

一种快速分离分析 RNA 的方法

刘朵花 张绍斌 史燕青

(中国科学院生物物理研究所)

用凝胶电泳制备核酸,费时,回收率较低(40—50%左右),并且制备分析过程中常常丧失部分或全部生物活性。最近用琼脂糖-尿素(用溴化乙锭染色)进行电泳,抽提时在正丁醇中引入溴代十六烷基三甲胺,不仅使电泳制备方法变得简单迅速,而且分辨率高,回收率好(80%以上)。可直接分离分析用酚处理的细胞抽提液中的 RNA 混合物,分离的 RNA 具有较高的生物活性,既可用于 RNA-DNA 杂交的底物,又可作为体外无细胞翻译体系中的模板。

我们参照文献[1,2],用不同的核酸为材料建立了这一电泳方法。

材料和方法

家蚕细胞质多角体病毒 RNA 是本所赵鼎赠送;酵母 tRNA 是上海东风生化试剂厂制品,小鼠肝细胞质总 RNA 及兔珠蛋白 mRNA 为本组制备。溴代十六烷基三甲胺(以下简称 BDH)用前经过重结晶^[3]。

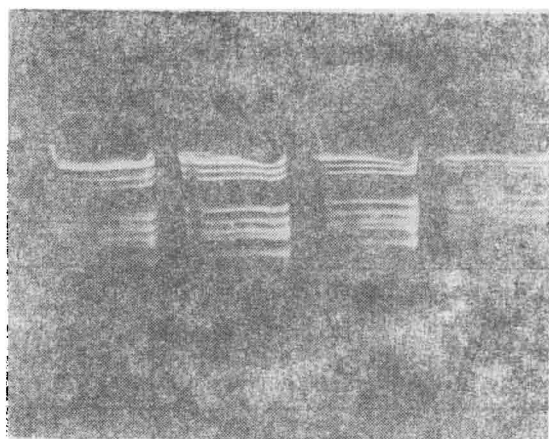
琼脂糖-尿素凝胶平板电泳 100ml 凝胶溶液中含有 1 克琼脂糖、36 克尿素、5ml 0.03M 碘乙酸、10ml 的电泳储备液(0.9 M Tris, 0.9 M H_3BO_3 , 0.025 M EDTA, pH8.3), 1—2 滴溴化乙锭(5mg/ml)。实验用卧式平板电泳仪,制胶平板为 $16 \times 14.5 \times 0.5$ cm。琼脂糖在沸水浴中加热 10 分钟,冷至室温灌入胶槽,放 $4^\circ C$ 冰箱内聚合。电泳缓冲液中含有 90mM Tris, 90mM H_3BO_3 , 2.5mM EDTA, pH8.3。电泳在 $10^\circ C$ 左右进行,电流 20mA, 电泳 3—6 小时。

电泳完毕,切下 RNA 区带。

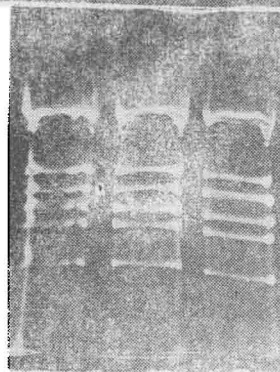
自凝胶带中抽提 RNA 抽提试剂的制备

按 3.67% 之比将 BDH 溶于水饱和的正丁醇中,然后将此溶液与等体积的正丁醇平衡过的水一起在分液漏斗中震荡;室温过夜使两相分离。

将 RNA 胶带于 $75^\circ C$ (90 秒)熔化加入正丁醇平衡过的水和上述含 BDH 的抽提试剂(三者体积比为 1:1:2)。震荡 50 次以上,离心 3 分钟(3000 rpm)。取出正丁醇相;水相再用



A.



B.

图 1 多角体病毒 RNA 粗抽提物在 1% 琼脂糖-6M 尿素平板凝胶上的电泳图谱

A. 电流: 10mA, 时间: 10 小时。

B. 电流: 20mA, 时间: 5—6 小时。

点样量均为 $1.25 \mu g/\mu l$; 25—30 μl 。

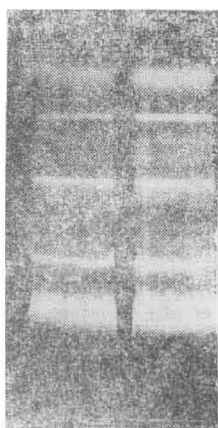


图2 小鼠肝细胞质总 RNA 的琼脂糖 (1%) - 尿素 (6M) 平板凝胶电泳图谱 (电泳条件同图 1A)
1. 4sRNA 2. 5sRNA
3. 18sRNA 4. 28sRNA

不含 BDH 的正丁醇抽提两次。合并有机相, 以四分之一体积的 0.2N NaCl 抽提 2—3 次。水相合并, 冰水浴中滴加等体积的氯仿以除去 BDH。水相加 3 倍体积的乙醇, 即可得到纯净的 RNA。

结 果

图 1、图 2 是不同来源的 RNA 用 1% 琼脂糖-6M 尿素平板凝胶电泳得到的图谱。图 1 是未提纯的家蚕细胞质多角体病毒 RNA 混合物。电泳结果和用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离

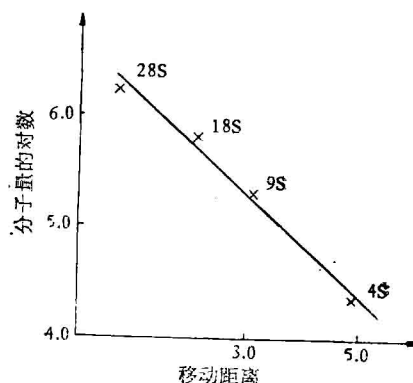


图3 不同 RNA 在琼脂糖-尿素凝胶电泳中的泳动距离和其分子量的关系
4s-酵母 tRNA, 9s-兔珠蛋白 mRNA, 18s 和 28s 为小鼠肝细胞的 rRNA。

的图谱十分相似^[4]。

6M 尿素在本体系中是不完全的变性剂。因此, 这一电泳方法只能给出近似的分子量对数与泳动距离的线性关系^[5](图 3), 和甲基氢氧化汞相比, 尿素变性能力较差, 但它具有不影响 RNA 生物活性的优点。

从用含有 BDH 的正丁醇抽提 RNA 凝胶带(图 4)和回收率实验(表 1), 说明此方法不但简单、节省时间, 而且回收率高。

表 1 tRNA 回收率实验结果

编 号	起始 A_{260}	所得 A_{260}	回收率
0.605	1.65	1.33	84%
0.602	12.9	10.33	80%
0.623	1.64	1.40	84%

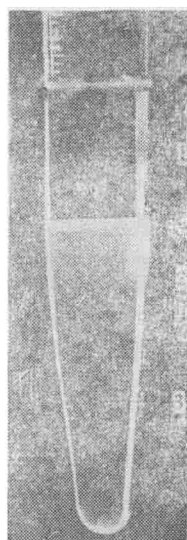


图 4 RNA 凝胶带的分层情况

RNA 琼脂糖 2ml 加 2ml 水平衡, 用 4ml 的正丁醇振荡以后离心 (2000 rpm), 分为三层: 1. 正丁醇, 2. 琼脂糖, 3. 水相

讨 论

提取 RNA 过程中, 防止 RNase 引起的降解, 是关键的一步。我们在制胶时加入的碘乙酸, 可造成 RNase 不可逆的失活, 是较理想的 RNase 抑制剂。

在凝胶中加入 6M 尿素, RNA 区带紧密, 从而大大提高电泳的分辨率, 图谱十分清晰。同时, 加入尿素的凝胶在较低温度下才凝固, 使 RNA 易于回收。

凝胶的浓度对 RNA 分辨率有明显的影响。在琼脂糖为 0.5—2.0% 的区间内, 胶浓度较低则高分子量的 RNA 有较高的分辨率, 而胶浓度较高时, 则中等和低分子量的 RNA 分离的较好。

本法用正丁醇-BDH 回收核酸。因 BDH 在盐的水溶液中与带负电荷的核酸形成复合物, 并借助 BDH 的十六烷基的疏水能力进入醇层, 当水相盐浓度增高时, 此复合物再转移到

水相中并发生解离, 再用氯仿即可把 BDH 从水相中除去。BDH 的引入, 使核酸的回收变得简单、有效。

参 考 文 献

- [1] Langridge, J. et al.: *Anal. Biochem.*, **103**, 264, 1980.
- [2] Locker, J.: *Anal. Biochem.*, **98**, 358, 1979.
- [3] Hurst, R. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **444**, 75, 1976.
- [4] Lewandowski, L. J. et al.: *J. Virol.*, **7**, 434, 1971.
- [5] Dudov, K. P. et al.: *Anal. Biochem.*, **76**, 250, 1976.

[本文于1982年1月28日收到]

Trichoderma sp. 纤维素酶内源抑制剂的进一步纯化与特性

齐义鹏* 陈一平

(中国科学院成都生物研究所)

雷克健

(中国科学院生物物理研究所)

最近十多年开展起来的微生物酶内源抑制剂的具有重大意义^[1,2]。目前, 发现了十多种酶都有抑制剂^[2]。我们从 *Trichoderma* sp. 867 培养液中曾得到纤维素酶的内源抑制剂粗粉^[3]。本文报道它的进一步纯化和某些理化性质。

一、材料和方法

1. 材料: 起始材料为桔黄色抑制剂粗粉, 其半抑制剂量 (I_{50}) 为 $1.3-1.4 \times 10^{-6} \text{mM}$ 。纤维素酶为提纯 40 倍的灰白色粉末^[3]。Sephadex G-25、蓝色葡聚糖均系 Pharmacia 公司产品, Ampholine 为 LKB 公司生产, 其余所用试剂均系 AR 级。

2. 方法:

1. 凝胶过滤: 抑制剂用 Sephadex G-25 在 LKB 柱层析系统上进行纯化, 或用国产蛋白核酸检测仪记录洗脱过程。柱体积 $1.6 \times 100 \text{cm}$, 预先用 0.05%、pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液平

衡。以蓝色葡聚糖和重铬酸钾标定柱参数。

将 0.5 克抑制剂粗粉溶于 5.0 毫升洗脱液中, 离心, 取上清液 3.0 毫升上柱。同一缓冲液洗脱。流速 $3.2-4.0 \text{ml 分}^{-1}$ 。分部收集, 合并具有抑制活力的组分, 冷冻真空干燥, 得干粉即为纯化样品, 供以下实验应用。

2. 抑制活力测定: 用 3,5 二硝基水杨酸 (DNS) 法^[3]测抑制剂对纤维素酶水解羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 的抑制作用。

3. 分子量测定: 采用上述凝胶过滤法^[4]。为消除凝胶对样品的滞留, 洗脱改用 30% 醋酸 (HAC)。以折分后的胰岛素(四川医学院制药厂生产) A、B 链和酶解胰岛素后的两个片段以及催产素(成都制药三厂生产)为测定分子量的标准。

胰岛素折分^[5]: 称样 5.0 毫克, 加巯基乙醇 100 微升, 尿素 0.48 克, 0.02M pH8.3 磷酸缓

* 现为武汉大学病毒系教师