

从矿化的骨组织中提取骨细胞的总 RNA^{*}

郭若霖 郭善一 左爱军 梁东春 张镜宇^{**}

(天津医科大学内分泌研究所, 天津 300070)

摘要 描述了两个从以含大量羟基磷灰石(钙)和细胞密度、数量甚低为特点的矿化的成年骨组织(成年大鼠颅骨)提取总 RNA 的改进方法。紫外分光光度法(A_{260} 、 A_{280} 和 A_{230})和 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳予以鉴定。进而以其逆转录的 cDNA 为模板扩增出 β -actin 和 BMP-2 基因, 均表明所得总 RNA 完整和模板活性俱佳。每克骨组织中总 RNA 产量为 560 μ g。

关键词 总 RNA, 骨组织, RT-PCR, 基因表达

学科分类号 Q52

提取一种组织细胞中的总 RNA, 通常是对该组织中 cDNA 克隆和基因表达进行研究的第一个步骤, 也是起决定性作用的一步, 因为总 RNA 提取的质和量是决定以后实验成败和质量的关键。从目前看来, 在研究骨组织的基因克隆时鲜有从骨组织中直接提取 RNA 者, 即使研究骨细胞基因表达调节, 也多以培养的骨细胞进行体外研究。这是因为骨组织的细胞外基质占实体的大部分, 且羟基磷灰石含量很高, 而骨细胞密度和数量又很低, 组织本身很硬, 不好处理。但是, 若要研究在体(*in vivo*)骨细胞在自然和整体状态下的基因表达, 则必须以活体的骨组织为材料。本文尝试从骨组织中直接提取总 RNA, 再进行 RT-PCR 验证, 获得了满意的结果, 证明用本文方法从矿化的骨组织中可以提取出完整的总 RNA 用于定性或定量 RT-PCR 工作, 为在体实验研究骨组织中的基因表达提供了简便、实用的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

正常成年(3~6月龄)Wistar 大鼠处死后, 剥出颅骨, 液氮速冻, -80°C 保存。

1.2 方法

1.2.1 本室常用的硫氰酸胍一步法^[1](以下简称一步法)的改进 1: 5ml 变性液(每升中含 4 mol 硫氰酸胍、25 mmol 柠檬酸钠、0.5% 十二烷基肌氨酸钠, 0.1 mol β -巯基乙醇)中加入 0.5 克颅骨组织, 冰浴下剪切匀浆 1 min, $12\,000\times g$, 4°C 离心 10 min, 弃去沉淀, 上清中依次加入 0.5 ml

2 mol/L 醋酸钠、2 ml 氯仿-异戊醇(49:1)、5 ml 水饱和酚, 剧烈混匀, 冰浴 15 min, $12\,000\times g$, 4°C 离心 20 min, 水相中加入 1/2 体积(-20°C)异丙醇和 1/2 体积的 0.8 mol/L NaAc-1.2 mol/L NaCl 混合液, 置 -20°C 1 h 沉淀 RNA, $12\,000\times g$, 4°C 离心 20 min 回收 RNA 沉淀, 复溶于 1.5 ml 变性液中, 加入 1.5 ml 冰冷异丙醇沉淀 RNA, 70% 乙醇洗 RNA 沉淀一次, 沉淀自然晾干, 溶于适量 DEPC 水中, 取 4 μ l 稀释至 1 ml 测定 A_{260} 、 A_{280} 和 A_{230} , 按 A_{260} 值取 10 μ g 进行 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定完整性。

1.2.2 一步法改进 2: 在变性液中加入等体积的水饱和酚后再进行匀浆, 其余步骤同上。

1.2.3 RT-PCR: 1 μ g 总 RNA 作模板, 按 M-MuLV 逆转录酶说明书进行逆转录, 取逆转录产物 1 μ l, 加入到 PCR 体系中, 内含大鼠 β -actin 上、下游引物^[2]、大鼠骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein, BMP-2) 上、下游引物^[3], 进行 PCR。PCR 循环参数: 变性 94°C 1 min, 退火 62°C 1 min、延伸 72°C 1 min, 30 个循环, 72°C 延伸 10 min。

2 结果和讨论

2.1 所提总 RNA A_{260} 、 A_{280} 和 A_{230} 的结果见表 1。一步法所提取的总 RNA 在 230 nm 下吸光度

* 国家自然科学基金资助项目 (39770669)。

** 通讯联系人。

Tel: 022-23542731, E-mail: zhangjingyu2000@eyou.com

收稿日期: 2000-07-24, 接受日期: 2000-09-28

高达 1.770, 而两种改进的方法的 A_{230} 均大大下降, A_{260}/A_{280} 均达到 1.85 以上. 一步法提取幼年大鼠颅骨组织的总 RNA 获得了满意的效果^[3], 但对充分钙化的成年大鼠颅骨则效果很差, 这是因为幼年大鼠骨组织钙化程度要远远低于成年大鼠. 虽然一步法提取的成年大鼠颅骨总 RNA 在 260 nm 有吸收, 但其 A_{230} 却异乎寻常地高, 说明提取液中有大量的糖类污染. 原因可能是骨组织中大量的

细胞外基质 (主要成分是蛋白多糖) 和矿物质干扰了 RNA 的分离, 会有大量骨基质中的高浮力密度粘蛋白即蛋白多糖 (high buoyant density proteoglycans) 与 RNA 在异丙醇中共沉淀下来^[4], 其显示的 A_{260} 只是这些高 A_{230} 物质也在 260 nm 下有光吸收所带来的一种假相. 实际上, 在提取物中 RNA 如果不是完全没有, 也是含量极少, 这可由电泳和 RT-PCR 结果证明.

Table 1 The spectrophotometrical parameters of RNA preparations extracted with different methods

Absorbency and ratio value	Single step guanidine method	Modified method 1	Modified method 2	TRIzol method
A_{260}	0.851	0.141	0.126	0.282
A_{280}	0.479	0.076	0.067	0.134
A_{260}/A_{280}	1.78	1.91	1.88	2.10
A_{230}	1.770	0.098	0.173	0.242

2.2 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳显示清晰的 28 S 和 18 S 两条带, 比例大约 2: 1, 证明所提总 RNA 完整 (图 1). 一步法所提 RNA 在电泳检查时上样量达到 50 μ g (按 A_{260} 计算) 未见 28 S 和 18 S 两条带, 也未见其他可被 EB 染色的物质 (图 1 第 6 道), 表明不存在 RNA 或量极微.

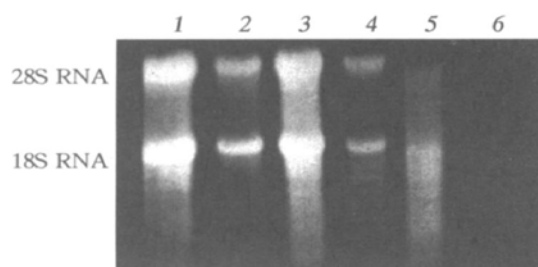


Fig. 1 Total RNA extracted with different modified methods analyzed on 1% formaldehyde denatured agarose gel

1, 3: RNA isolated with modified method 1; 2, 4: RNA isolated with modified method 2; 5: RNA isolated with TRIzol; 6: RNA isolated with single step guanidine method.

2.3 PCR 扩增出 762 bp (β -actin) 和 582 bp (BMP-2) 两条带 (图 2). 证明用所提取的总 RNA 逆转录的 cDNA 是进行 PCR 的合格模板. 一步法所提 RNA RT-PCR 未能成功.

Nemeth 等^[4]在 1989 年曾报道过一种改进了的硫氰酸胍-CsCl 梯度离心法, 成功地从成年大鼠的股骨中提取了完整的总 RNA, 但整个过程需要

3 d, 还需要超速离心机等一般实验室没有的昂贵设备. 李卫东等^[5]将成年大鼠的胫骨先用切片机制成厚度 20 μ m 的冰冻切片然后再进行总 RNA 的提取, 虽获得了较好的结果, 但由于需要先期做冰冻切片, 整个实验时间大大延长, 增加了 RNase 污染和 RNA 降解的机会. 我们用近年来颇为流行的 TRIzol 试剂也从成年大鼠的颅骨中分离出用于 RT-PCR 的总 RNA, 但同本文改进的方法相比, TRIzol 试剂的效果并不十分理想且比较昂贵.

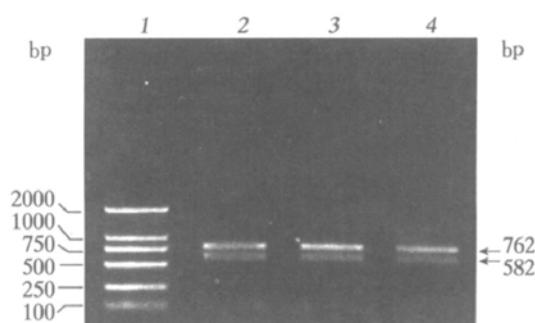


Fig. 2 RT-PCR products from bone RNA templates prepared with different methods

1: DL2000 DNA markers; 2: RT-PCR result of RNA isolated with modified method 1; 3: RT-PCR result of RNA isolated with modified method 2; 4: RT-PCR result of RNA isolated with TRIzol.

总之, 本文对一步法作了两种改进, 两种方法均大大降低了总 RNA 中的粘蛋白污染. 总 RNA 的产量平均为 560 μ g 每克骨组织.

参 考 文 献

- 1 赵 崇, 王立彬, 宋学文, 等. 大鼠脑神经原特异性烯醇化酶 (NSE) 基因 cDNA 克隆及序列分析. 生物化学杂志, 1994, **10**: 270
Zhao C, Wang L B, Song X W, *et al.* Chin Biolchem J, 1994, **10**: 270
- 2 Siegling A, Lehmann M, Platzer C, *et al.* A novel multispecific competitor fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats. J Immunol Meth, 1994, **177** (1~2): 23~28
- 3 郭若霖, 郭善一, 鲍秋野, 等. 竞争性 RT-PCR 测定法: BMP-2 mRNA 的定量检测. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, **16** (5): 680~683
Guo R L, Guo S Y, Bao Q Y, *et al.* Chin J Biochem Mol Biol, 2000, **16** (5): 680~683
- 4 Nemeth G G, Heydemann A, Bolander M E. Isolation and analysis of ribonucleic acids from skeletal tissues. Anal Biochem, 1989, **183** (2): 301~304
- 5 李卫东, 黄凤歧, 谭郁彬, 等. 正常及去势大鼠骨组织内雌激素受体 mRNA 表达水平的研究. 中华病理学杂志, 1995, **24** (5): 312~314
Li W D, Huang F Q, Tan Y B, *et al.* Chin J Pathol, 1995, **24** (5): 312~314

Total RNA Isolation from Mineralized Skeletal Tissue*

GUO Ruo-Lin, GUO Shan-Yi, ZUO Ai-Jun, LIANG Dong-Chun, ZHANG Jing-Yu**

(Endocrinology Institute, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Two modified one-step acid guanidinium thiocyanate-phenol methods were reported for the isolation of total cellular RNA from mineralized skeletal tissues. The measurement of optical density of RNA extracts showed that the ratios of A_{260} to A_{280} were greater than 1.85, the values of A_{230} decreased to an acceptable level which meant the contaminated carbohydrate was removed mostly from the preparations of total RNA. Bands of 28S RNA and 18S RNA could be seen apparently on the 1% formaldehyde-agarose gel. Total RNA could be reverse transcribed into cDNA and β -actin and BMP-2 gene were successfully amplified by PCR. The results showed that the total bone tissue RNA was the qualified template for RT-PCR.

Key words total RNA, bone tissue, RT-PCR, gene expression

* This work was supported by a grant from National Natural Sciences Foundation of China (39770669).

** Corresponding author. Tel: 86-22-23542731, E-mail: zhangjingyu2000@eyou.com

Received: July 24, 2000 Accepted: September 28, 2000