



二种简便迅速分离 RNA 的方法

沈 萍

(武汉大学生物系, 武昌 430072)

关键词 核糖核酸, 分离

RNA 是基因表达的第一产物, 但有些病毒中 (如 RNA 病毒、反转录病毒) 的遗传物质就是 RNA。近年来的研究表明, 某些 RNA 还有酶的功能, 因此 RNA 在基因表达过程中和在生命起源的研究方面均占有重要地位^[1]。随着对 RNA 研究工作的迅速开展, 分离 RNA 的方法也不断改进和完善。

分离 RNA 的困难主要是由于 RNA 很容易被 RNA 酶降解, 而此酶又特别稳定, 所以不易得到较完整的 RNA 分子。但高纯度的、具有充分长度的 RNA 分子在克隆基因、分析基因表达以及建立 cDNA 文库等都是十分重要的, 甚至是关键的。所以所有分离 RNA 的方法中, 从第一步开始就需要设法将样品处于一个能强烈抑制 RNA 酶的环境中。硫氰酸胍 (guanidinium thiocyanate) 及其氯化物是最有效的蛋白质变性剂之一^[2,3]。Cox^[4] 首先将氯化胍 (Guanidium chloride) 作为 RNA 酶抑制剂用于 RNA 的分离, 通过改进形成了目前通用的硫氰酸胍/热酚法^[5]和硫氰酸胍/CsCl 超离心法^[6]。

近年来, 随着分离 RNA 方法学研究的进展, 出现了更为简便迅速的分离程序, 可在 3—4h 内完成全部分离过程, 而且所分离的 RNA 产量和纯度都很高, 和过去常规方法比较, 除了简便迅速外, 还有一优越性就是可以从小量的组织或细胞中分离得到 RNA, 也可用于分离大批样品, 所以尤其适用于基因表达的研究, 因为这种研究所用的材料是有限的。

下面结合我们的工作体会介绍二种简便迅速分离 RNA 的方法。

1. AGPC 法 (acid Guanidinium Thiocyanate-phenol-chloroform Extraction)^[7]

此法是将 Feramisco 的硫氰酸胍-热酚法改进后由一步完成。所用的主要试剂是由 4mol/L 硫氰酸胍, 25mol/L NaCl pH7.0, 0.5% Sarcosyl 0.1mol/L 巯基乙醇组成的变性剂, 即溶液 D。将 100mg 的动物组织置匀浆器中, 加 1ml 溶液 D 在室温下进行研磨均

匀, 然后转入一支 4ml 容积的小试管中, 依次加入 0.1ml 2mol/L 醋酸钠 pH4, 1ml 酚和 0.2ml 氯仿-异戊二醇 (49:1), 混匀, 并用力振摇 10s, 置冰浴 15min, 离心后 (12000r/min, 20min 4℃), 溶液呈二相, RNA 存在于上层水相; 而 DNA 和蛋白质存在于界面和下层有机相中, 取出水相, 加 1ml 异丙醇沉淀 1h (-20℃), 离心后其沉淀重新溶于 0.3ml 溶液 D 中, 再用 1 倍体积的异丙醇沉淀 1h (-20℃), 离心, 将 RNA 沉淀用 75% 的乙醇洗一次, 真空干燥后, 将 RNA 沉淀溶解在 50μl 0.5% 的 SDS 溶液中 (经 DEPC 处理) 置 65℃ 水浴 10min, 也可溶于 DEPC 处理过的双蒸水或 1mmol/L EDTA pH8 中。整个步骤可在 4h 内完成, 不需超速离心机。所用的材料如果是大量制备可用 30g 组织, 小量制备可用 30mg 组织或 10⁶ 细胞。

2. RNAzol™ 法

此法是对 AGPC 法的进一步改进和精练。RNAzol™ 是用来分离 RNA 的变性剂的商品名称, 其成分除了 AGPC 法中溶液 D 所包含的成分外, 还包含了酚, 所以这一方法显得更为简单方便, 一般在 3h 内可完成 RNA 的分离。此法主要是根据 RNA 分子在用 RNAzol™ 变性剂进行样品抽提中保持水溶性并与硫氰酸胍形成复合物的特性进行的, 其步骤如下:

将 100mg 动物组织加 2ml RNAzol™ 变性剂, 在匀浆器中捣匀, 如果是细胞, 则每 10⁶ 个细胞中加 0.2ml RNAzol™, 用吸管反复吹吸使溶液均匀, RNA 溶解。然后向 2ml 样品中加 0.2ml 氯仿, 用力振摇 15s, 置冰浴 15min, 离心后, 溶液成两相, RNA 全部留在上层水相。取出水相加等体积的异丙醇, 置 -20℃ 沉淀 45min, 离心后用 75% 乙醇洗两次, 真空干燥沉淀, 最后溶于 0.5% SDS 或 1mmol/L EDTA pH7.5 溶液中, 如溶解大量制备的 RNA, 需要在 60℃ 保温 10—15min。所有的溶液都要用 DEPC 处理。

以上二种方法得到的 RNA 是十分纯的, 无 DNA 和蛋白质, 260/280 比率高于 1.9。而且所得到的 RNA

分子具有较好的完整性。图 1 显示了用 AGPC 法(图中,1,3)和硫氰酸胍- CsCl 超离心法(图中,2,4)从鼠乳腺(图中 1, 2)和鼠肝脏(图中, 3,4)中分离的 RNA 经 1% 甲醛-琼脂糖凝胶电泳的结果比较。从图中可以看出两种分离方法所得到的 RNA 都显示了明显的 28s 和 18s RNA。

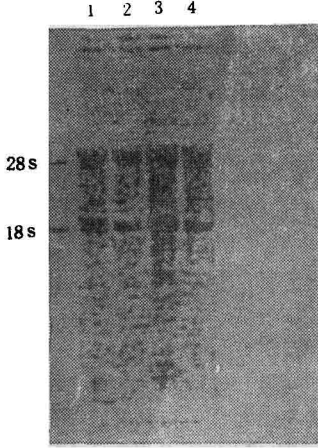


图 1 用 AGPC 法和硫氰酸胍- CsCl 离心法从鼠乳腺和肝脏中分离的 RNA 的凝胶电泳
1,3:AGPC 法; 2,4: 硫氰酸胍- CsCl 离心法

虽然上述两种方法都是为分离真核生物的 RNA 而设计的,但同样适用于原核生物,其效果也优于常用的硫氰酸胍- CsCl 超离心法,得率和纯度都很高,只需作适当的修改,以大肠杆菌为例:一般是以 1% 的接种量将过夜培养物接种到含有 300ml 培养基的 1000 ml 的三角瓶中,在 37℃ 振荡培养 3h 左右,使其 $\text{OD}_{600} = 0.3$ 左右,离心收集细胞,并将细胞悬浮在 10ml TE 缓冲液中,然后转移至另一支 30ml 的离心管中进行离心,弃上清,再向细胞沉淀中加入 5ml RNAzol™,用吸管反复吹吸数次,促使 RNA 溶解,加 0.5ml 氯仿,振荡 15s,置冰浴 15min,收集上层水相;经异丙醇沉淀、酒精洗涤、真空干燥等步骤后,将 RNA 沉淀溶于 0.2 ml TE 缓冲液中,260/280 比率可达 1.95 到 2.0,从 300ml 培养物分离得到的 RNA 由 OD 值计算的总量

可达 0.8g 左右。

从以上两种方法得到的 RNA 可用于斑点杂交,分离特定基因的 mRNA,用 oligo(dT)-纤维素进行 Poly(A)⁺ 的选择试验等。图 2 显示了用 RNAzol™ 法从大肠杆菌 (*E.coli* RV) 中分离的 RNA 经 oligo(dT) 层析后所得到的 Poly(A)⁺ mRNA 为模板合成单链 cDNA 的时间曲线。

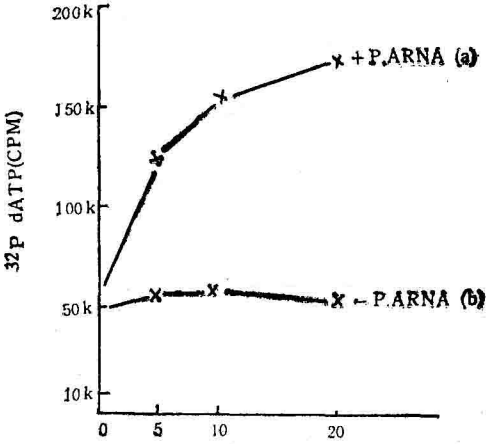


图 2 大肠杆菌 Poly(A)⁺ RNA 通过逆转录酶合成单链 cDNA 的时间曲线
(a): 以 Poly(A)⁺ mRNA 为模板
(b): 对照,无 Poly(A)⁺ mRNA 模板

参 考 文 献

- 1 刘望夷等. 生物化学与生物物理进展, 1989; 16(1): 2
- 2 Nozaki Y *et al.* *J Biol Chem*, 1970; 245:1648
- 3 Gordon J A *et al.* *Biochemistry*, 1972; 11:1862
- 4 Cox R A. In: Grossman L *et al* eds., *Methods in Enzymology*, Orlando FL: Academic Press, 1968; 12: part B: 120
- 5 Feramisco J R *et al.* In: Maniatis T *et al* eds., *Molecular cloning*. New York: Cold spring Harbor Laboratory, 1982: 194—195
- 6 Chirgwin J M *et al.* *Biochemistry*, 1979; 18:5294
- 7 Chomezynski P *et al.* *Analytical Biochemistry*, 1987; 156—159

[本文于 1989 年 9 月 12 日收到]