

# 一种适用于 RT-PCR 的微藻总 RNA 提取方法

杨 婧, 牛 艳, 张可炜, 孔 健

(山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100)

**摘要:**以绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*)为实验材料,在比较了 Trizol 试剂法和异硫氰酸胍一步法这两种常用 RNA 提取方法的基础上,建立了一种十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)和酚相结合的改良的 CTAB-酚法。此方法利用高浓度的β-巯基乙醇来防止 RNA 提取过程中多酚的氧化,然后利用 CTAB 并结合乙醇和醋酸钾同时使用的方法来有效去除多糖类物质对 RNA 的干扰。经琼脂糖凝胶电泳检测,所提取的总 RNA 的 28S、18S 条带清晰明亮,无降解;其  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  值为 1.968;200~300 nm 全波长紫外扫描无多糖和蛋白吸收峰,表明提取的总 RNA 质量较好。对提取的总 RNA 直接进行反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR),能够清楚地获得目的基因的 cDNA 片段,进一步证实了改良的 CTAB-酚法是一种高质量提取微藻总 RNA 的有效方法。

**关键词:**绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*); 多糖; 多酚; 总 RNA; 反转录聚合酶链式反应

中图分类号: Q78; Q178.53

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)04-0006-05

在分子生物学中,很多研究如 Northern 杂交、基因体外翻译、cDNA 文库构建、cDNA 末端快速扩增(Rapid amplification of cDNA end, RACE)以及反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)等正确结果的获得都依赖于高质量的 RNA<sup>[1]</sup>。其中,RT-PCR 即将 RNA 反转录(reverse transcription, RT)和 cDNA 聚合酶链式扩增(PCR)相偶联的技术,对 RNA 提取的质量要求最为苛刻。该技术灵敏度高且用途广泛,不仅用于检测细胞中基因表达水平,还能通过少量的 mRNA 构建大容量的 cDNA 文库,也可以直接用于特定基因的 cDNA 序列克隆等<sup>[2]</sup>。RT-PCR 技术所用的 RNA 可来源于总 RNA、mRNA 或体外转录的 RNA 产物。因此,制备高纯度且保持完整性的 RNA 是 RT-PCR 技术成功的关键。

海洋微藻的分子生物学研究起步较晚。近几年,对海洋微藻功能基因组的研究受到重视,但是微藻总 RNA 的提取尚没有很好的方法,而是参考植物组织总 RNA 的提取方法,如常采用 Chomczynski 等<sup>[3]</sup>提出的异硫氰酸胍一步法和现在普遍使用的 Trizol 试剂法<sup>[4]</sup>。但是这两种方法均不能有效地从富含(水溶性)多糖和多酚类物质的材料中获得高质量的 RNA<sup>[1]</sup>,其主要因素在于多糖和多酚类等物质的干扰。因为多糖和多酚类物质的许多理化性质与 RNA 相似,在抽提 RNA 过程中,多糖物质可与 RNA 一起被乙醇共沉淀,形成难溶的胶状物质,此时共沉淀的 RNA 很难再溶解。另外,多糖的存在还能抑制许多酶的活性<sup>[5]</sup>,因此污染了多糖的 RNA 无

法用于进一步的分子生物学研究。而酚类物质在氧化条件下会产生褐化效应(browning effect)<sup>[6]</sup>,酚类物质的氧化产物可与 RNA 不可逆地结合形成共沉淀,从而严重影响 RNA 的产量和质量<sup>[7,8]</sup>。而海洋微藻细胞内通常富含多糖和多酚类物质,成为影响 RNA 提取的主要限制因素。

绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*)是一种重要的经济藻类,细胞内除富含多糖和多酚类物质外,还有高含量的脂肪酸,尤其富含多不饱和脂肪酸,是获取脂肪酸去饱和酶基因的很好材料<sup>[9]</sup>。作者以绿色巴夫藻为实验材料,在采用 Trizol 试剂法和异硫氰酸胍一步法的基础上,摸索出一种适用于微藻总 RNA 提取的有效方法—酚和 CTAB 相结合的改良的 CTAB 法。此方法可去除 RNA 提取过程中多糖和多酚类物质的干扰,并且提取的 RNA 可直接用于 RT-PCR 的实验研究。

## 1 材料

**藻种:**绿色巴夫藻由国家海洋局第一海洋研究所提供。

收稿日期: 2008-04-16; 修回日期: 2008-08-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370035)

作者简介: 杨婧(1980),女,山东兖州人,硕士研究生,主要从事海洋微藻功能基因的克隆和表达的研究,电话: 13791028057, E-mail: yangjing@mail.sdu.edu.cn; 孔健,通信作者, E-mail: kongjian@sdu.edu.cn

## 2 试剂与仪器

### 2.1 试剂

Trizol: 购自生工生物工程(上海)有限公司。

异硫氰酸胍溶液: 4 mol/L 异硫氰酸胍, 25 mmol/L 柠檬酸钠 (pH 7.0), 0.5% 十二烷基肌氨酸钠。

酸酚/氯仿/异戊醇: 灭菌 DEPC 水与重蒸酚等体积充分摇匀, 静置分层, 再与氯仿、异戊醇以 25: 24: 1 的体积比混合。

平衡酚/氯仿/异戊醇: 1 mol/L 灭菌 Tris-HCl (pH 8.0) 与重蒸酚等体积混和, 加入 1% Tris 碱晶体充分摇匀, 静置分层, 再与氯仿、异戊醇以 25: 24: 1 的体积比混合。

CTAB 提取缓冲液: 2% CTAB, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA (pH 8.0)。

10 × Mops [3-(N-吗啉代)丙磺酸] 缓冲液: 0.4 mmol/L Mops (pH 7.0), 0.5 mol/L NaAc, 0.01 mol/L EDTA。

### 2.2 器皿处理及主要仪器设备

实验中所用的玻璃器皿与用具均在 180℃ 下烘烤 12 h, 塑料制品在含 0.1% DEPC (焦碳酸二乙酯) 的水中, 37℃ 浸泡 12 h, 然后 121℃ 灭菌 30 min, 备用。

紫外分光光度计 (SHIMADZU UV-2550), 台式高速冷冻离心机 (Heraeus), 基因扩增仪 (Biometra) 等。

## 3 实验方法

### 3.1 RNA 提取方法

#### 3.1.1 Trizol 试剂法

按照生工生物工程有限公司(上海)提供的 Trizol 试剂盒使用说明提取, 提取的总 RNA 用灭菌的 DEPC 水溶解。

#### 3.1.2 异硫氰酸胍一步法<sup>[10]</sup>

将培养至指数生长期的微藻, 3 000 r/min 离心 15 min, 收集藻体 (约 0.5 g), 用液氮研磨成粉状, 转移至预冷的内有 500 μL 异硫氰酸胍溶液和 1% β-巯基乙醇的 1.5 mL 离心管中, 涡旋振荡 90 s 混匀; 加入 1/10 体积 2 mol/L NaAc (pH 4.0), 以保持酸性环境, 涡旋振荡 90 s; 再加入等体积的酸酚/氯仿/异戊醇, 剧烈振荡 10~20 s, 冰浴 15 min, 4℃ 10 000 r/min 离心 30 min; 取上清至另一个 1.5 mL 离心管中, 加入等体积异丙醇, 混匀后置于 -20℃ 沉淀 1 h; 4℃ 12 000 r/min 离心 25 min, 弃上清, 用 500 μL 异硫氰酸胍溶液重溶沉淀, 稍微涡旋, 放置冰上 15 min; 加

入等体积平衡酚/氯仿/异戊醇, 冰浴 15 min, 4℃ 10 000 r/min 离心 20 min; 取上清, 用等体积氯仿/异戊醇 (24: 1) 再抽提一次, 冰浴后 4℃ 10 000 r/min 离心 20 min; 取上清, 加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH 5.2) 和两倍体积无水乙醇, 充分混匀后 -20℃ 过夜沉淀; 4℃ 12 000 r/min 离心 25 min, 弃上清, 沉淀用 75% 的乙醇溶液洗涤两次; 将 RNA 沉淀室温下干燥, 用灭菌 DEPC 水溶解。

#### 3.1.3 改良的 CTAB-酸酚法

将离心收集的藻体 (约 0.5 g) 用液氮研磨成粉状, 放入到 500 μL 含有 4% β-巯基乙醇的 CTAB 提取缓冲液中 (65℃ 预热), 涡旋振荡 30 s; 65℃ 保温 30 min, 每 10 min 摇匀一次; 自然冷却至室温, 加入 1/10 体积 5 mol/L KAc (pH 4.8) 和 1/10 体积无水乙醇, 混匀后再加入等体积氯仿/异戊醇 (24: 1) 抽提, 剧烈振荡 10~20 s, 冰浴 15 min, 4℃ 10 000 r/min 离心 30 min, 取上清; 加入等体积的异丙醇, -20℃ 沉淀 1 h; 4℃ 12 000 r/min 离心 25 min, 弃上清, 用 500 μL 含有 4% β-巯基乙醇的异硫氰酸胍溶液重溶沉淀, 冰浴 15 min; 用等体积酸酚/氯仿/异戊醇抽提一次, 4℃ 10 000 r/min 离心 20 min; 取上清, 再用等体积氯仿/异戊醇 (24: 1) 抽提一次, 4℃ 10 000 r/min 离心 20 min; 取上清, 加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH 5.2) 和两倍体积无水乙醇, 充分混匀后 -20℃ 过夜沉淀; 4℃ 12 000 r/min 离心 25 min, 弃上清, 沉淀用 75% 的乙醇溶液洗涤两次; 将 RNA 沉淀室温下干燥, 用灭菌 DEPC 水溶解。

### 3.2 总 RNA 质量的检测

#### 3.2.1 琼脂糖凝胶电泳法

取 1 mL RNA 样品, 加入 9 μL 去离子甲酰胺, 65℃ 变性 10 min, 加 2 μL 6 × Loading Buffer, 1 × Mops 电泳缓冲液, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 检测所提取 RNA 样品的质量。

#### 3.2.2 200~300 nm 全波长紫外扫描法

取 20 μL RNA 样品, 用 DEPC 水稀释至 1 mL, 用紫外分光光度计进行 200~300 nm 全波长扫描, 测定 260 nm 和 280 nm 处的光吸收, 计算 RNA 样品的得率及检测其纯度。

#### 3.2.3 RT-PCR 和 cDNA 基因序列的扩增

将提取的总 RNA 经 DNaseI 处理以去除样品中的 DNA, 然后将其反转录为 cDNA, 并利用本实验室已经克隆的绿色巴夫藻脂肪酸去饱和酶基因 *Des4* 的已知序列<sup>[9]</sup> 设计引物, 以反转录的 cDNA 为模板, PCR 扩增 *Des4* 基因保守序列片段, 以检测所提总 RNA 的容量。

## 4 结果与分析

### 4.1 3种RNA提取方法的比较

将经过液氮研磨的藻体粉加入到 Trizol 试剂中, 涡旋混匀后反应液颜色呈褐色(图 1-1), 加入氯仿/异戊醇抽提离心后有机相为褐色(图 2-1)。这是由于 Trizol 试剂中含有苯酚, 它是一种强氧化剂, 能将藻体中的多酚类物质氧化, 从而发生了褐化效应<sup>[6]</sup>。藻体粉第一次抽提离心后的上清液呈浅褐色且黏度较大, 加入两倍体积无水乙醇和 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 溶液(pH 5.2)后出现大量浅黄色絮状沉淀。离心收集的沉淀为褐色难溶的胶状物, 且 65℃温浴处理 10 min, 仅有小部分溶解, 而加入 1% CTAB 溶液, 65℃温浴 20 min 后, 胶状物方可溶解, 表明该胶状物是多糖与核酸聚合形成的共沉淀物。将提取的 RNA 电泳检测, 凝胶板上出现了真核生物 RNA 典型的 28S、18S 带, 且带型清晰, 但边缘不锐利, 呈锯齿状, 表明 RNA 样品中可能有多糖物质存在(图 3-1)。

将液氮研磨的藻体粉加入到异硫氰酸胍-酸酚一步法的异硫氰酸胍溶液中, 涡旋混匀后反应液颜色迅速呈现深褐色(图 1-2), 采用酸酚/氯仿/异戊醇抽提离心后溶液分层, 下层有机相为深黄褐色, 上层液为浅褐色(图 2-2), 这是多酚类物质氧化褐变的结果。上层液经无水乙醇沉淀后, 沉淀物中出现了与 Trizol 试剂法中相同的褐色难溶胶状物。电泳结果显示, 该方法提取的总 RNA 条带清晰, 但亮度较弱(图 3-2), 说明 RNA 含量低, 推测其原因是此方法不能有效防止多酚类物质的氧化以及去除多糖类物质, 导致大量 RNA 与多糖、多酚类物质形成共沉淀而丢失。

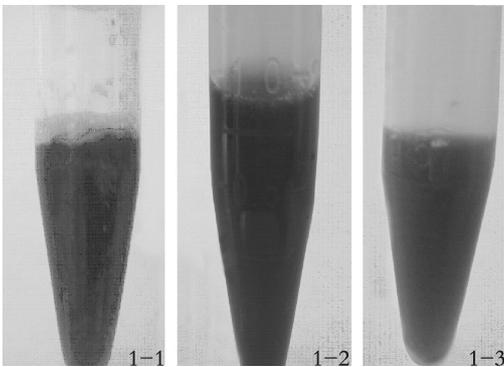


图 1 3种方法中微藻与裂解液作用的结果

Fig. 1 Comparison of colors of the lysis crude extract of material and lysis solution by three methods

1-1. Trizol 试剂法的裂解粗提物; 1-2. 异硫氰酸胍-酸酚一步法的裂解粗提物; 1-3. 改良的 CTAB-酸酚法的裂解粗提物

1-1. the lysis crude extract by Trizol method; 1-2. the lysis crude extract by Acid-guanidine-phenol-chloroform method; 1-3. the lysis crude extract by Improved CTAB method

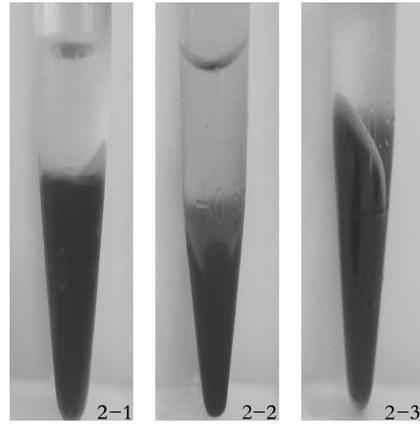


图 2 3种方法中第一次抽提产物的颜色比较

Fig. 2 Comparison of colors of the first extracts by three methods

2-1. Trizol 试剂法第一次抽提产物; 2-2. 异硫氰酸胍-酸酚一步法第一次抽提产物; 2-3. 改良的 CTAB-酸酚法第一次抽提产物

2-1. the first extract by Trizol method; 2-2. the first extract by Acid-guanidine-phenol-chloroform method; 2-3. the first extracts by improved CTAB method

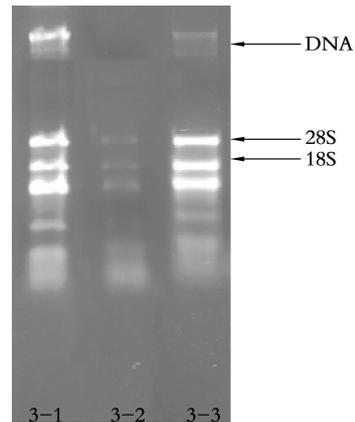


图 3 3种方法提取的总 RNA 比较

Fig. 3 Comparison of total RNA extracted by three methods

3-1. Trizol 试剂法提取的总 RNA; 3-2. 异硫氰酸胍-酸酚一步法提取的总 RNA; 3-3. 改良的 CTAB-酸酚法提取的总 RNA

3-1. total RNA extracted by Trizol method; 3-2. total RNA extracted by acid-guanidine-phenol-chloroform method; 3-3. total RNA extracted by improved CTAB method

将液氮研磨的藻体粉加入到改良的 CTAB-酸酚法的 CTAB 提取缓冲液中, 涡旋混匀后溶液一直呈现亮绿色(图 1-3), 加入氯仿/异戊醇(不含酸酚)抽提离心后下层有机相仍为绿色, 上层水相黏度较小, 且为无色透明(图 2-3), 表明该方法中藻体内的多酚类物质没有发生褐变效应。上层水相与无水乙醇混匀后, 沉淀呈白色半透明状, 不需 65℃处理室温便可溶于 DEPC 水中, 溶解液无色透明。琼脂糖凝胶电

泳板上总 RNA 谱带清晰,边缘锐利,亮度较大,无降解,表明提取的 RNA 含量较高,并且 28 S 条带亮度约为 18 S 带的两倍(图 3-3),符合 RNA 分子完整、无明显降解的标准,预示此方法能够抑制藻体内多酚类物质的氧化和多糖物质对总 RNA 提取的影响。

表 1 3 种方法提取的绿色巴夫藻总 RNA 的质量比较

Tab. 1 Comparison of qualities of Total RNA extracted from *Pavlova viridis* by three methods

RNA 提取方法	$A_{260\text{ nm}}$	$A_{280\text{ nm}}$	$A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$	RNA 得率* (mg/L)
Trizol 试剂法	0.378	0.242	1.562	699.3
异硫氰酸胍-酸酚一步法	0.152	0.093	1.634	281.2
改良的 CTAB-酸酚法	1.374	0.698	1.968	2541.9

\* RNA 得率(mg/L) =  $A_{260\text{ nm}} \times \text{稀释倍数} \times 37(\text{mg/L})^{[10]}$

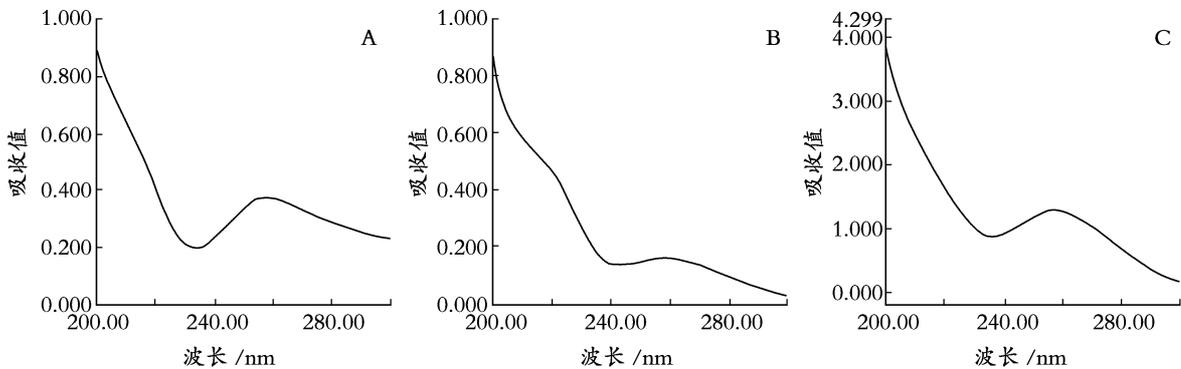


图 4 3 种方法提取的总 RNA 的紫外线扫描结果

Fig. 4 The UV scan results of total RNA extracted by three methods

A. Trizol 试剂法; B. 异硫氰酸胍-酸酚一步法; C. 改良的 CTAB-酸酚法

A. Trizol method; B. acid-guanidine-phenol-chloroform method; C. improved CTAB method

从表 1 和图 4 可以看出,改良的 CTAB 法提取的总 RNA,  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  达到 1.968,说明样品纯度较高,样品在 200~230 nm 的光吸收光滑下降,表明样品中不含多糖类物质, RNA 得率较高,为 2541.9 mg/L。而 Trizol 试剂法和异硫氰酸胍-酸酚一步法提取的总 RNA,  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  均小于 1.7,并且在 200~230 nm 处有较明显的光吸收峰,说明样品中存在蛋白或酚类试剂以及多糖物质的污染,纯度较差。RNA 得率较小,分别为 699.3 mg/L 和 281.2 mg/L。

### 4.3 改良的 CTAB-酸酚法提取的 RNA 样品的 RT-PCR

为比较 3 种方法提取的 RNA 的质量是否达到了 RT-PCR 的要求。将提取的 RNA 经 DNase iv 处理去除样品中的 DNA 后,进行反转录合成 cDNA。以该 cDNA 为模板,扩增绿色巴夫藻脂肪酸去饱和酶基因 *Des4* 的保守区域,结果只有改良的 CTAB 法扩增得到了预期的 cDNA 片段,约 700 bp,结果见图 5。

### 4.2 3 种方法提取的总 RNA 质量检测

利用核酸蛋白检测仪分别测定 3 种方法提取的绿色巴夫藻总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处的光吸收,并计算 RNA 的提取率,结果见表 1。

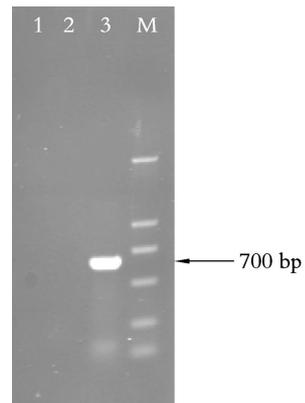


图 5 3 种方法提取的绿色巴夫藻总 RNA 的 RT-PCR 结果

Fig. 5 RT-PCR products of total RNA extracted from *Pavlova viridis* by three methods

1. Trizol 试剂法的 RT-PCR 结果; 2. 异硫氰酸胍-酸酚一步法的 RT-PCR 结果; 3. 改良的 CTAB-酸酚法的 RT-PCR 结果; M. DNA 标准分子质量 DL 2000

1. RT-PCR products of total RNA extracted by Trizol method; 2. RT-PCR products of total RNA extracted by Acid-guanidine-phenol-chloroform method; 3. RT-PCR products of total RNA extracted by improved CTAB method; M. DNA Ladder DL 2000

## 5 讨论

绿色巴夫藻脂肪酸组成齐全,并富含多不饱和脂肪酸,本实验室已从该藻中获得了多个脂肪酸去饱和酶基因片段,在进行 RT-PCR 克隆获取基因全长时,因藻体中多糖和多酚类的干扰而难以提取得到高质量的 RNA,成为后续研究的瓶颈。针对微藻中总 RNA 提取中的问题,作者在 Trizol 试剂法和异硫氰酸胍一步法的基础上,提出了改进的 CTAB-酸酚法,经过不同实验结果检测,均证明此方法提取的绿色巴夫藻总 RNA 质量较好,并能通过 RT-PCR 获得目的基因的 cDNA 片段,为后续工作的开展奠定了基础。

从实验原理上,改良的 CTAB 法针对多酚的氧化,在抽提液中提高了还原剂  $\beta$ -巯基乙醇的使用浓度(由 1% 提高到 4%),其作用是高浓度的  $\beta$ -巯基乙醇不仅抑制 RNase 的活性减少提取过程中 RNA 的降解,还能破坏酚类氧化酶的二硫键<sup>[5]</sup>,使酚类氧化酶失活,从而阻止多酚物质的氧化,消除了多酚氧化物对 RNA 质量和产量的干扰。针对多糖在实验中使用 CTAB 作为裂解液,CTAB 是一种阳离子去污剂,它可溶解细胞膜并能与核酸形成复合物,该复合物在高盐溶液中(0.7 mol/L NaCl)是水溶性的,当降低溶液盐浓度到一定程度(0.3 mol/L NaCl)时,该复合物可形成不溶性的沉淀,通过高速离心可将 CTAB-核酸复合物与提取液中的多糖、蛋白等杂质除去,然后将复合物沉淀溶解于高盐溶液中,最后通过乙醇沉淀 RNA,去除 CTAB<sup>[10]</sup>。作者还参考了 Su 和 Gibor 在去除褐藻多糖时采用的乙醇和醋酸钾同时使用多糖去除效果最佳的结果<sup>[11]</sup>,同时采用了 L pez-G mez 等<sup>[12]</sup>使用无水乙醇和 5 mol/L 醋酸钾溶液进一步去除多糖杂质的方法。

从实验结果上,改良的 CTAB-酸酚法提取的 RNA 的产量和质量都明显优于其他两种方法, RNA 电泳结果显示具有明显 28S 和 18S rRNA 特征的电泳带,条带锐利,并且 28S 的亮度约为 18S 条带的两倍,没有弥散现象,说明该 RNA 较完整,没有明显的降解; $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} = 1.968$ ,RNA 得率分别是 Trizol 试剂法、异硫氰酸胍一步法的 4 倍和 10 倍,且不存在多糖污染。RNA 经 RT-PCR 后,可扩增出 *Des4* 基因 700 bp 的目的条带,进一步证实了用该方法提取的 RNA 质量和产量均达到了 RT-PCR 要求。

另外在 18S rRNA 片段的下方还有一条较明显的 rRNA 带,经过反复实验,3 种方法提取的 RNA 中都存在,但没有发现它对 RT-PCR 存在负面影响。这种现象在其他海洋微藻中是否存在,还需要进一步证明。

### 参考文献:

- [1] 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: 38-41.
- [2] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆试验指南 [M]. 第三版. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002. 636-644.
- [3] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidine-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156-159.
- [4] 彭秀玲,袁汉英,谢毅,等. 基因工程实验技术 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998. 197-198.
- [5] Lewinsohn E, Stecle C L, Croteau R. Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1994, 12: 20-25.
- [6] Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA [J]. *Bio Techniques*, 1992, 13: 52-56.
- [7] Su X, Gibor A. A method for RNA isolation from marine macroalgae [J]. *Anal Biochem*, 1988, 174: 650-657.
- [8] Katterman F R H, Shtuck V I. An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amount of phenolic terpenoids and tannins [J]. *Prep Biochem*, 1983, 13: 347-359.
- [9] 牛艳,孔文涛,杨婧,等. 绿色巴夫藻 cDNA 文库的构建及 EST 序列分析 [J]. 中国水产科学, 2006, 13(6): 902-907.
- [10] 王关林,方宏筠. 植物基因工程 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2002. 532-535.
- [11] Schneiderbauer A H, Sandermann J, Ernst D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds [J]. *Anal Biochem*, 1991, 197: 94-95.
- [12] L pez-G mez R, G mez Lim M A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp [J]. *Hort Sci*, 1992, 27(5): 440-442.

(下转第 47 页)

# An improved method for extracting total RNA used to RT-PCR from microalga

YANG Jing, NIU Yan, ZHANG Ke-wei, KONG Jian

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

**Received:** Apr., 16, 2008

**Key words:** *Pavlova viridis*; polysaccharides; polyphenols; RNA extraction; RT-PCR

**Abstract:** Microalga contains lots of polysaccharides and polyphenols, which make it difficult to extract total RNA from *Pavlova viridis*. Compared with Trizol method and acid guanidine-phenol-chloroform method, an improved CTAB method which can use the high concentration  $\beta$ -Mercaptoethanol to eliminate the interferences of polysaccharides and can use CTAB with both KAC and ethyl alcohol to eliminate the interferences of polyphenols was constructed in this study. It was shown that 28S and 18S ribosomal RNA bands are clearly visible and the  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  ratio of the isolated total RNA was 1.968. Through scanning the isolated RNA by using the ultraviolet spectrophotometer, the result indicated that it is good to reduce polysaccharides and polyphenols in the sample. This isolated RNA was intact and had been proven suitable for further molecular applications by RT-PCR result. It was indicated that the method was appropriate for RNA extraction of microalga.

( 本文编辑: 张培新)