进行酶切,并进行 Southern 杂交验证。4 个甘蔗品种 DNA 经 8 条 ISSR 引物扩增后,用简易纯化柱提取的甘蔗 DNA 均能扩增出多态性条带(图10)。

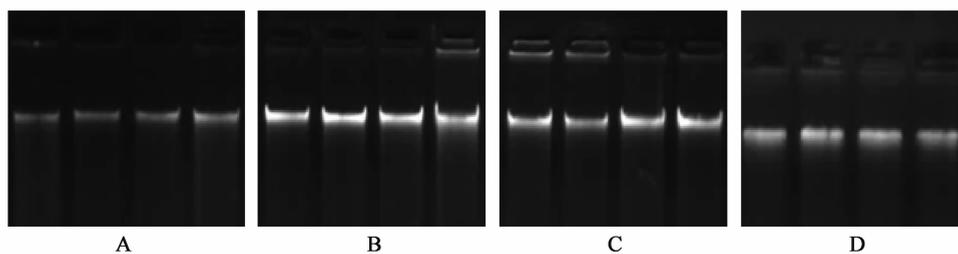


图9 利用简易纯化柱提取不同植物的基因组 DNA

Fig. 9 DNA of different plants were purified by simple purification columns.

A. *Eupatorium odoratum*; B. *Nicotiana tabacum*; C. *Saccharum*; D. *Dioscorea opposita*

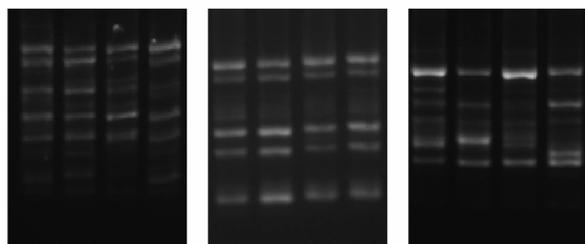


图10 甘蔗 ISSR 指纹图谱

Fig. 10 The ISSR fingerprint pattern of *Saccharum*.

在 Southern 杂交实验中,提取转基因的烟草基因组 DNA,用 *EcoR* V 内切酶进行酶切过夜,酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分离,所有的泳道的条带均呈弥散状态(图 11A),说明提取的 DNA 完全被内切酶酶切。将酶切产物转移并固定到带正电荷的尼龙膜上,用标记有地高辛的探针进行杂交,可以检测到杂交信号(图 11B),说明简易纯化柱提取的 DNA 样品对后续实验无影响。

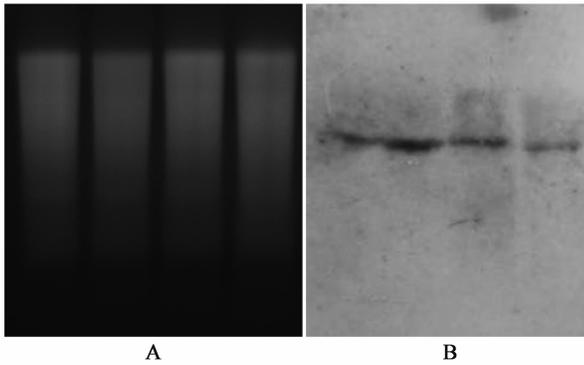


图 11 转基因烟草基因组 DNA 酶切 (A) 及 Southern 杂交检测 (B)

Fig. 11 The digestion product of genome DNA of transgenic *Nicotiana tabacu* (A) and the result of southern hybridization (B).

## 2.10 利用简易纯化柱提取植物总 RNA 的 RT-PCR 检验

用简易纯化柱提取飞机草嫩叶的总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后 (图 12A), 发现提取的总 RNA 有清晰的 28S 和 18S 条带, 且它们的亮度比大约为 2:1, 在泳道内未发现蛋白质及 DNA 等杂质, 没有拖带, 说明提取的 RNA 的完整度较好, 质量高。将 RNA 反转录成单链 cDNA 后进行 PCR 扩增, 可以扩增出一条与预计相符的 1 000 bp 左右的特异条带 (图 12B), 说明简易纯化柱提取的 RNA 可用于后续 RT-PCR 实验。

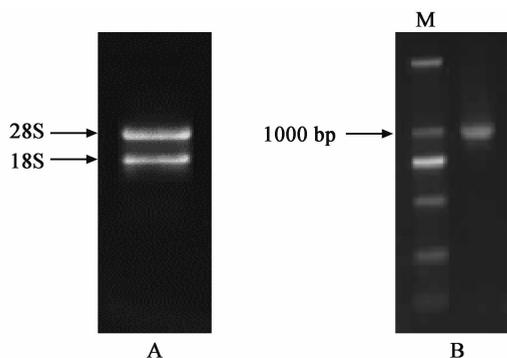


图 12 飞机草嫩叶总 RNA (A) 及 RT-PCR (B) 结果

Fig. 12 1% agarose gel electrophoresis of total RNA (A) extracted from *Eupatorium odoratum* and RT-PCR product (B).

## 3 讨论

利用二氧化硅颗粒, 可以直接从液相中吸附

纯化核酸, 如从琼脂糖凝胶中回收 DNA<sup>[12]</sup>、提取质粒 DNA<sup>[13]</sup> 等。但一些植物组织细胞中含有大量的色素分子, 如叶绿素等, 如果用二氧化硅颗粒直接在这些组织细胞的裂解混合物中吸附核酸, 则会有大量的色素分子随着二氧化硅颗粒一起沉淀, 很难去除, 不适合直接从含色素多的液相中吸附纯化核酸。但把玻璃粉做成简易纯化柱用于提取纯化核酸时, 可以用 70% ~ 80% 乙醇将色素洗脱, 从而可直接用于提取纯化植物组织中的核酸, 特别是绿色组织。

简易纯化柱的主要作用是能够代替传统的酚、氯仿等有机溶剂来抽提纯化核酸, 能有效去除氯仿、酚等挥发性有毒物质的污染, 而且操作简单, 操作时间可以从原来用酚氯仿抽提的几个小时缩短到 20 min 以内, 所用药品和材料均为实验室常用物品, 可以自制, 比商品试剂盒便宜。简易纯化柱将可以广泛地用于核酸的提取和纯化实验, 如基因组 DNA 的提取、总 RNA 的提取、质粒 DNA 的提取以及 PCR 产物纯化、琼脂糖凝胶回收等。无论用什么方法获得待纯化的核酸混合物 (如提 DNA 时用 CTAB 或 SDS 裂解后的上清液、提 RNA 时用异硫氰酸胍或 CTAB 裂解后的上清液、提取细胞的质粒时用碱裂解后的上清液、琼脂糖凝胶溶胶后的混合液等), 只要往混合液内加入适当浓度的离液盐, 调整适当的 pH, 便能使玻璃粉吸附核酸, 从而纯化核酸。

大量实验证明, 玻璃粉颗粒在有高浓度的离液盐存在时, 能够特异性地吸附核酸。离液盐的种类很多, 常见的有异硫氰酸胍、盐酸胍、碘化钠、高氯酸钠、氯化钠等, 但它们对促进二氧化硅吸附核酸的能力不同。碘化钠促进吸附的能力非常强, 早期有人用其促进核酸吸附<sup>[3,12]</sup>, 但由于碘化钠化学性质不稳定, 不耐贮存, 容易分解, 近年来逐渐被其他药品所代替。胍盐 (异硫氰酸胍或盐酸胍) 是一种蛋白质的强变性剂, 它能够抑制核酸酶对核酸的水解作用, 并且对促进二氧化硅吸附核酸的能力也很强, 很多实验方案均采用胍盐来促进核酸的吸附<sup>[14~17]</sup>, 但由于其对人体具有极强的毒性, 使用时应该注意安全。本文结果表明, 高氯酸钠和氯化钠也具有促进二氧化硅吸附核酸的能力, 虽然它们的促进能力比碘化钠和异硫氰酸胍弱, 但在提取植物组织中的核酸时, 仍能满足后续实验的需要, 且氯化钠具有稳定、无毒、便宜

等优点,可以考虑用氯化钠代替其他药品来促进二氧化硅吸附核酸。

玻璃粉在高盐低 pH 条件下,能够特异性地吸附核酸<sup>[1]</sup>,但其最适合的吸附条件未见有报道。现有报道大多采用大于 4 mol/L 的高盐浓度促进吸附,而我们的实验表明,盐浓度在大于或等于 3 mol/L 时已能很好地促进 DNA 的吸附,而 RNA 吸附所需的最适盐浓度则比 DNA 的稍低。不同 pH 对玻璃粉吸附核酸的影响显著,pH 4 最合适。在提取植物总 RNA 时,用玻璃粉吸附 RNA 前,如果不加入无水乙醇,则 RNA 的得率很低或者没有,而加入 50% 以上无水乙醇时,RNA 得率大大增加,提取基因组 DNA 时,则不需加入无水乙醇。

#### 参 考 文 献

- [1] 唐曙明,何林,周克元. 核酸分离与纯化的原理及其方法学进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,2005,26(3):192-193.
- [2] Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南[M]. (第三版). 北京:科学出版社,2008.
- [3] Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76: 615-619.
- [4] Marko M A, Chipperfield R, Birnboim H C. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder[J]. Anal. Biochem., 1982, 121: 382-387.
- [5] Boom R, Sol C, Beld M, *et al.*. Improved silica-guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alpha-casein to silica particles[J]. Clin. Microbiol., 1999, 28: 495-503.
- [6] 李荣华,夏岩石,刘顺枝,等. 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法[J]. 实验室研究与探索,2009,28(9):14-16.
- [7] 王爱勤,范业赓,赵晓艳,等. 甘蔗茎 RNA 提取方法的比较[J]. 广西农业生物科学,2007,26(2):175-178.
- [8] 谢云,李纪元,范正琪,等. 浙江红山茶总 DNA 提取及 ISSR-PCR 引物筛选[J]. 安徽农业科学,2011,39(25):15210-15212.
- [9] 潘华清,何龙飞,何海旺. 3 种飞机草总 RNA 提取方法比较研究[J]. 广西农业科学,2009,40(8):957-960.
- [10] 王英,庄南生,高和琼,等. 甘蔗种质遗传基础的 ISSR 分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2007,33:176-183.
- [11] 陈德富,陈喜文. 现代分子生物学实验原理与技术[M]. (第一版). 北京:科学出版社,2006.
- [12] 郭仁峰,马洪滨,程云. 二氧化硅法纯化琼脂糖凝胶中的 DNA[J]. 基础医学与临床,1998,18(3):238-239.
- [13] 周国雁,郭凤根,张应华,等. 一种经济高效的用 Silica 提取纯化质粒 DNA 的方法[J]. 生物技术通讯,2007,18(5):800-802.
- [14] 余宏傲. DNA 的硅藻土纯化法与脐橙番茄红素  $\beta$  环化酶基因筛选及上游序列分析[D]. 杭州:浙江大学,硕士学位论文,2006.
- [15] 邵丹丹. 磁性二氧化硅复合微球的制备及其在 DNA 和蛋白质分离中的应用[D]. 上海:复旦大学,硕士学位论文,2008.
- [16] 杨湛,林尔昕. 二氧化硅提取核酸用于多聚酶链反应[J]. 临床检验杂志,1995,13(2):68-70.
- [17] 余宏傲,张岚岚,徐昌杰. 一种有效纯化低拷贝质粒 DNA 的改良硅藻土法[J]. 细胞生物学杂志,2005,27:679-683.