

介绍一种简便的 RNA 分离制备方法

刘西平 袁恬莹

(湖南医科大学分子生物学研究室,长沙)

提 要

用酸性异硫氰酸胍-苯酚-氯仿混合物,从人外周血白细胞、组织培养的细胞株及人胚组织中分离制备总 RNA,所得产品纯度高,未降解,方法简便,可以同时操作较多的样品。此法确是一种较好的 RNA 分离制备方法,值得推广。

关键词 RNA, 分离制备, 异硫氰酸胍

在分子生物学的许多研究领域,均要求制备高纯度、未降解的 RNA。目前最常用的制备 RNA 的方法是 Chirgwin 氏方法^[1],因为该法操作时间长、需要昂贵的氯化铯试剂以及超速离心,给实验带来了较大的不便。

本文介绍一种简便的 RNA 分离制备方法^[2],从人外周血白细胞、组织培养的细胞株以及人工流产的胚胎组织中提取总 RNA,经鉴定质量符合要求,通过 Northern 印迹杂交分析,结果较好。这为研究细胞和组织中各种特异基因表达、调控以及 cDNA 文库的制备,提供了有效的工具。该法操作简单、周期短,不需要大型仪器设备,适于同时操作较多样品。

材 料 和 方 法

一、试剂

异硫氰酸胍、 β -巯基乙醇等系 Fluka 公司产品,十二烷基硫酸钠(SDS)、十二烷基-N-甲基甘氨酸钠、鲑鱼精子 DNA 等系 Sigma 公司产品, α -³²P-dCTP(> 400Ci/mmol)、多引物标记药盒系 Amersham 公司产品,聚乙烯吡咯烷酮、小牛血清白蛋白、 λ DNA/Hind III 等系 BRL 公司产品,甲酰胺、HEPES 系 Merck 公司产品,焦碳酸二乙酯(DEPC)系 Aldrich 公司产品,琼脂糖系 Serva 公司产品,硝酸纤维

素膜(BA85, 0.45 μ m)系 S&S 公司产品, X 光片系上海感光材料厂产品,其它化学试剂均为国产分析纯试剂。

变性溶液: 4mol/L 异硫氰酸胍, 25mmol/L 柠檬酸钠(pH7), 0.5% 十二烷基-N-甲基甘氨酸钠, 0.1mol/L β -巯基乙醇。

苯酚溶液: 用双蒸水平衡重蒸苯酚, 置 4 $^{\circ}$ C。

HE 溶液: 10mmol/L HEPES, 1 mmol/L EDTA(pH8)。

二、样品来源和提取方法

1. 从白细胞中提取 RNA

人外周血样来自湖南医科大学附属二院血液研究室和血库自愿献血者。取 10ml 外周静脉血,加肝素抗凝,用氯化铵-碳酸氢铵缓冲液选择性地溶解红细胞^[3],离心分离白细胞。白细胞可立即用于提取 RNA 或置液氮中保存备用。白细胞(10^7 — 10^8 个细胞)中加入 5ml 变性溶液,混匀后加入 0.5ml 2mol/L 醋酸钠(pH4)、5ml 苯酚溶液和 1ml 氯仿-异戊醇混合液(体积比 49:1),振摇 10 秒钟,置冰浴中 15 分钟,10000g、4 $^{\circ}$ C 离心 20 分钟,取上层水相,加入等体积异丙醇,置 -20 $^{\circ}$ C 1 小时以上再离心(条件同上),沉淀部分(RNA)用 1.5ml 变性溶液溶解,加 1.5ml 异丙醇,置 -20 $^{\circ}$ C 1 小时以上再离

心(条件同上),沉淀部分(RNA)用75%乙醇洗涤一次,真空干燥,用50 μ l 0.5% SDS溶解,贮存于-70 $^{\circ}$ C深低温冰箱备用。

2. 从培养细胞株中提取 RNA

按常规方法,悬浮培养 K 562 细胞和贴壁培养 HeLa 细胞,在普通离心机上离心(2500r/min, 10分钟),收集的细胞(10^6 — 10^8 个细胞)可立即用于 RNA 提取或置液氮中保存备用。RNA 提取步骤同 1。

3. 从人胚组织中提取 RNA

人胚组织系由湖南医科大学附属一院和二院妇产科提供的妊娠3个月以内人工流产的吸宫组织及妊娠5个月的引产胚胎。样品取得后立即以冰冷生理盐水洗去血污,迅速辨认胚胎组织或取出引产胚胎的不同脏器,剪碎并将它立即置于液氮中。每1g冰冻组织加5ml变性溶液,快速匀浆,匀浆后 RNA 提取步骤同 1。

结果和讨论

一、紫外分光分析

RNA 制品经紫外分光分析,测得其 A_{260} 与 A_{280} 的比值均大于 1.8,表明基本上无蛋白质的污染。

RNA 制品经 BECKMAN DU-7 分光光度计扫描作吸收光谱测定,其紫外吸收光谱曲线呈典型的核酸吸收光谱曲线(图1),在 260nm 波长处呈一吸收高峰。

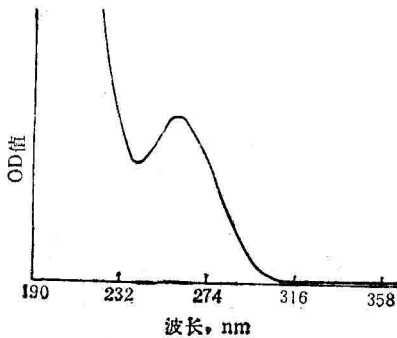


图 1 RNA 制品的紫外吸收光谱

二、电泳分析

RNA 制品经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳^[4], 28S 与 18S 区带清晰集中(图 2), 光密度扫描

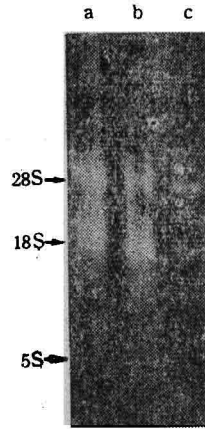


图 2 RNA 制品的电泳分析

来自于 50 天 (a), 60 天 (b) 的人胚及 HeLa 细胞 (c) 的总 RNA 在 1.2% 甲醛变性琼脂糖凝胶上电泳, 用 2 μ g/ml 溴乙锭染色

表明 28S 与 18S 的比值均大于 2, 表明 RNA 制品未降解。

三、mRNA 的分离

根据 Aviv 等^[5]的方法, 用寡聚胸苷纤维素亲和和层析法分离 poly A mRNA, 其洗脱图谱(图 3)表明 mRNA 的 poly A 尾未被降解。

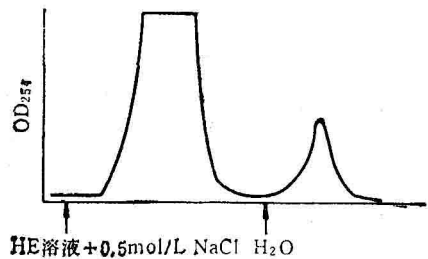


图 3 RNA 制品经寡聚胸苷纤维素亲和和层析

四、Northern 印迹杂交分析

为了进一步验证经本文方法所提取的 RNA 是否可用于基因表达分析, 我们将其中部分 RNA 制品进行了 Northern 印迹杂交分析^[6]。当 RNA 印迹膜与 β -actin 探针进行分子杂交后, 其放射自显影图谱上可见一 2kb 左右的区带(图 4A); 当 RNA 印迹膜与一基因探针(待发表)进行分子杂交后, 其放射自显影图谱上主要显示一 5kb 左右的区带(图 4B)。上述结果表明所提 RNA 制品能够用于细胞和人胚组织发育中各种基因表达的研究。

(下转第 69 页)

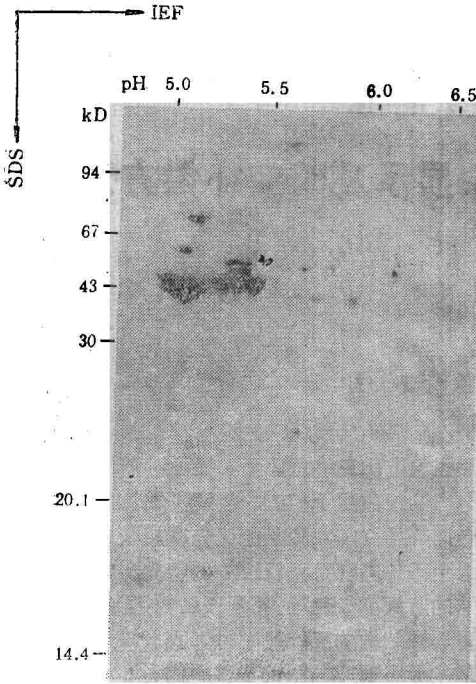


图3 普通小麦黄化幼苗线粒体多肽的双向 IEF-SDS 图谱 12.5:1 之间都是可行的,至于何种比率最合适,有待于进一步的研究。

实验中,我们还发现除第一向等电聚焦的
(上接第66页)

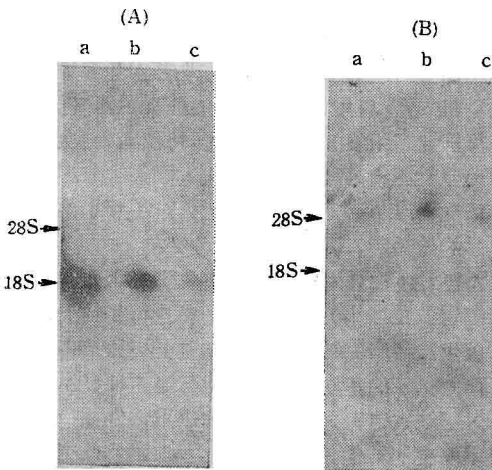


图4 RNA制品的 Northern 印迹杂交分析 来自于30天(a),40天(b)和50天(c)的总RNA 经电泳、转移、与 β -actin 探针(A)和一基因探针 (B)杂交的放射自显影

RNA分离制备的成功,关键在于消除RNA 酶活性。本方法由于从一开始样品就置于4mol/L 异硫氰酸胍和 β -巯基乙醇中,使得RNA酶

效果会影响第二向电泳结果中蛋白质斑点的形状外;第二向电泳浓缩胶的长度与第一向胶柱直径的比例也会影响其形状。经验表明,在本实验条件下这个比例为4:1时,蛋白质斑点呈椭圆形,可达到提高分辨率的目的。

在凝胶染色问题上,为避免载体两性电解质的干扰,采用考马斯亮蓝法时可在染色液中加入一定浓度的硫酸铜^[9]。实验表明效果确实明显,但原理目前还不清楚。

参 考 文 献

- 1 O'Farrell P H. *J Bio Chem*, 1975; 2250(10): 4007
- 2 Ames G F L *et al. Biochemistry*, 1976; 15(3): 616
- 3 Diano M. *Plant Physiol.*, 1982; 69: 1217
- 4 Hurkman W J *et al. Plant Physiol*, 1986; 81: 802
- 5 Day D A' *et al. Plant Science Letters*, 1977; 11: 99
- 6 Douce R *et al. Biochem Biophys Acta*, 1972; 275: 148
- 7 Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248
- 8 Laemmli U K. *Nature*, 1970; 227: 680
- 9 Osterman L A. *Methods in Protein and Nucleic Acid Research*. Springer-Verlag, 1984; (1), 180
- 10 Pharmacia Fine Chemicals AB. *Isoelectric Focusing*, 1982
- 11 Bravo R. In: Celis J E *et al eds, Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins*, London: Academic Press Inc, 1984: 3

[本文于1988年11月29日收到]

处于失活状态,直到最后一步。因此没有特殊的要求来保护RNA以防降解,这就省去了在常规RNA制备法中对许多试剂和器皿要求特殊处理的不便。同时,在采样过程中即用了快速冰冻,降低并抑制了内源性RNA酶的活性。因此本法成功率较高,操作简便,我们认为它是一种较好的RNA制备方法,值得推广。

杨友云同志收集部分人胚,郭文君同志提供组织培养细胞,黄培宇同志协助照片拍摄与印制,在此一并致谢。

参 考 文 献

- 1 Chirgwin J M *et al. Biochemistry*, 1979; 18: 5294
- 2 Chomczynski P, Sacchi N. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156
- 3 Procz M *et al. Hemoglobin*, 1982; 6: 27
- 4 Maniatis T *et al. Molecular cloning—A laboratory manual*. New York: CSH, 1982: 202
- 5 Aviv H *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1972; 69: 1408
- 6 Meinkoth J, Wahl G. *Anal Biochem*, 1984; 138: 267

[本文于1988年10月12日收到]