

Isolation and Purification of Human Liver-Specific F Antigen and Preparation of Its Antiserum. Wang Junjun, Zao Zongnong, Zhuang Yiyi, Qiu Tinggang, Lu Wei. (*Department of Laboratory, General Hospital of Nanjing Command, PLA, Nanjing 210002*).

Abstract Human fresh livers were treated by homogenization and centrifugation, then were purified by sephadex-G200 column chromatog-

raphy. DEAE cellulose column chromatography, and polyacrylamide gel electrophoresis, pure human liver F antigen was obtained. Specific antisera were prepared by immunizing guinea pigs with the purified human F antigen.

Key words F antigen, human liver disease, isolation and purification, antiserum

一种简单、快速、经济的 mRNA 分离方法

王易伦 戴建新 郭瀛军 陆德如

(第二军医大学分子遗传教研室, 上海 200433)

摘要 对 oligo (dT) 纤维素纯化 poly (A) RNA 的方法进行了改良, 缩小了层析柱床的体积, 使填料用量仅为常规量的 1/50—1/100, 即在移液器尖嘴中进行层析, 与常规方法相比, 它具有实验时间短、洗脱的 mRNA 可直接合成 cDNA 和得率较高等优点.

关键词 mRNA, oligo (dT), 纤维素, 纯化

鉴于大多数真核生物的 mRNA 具有 3' 端 poly (A) 的特征, 目前, 分离 mRNA 广泛采用 oligo (dT) 纤维素层析法. 尽管这一方法成熟可行, 但仍存在以下问题: 层析流速较慢; 柱床易发生堵塞; 操作费时; 洗脱体积较大, 常需先沉淀浓缩后才能进行后续实验 (如 cDNA 合成); 在制备少量 mRNA 时, 回收率较低等. 据此, 我们对 mRNA 分离方法作了改良, 利用 oligo (dT) 纤维素吸附 mRNA 容量大的特点, 尽可能缩小层析柱床体积, 用移液器尖嘴 (tip) 作为层析柱, 对层析洗脱条件作了适当修改, 建立了微量 mRNA 半定量法与之配套. 我们把这一方法称为 Tip column 法. 现介绍如下.

1 材料与方法

1.1 RNA 提取

按改良酸性胍一步法^[1].

1.2 mRNA 分离

参照文献 [2] 作以下修改.

1.2.1 装柱 用高盐 STE (0.5mol/L NaCl; 20mol/L Tris-HCl, pH 7.5; 1mmol/L EDTA) 悬浮 oligo (dT) 纤维素 (Pharmacia 或 Sigma 产品), 去除沉降慢的细颗粒, 按柱床体积为 20 μ l (约 5—10mg) 的 oligo (dT) 纤维素最大载样量为 1mg 总 RNA 装柱. 层析柱为填有玻璃棉 (预先 200 $^{\circ}$ C 烤 4h 和硅化) 的微量加样器的黄色尖嘴 (Gilson 公司产品). 装好的 Tip 层析柱在 8lbf/in² 的压力下高压蒸气灭菌 20min 备用.

1.2.2 层析分离 总 RNA 溶于水中 ($\leq$ 1g/L), 65 $^{\circ}$ C 变性 5min, 冰浴骤冷, 加等体积 2 $\times$ 高盐 STE, 按流速为 0.2ml/min 上样层析 (可用洗耳球挤吹加压), 用 5 倍柱床体积的

高盐 STE 洗柱, 流出液再次上样并重复高盐 STE 洗柱步骤一次. 换用 3 倍柱床体积的低盐 STE (0.1mol/L NaCl; 10mol/L Tris · HCl, pH 7.5; 1mmol/L EDTA) 洗柱, 再用 4 倍柱床体积的 TE (10mol/L Tris-HCl, pH 7.5; 1mmol/L EDTA) 洗脱, 收集洗脱液, 65℃ 变性骤冷后, 加等体积 1mol/L NaCl, 待层析柱用高盐 STE 平衡后, 进行第二轮层析, 实验步骤同上, 但作以下两处变动: 省去低盐 STE 洗柱步骤, 将 mRNA 洗脱步骤改为分 4 次用 0.5 倍柱床体积的 TE 洗柱并分部收集洗脱液.

1.2.3 mRNA 估量 参照 Spot test^[3], 从分部收集的 mRNA 洗脱液中各取 0.5μl 样品与 10μl 10mg/L EB (用 10g/L 母液临时配制) 混合, 滴在黑色背景的塑料板上, 在紫外灯下与一组倍比稀释的 RNA 标准品比较定量.

1.3 cDNA 合成

按 Promega 或 Boehringer 试剂盒程序进行.

2 结 果

一般而言, 数百微克至 1 毫克总 RNA 用约 20μl 压积的 Tip column 可分离纯化 10—20μg mRNA, 分部洗脱的 mRNA 主要集中在第一管和第二管 (图 1). 由于洗脱体积小 (约 10μl), mRNA 浓度高, 故可直接用于 cDNA 合成. 实验用 Tip column 法先后从人成骨瘤细胞株 HOS-8603, 杂交瘤细胞 HGa-1, 胃癌手术标本, 疟原虫中分离 mRNA, 经反转录成

cDNA 证实, 分离的 mRNA 保持了分子完整性并具有良好的 cDNA 合成模板活性 (图 2).

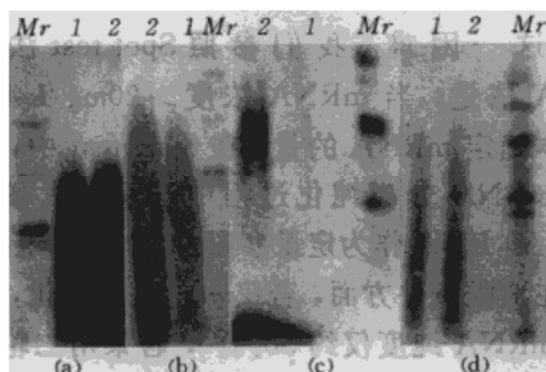


图 2 cDNA 碱性胶电泳放射自显影

(a) 人成骨瘤细胞 HOS-8603, (b) 杂交瘤细胞 HGa-1, (c) 人胃癌手术标本, (d) 疟原虫. 1, 2 分别表示 cDNA 的第 1, 2 链, Mr 表示 λ/HindIII 的标准分子量.

3 讨 论

oligo (dT) 纤维素吸附 poly (A) 的容量大, 如: 每克 Pharmacia 的 oligo (dT) 纤维素 7 型可吸附 80—100 单位的 260nm 光吸收度 (A_{260}) 的 poly (A), 每克 Sigma 的 oligo (dT) 纤维素也可吸附 >40 单位 A_{260} 的 poly (A) (每 1 个单位 A_{260} 相当于 40μg poly (A) RNA). 利用它们的这一特点, 我们在分离 mRNA 时尽可能减少 oligo (dT) 纤维素填料, 使柱床体积缩小; 如: 分离 10μg mRNA (按 0.25 单位 A_{260} 计), 仅需要约 3—6mg oligo (dT) 纤维素, 柱床体积约 10μl, 是常规用量的 1/50—1/100^[2]. 缩小柱床体积有以下几个益处: a. 缩短分离纯化的时间, 一般在 1h 之内可完成 mRNA 纯化, 减少 mRNA 被污染及降解的可能性; b. mRNA 洗脱体积小、浓度高, 不需进一步浓缩即可直接用于 cDNA 合成, 减少 mRNA 的损失和损伤; c. 提高分离少量 mRNA 的得率; d. 降低实验费用.

在小量制备 mRNA 时, 也给 mRNA 定量带来困难. 洗脱的 mRNA 若先稀释后再用紫外分光光度法定量, 则因浓度低而不易准确定

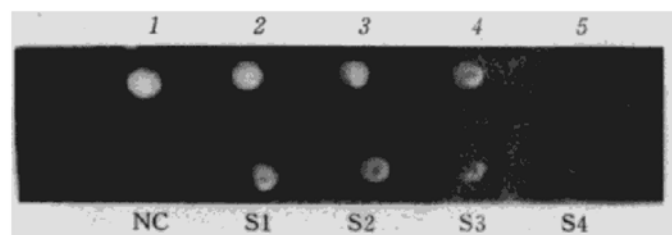


图 1 用 Spot test 估量 mRNA

1—5 为倍比稀释的 RNA 标准品 (100—25ng/μl), S1、S2、S3、S4 依次为分部洗脱的 mRNA 样品. NC 为阴性对照.

量;若对洗脱的 mRNA 直接定量后再回收使用,定量用的比色杯则需预先用浓盐酸:甲醇(1:1)等处理^[2],以防止 mRNA 被污染降解.针对这一困难,我们参照 Spot test 法对 mRNA 估量,当 mRNA 浓度 > 20mg/L 时,能基本确定 mRNA 的量.在 Spot test 中,可利用 mRNA 分离纯化过程中洗下的大量非 poly (A) RNA 作为定量参照的 RNA 标准品.

在洗脱条件方面,若仅一轮过柱纯化,分离的 mRNA 纯度仅约 50%^[4],若采用二轮过柱, mRNA 纯度可达 90%以上,但 mRNA 得率会降低 25%—50%^[5],文献指出,在低盐 STE 洗柱时,会有 1/3 的短 poly (A) RNA 被洗下^[6].在 Tip column 法中,一般作二轮过柱纯化,在第二轮过柱时省去低盐 STE 洗柱步骤,以兼顾 mRNA 的纯度和得率.此外,我们发现,在温度较低时,洗脱缓冲液中的 SDS 是引起柱床阻塞的主要原因之一;同时,残留在 mRNA 制剂中的 SDS 会灭活 cDNA 合成反应中的反转录酶^[3].因此,在 Tip column 法中所有洗脱缓冲液中均不加 SDS.

综上所述,本文对用 oligo (dT) 纤维素亲和层析 mRNA 的方法作了多方面的改进,由此建立的 Tip column 法能有效地提高纯化效率并改善 mRNA 制剂的质量.

参 考 文 献

1 孙仑泉,王易伦,毛积芳等.第四军医大学学报,1989;

10 (5): 353

- 2 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 金冬雁等译. 分子克隆. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992: 356—359
- 3 Okayama H. In: Wu R eds. Methods in enzymology. California: Academic Press Inc, 1987; 154: 28—41
- 4 Gubler U. In: Berger S L eds. Methods in enzymology. California: Academic Press Inc, 1987; 152: 330—334
- 5 侯云德主编. 病毒基因工程的原理与方法. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 243
- 6 沈羽珩, 吴宁华, 程小款. 生物化学与生物物理进展, 1986; 6: 62

A Simple Fast Economical Approach of mRNA Purification. Wang Yilun, Dai Jianxin, Guo Yingjun, Lu Deru (*Molecular Genetics Department, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China*).

Abstract A modified method of poly (A) RNA purification using oligo (dT) cellulose is described. The purification can be done in tip with cellulose, which consists of only 1/50—1/100 of the usual amount used. Contrast with the typical methods, it not only has the advantages of shorter experimental time and higher proportion of mRNA production, but can also produce mRNA which can be used as template of cDNA synthesis directly.

Key words mRNA, oligo (dT), cellulose, purification