

肽等的一般氨基酸组成分析, 用作 PTC-氨基酸分析的流动相有广阔的前景.

参 考 文 献

- 1 Koop D R, Morgan E T, Tarr G E *et al.* J Biol Chem, 1982; **257**: 8472
- 2 Heinrikson R L, Meredith S C. Anal Biochem, 1984; **136**: 65
- 3 Bidlingmeyer B A, Cohen S A, Tarvin T L. J Chromatogr, 1984; **336**: 93
- 4 Gopalakrishna R, Anderson W B. Biochem Biophys Res Commun, 1982; **104**: 830

- 5 Pico-Tag amino acid analysis system, operator's manual (Millipore-Waters Chromatography Division). 1984
- 6 Perham R N, Thomas J O. In: Young G T ed. Amino-acids, peptides and proteins, London: The Chemical Society, 1972; 107
- 7 Marme D, Dieter P. In: Cheung W Y ed, Calcium and cell function (vol. 4), New York: Academic Press, 1983; 268
- 8 Engelhardt H 著, 杨文澜等译. 高效液相色谱法. 北京: 机械工业出版社, 1982: 128
- 9 Oliver R W A. HPLC of macromolecules. New York: IRL Press, 1989: 142
- 10 Wilkinson J M. J Chromatogr Sci, 1978; **16**: 547

从少量转染细胞中同时快速提取 总 RNA 和基因组 DNA *

张宏权 王会信 周廷冲 王允玲

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 采用 4mol/L LiCl 将 DNA 和 RNA 分相, 建立了同时从少量转染细胞中快速提取细胞总 RNA 和大分子基因组 DNA 的方法. 与以前的方法相比, 本法快速、简便、经济, 尤其适合应用在哺乳动物细胞基因表达与调控的研究中.

关键词 总 RNA, 基因组 DNA, 基因表达与调控

在利用培养细胞进行真核基因表达与调控研究时, 需要从 DNA, RNA 及蛋白质三个方面来同时评估某一表达系统的外源基因整合水平 (拷贝数), mRNA 的转录水平和目的蛋白表达的水平, 进行这种研究时需要提取细胞基因组 DNA 和细胞浆总 RNA. 然后, 通过 DNA 印迹确定外源基因的整合状态, 通过 RNA 印迹确定 mRNA 的转录水平. 以往提取细胞 DNA 和总 RNA 的方法有很多^[1,2], 各有特色, 但解决上述问题时, 它们的共同弊端是, 不能从一份细胞样品中同时将 DNA 和总 RNA 提取出来, 而要对调控水平做出正确的评价又必须对同一份细胞样品进行分析. 我们参照并改进了 Karlinsey 等^[3]人建立的方法,

建立了从少量转染细胞中同时提取细胞基因组 DNA 和细胞浆总 RNA 的方法. 具体实验方法如下:

细胞裂解: 将培养于 28cm² 培养瓶中的 COS-7 细胞 (约 2×10⁶—4×10⁶ 个) 经细胞洗液 (0.1mol/L PBS, 无 Ca²⁺, Mg²⁺, pH 7.2) 洗涤一次后, 用胰蛋白酶消化下来, 1000g 离心 10min, 细胞泥溶于 1ml 细胞洗液中, 然后转入 1.5ml 的 Eppendorf 管中, 1000g 离心 10min, 弃上清. 加入 100μl 细胞裂解缓冲液 (5mol/L 异硫氰酸胍, 10mmol/L EDTA; 50mol/L Tris, pH 7.5, 8% 2-巯基乙醇), 于

*国家自然科学基金 (青年) 39100065 号资助.

收稿日期: 1993-03-01, 修回日期: 1993-06-13

旋振器上充分旋振直到细胞被完全裂解。

DNA-RNA 分相: 在上述 Eppendorf 管中加 7 倍体积 (700 μ l) 的 4mol/L LiCl, 将样品置于 4 C 2h. 以 11 000g, 15min 4 C 离心, 将上清慢慢地吸出, 并用无菌蒸馏水将上清稀释 4 倍 (使 LiCl 终浓度为 1mol/L), 用于细胞基因组 DNA 的纯化; 而沉淀下来的细胞泥用于提取总 RNA.

基因组 DNA 的纯化: 经稀释的上清液用 0.1mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 饱和酚抽提 2 次, 氯仿-异戊醇抽提 2 次, 然后用 2.5 倍体积的乙醇沉淀 DNA, 沉淀用 70%乙醇洗一次, 真空抽干后, 溶于 30 μ l TE 缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl 和 1mmol/L EDTA, pH 8.0) 中, 4 C 保存备用.

总 RNA 的纯化: 含有 RNA 的细胞泥用 3mol/L LiCl 吹打开, 以 11 000g, 15min 4 C 于 Eppendorf 管中离心, 吸去上清, 经洗涤的细胞泥重悬于 100 μ l RNA 溶解缓冲液 (10mmol/L Tris, pH 7.5, 1mmol/L EDTA, 0.1% SDS) 中, 在液氮中快速冷冻之后, 一边使之融化, 一边在旋振器上振摇, 溶解的含 RNA 溶液用等体积的酚抽提 2 次, 然后用氯仿-异戊醇抽提 2 次, 于样品液中加入 3mol/L NaAc 使 Na⁺ 的终浓度为 0.3mol/L, 用 2.5 倍体积乙醇沉淀 RNA, 然后用 70%乙醇洗涤一次, 吹干后, 溶解于 30 μ l DEPC (焦碳酸二乙酯) 处理的水中.

DNA 和 RNA 完整性的确定: 用 0.6% 琼脂糖凝胶电泳确定基因组 DNA 的完整性; 用 1% 琼脂糖凝胶电泳确定 RNA 的完整性. 采用 0.5 \times TBE 作为电泳缓冲液.

DNA 和 RNA 的产量: 按 1 A₂₆₀ DNA = 50 μ g, 1 A₂₆₀ RNA = 40 μ g 计算, 我们从 2 \times 10⁶—4 \times 10⁶ 个 COS-7 细胞中提取到 30 μ g 以上的 DNA 和 40 μ g 以上的总 RNA. 这些 DNA 和 RNA 足以进行 2 次 DNA 印迹和 2 次 RNA 印迹分析.

基因组 DNA 的完整性: 电泳结果表明, 本法制备的 DNA 在电泳图谱上位于 λ -DNA/

Hind III 酶切的 23kb 片段之后, 无拖带降解, 说明所纯化的基因组 DNA 没有发生断裂 (图 1).

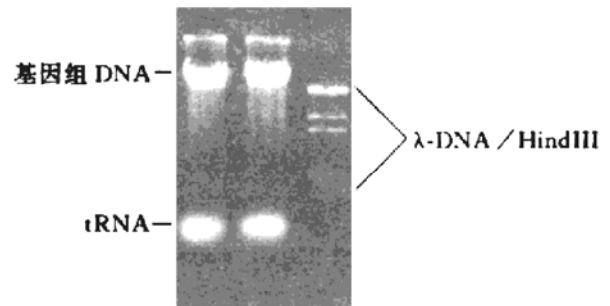


图 1 基因组 DNA 完整性的鉴定

RNA 的完整性: 非变性琼脂糖凝胶电泳结果可见到 28S 和 18S 的核糖体 RNA, 其附近的 mRNA 呈不均匀分布 (图 2), 从电泳图谱来看提取的总 RNA 没有发生降解.

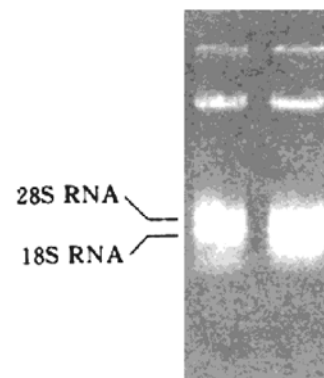


图 2 总 RNA 完整性的鉴定

本方法的特点: 与常规方法相比, 本法快速, 可在一天内完成; 简单易行, 无需超速离心; 经济可靠, 无需价格昂贵的氯化铯、蛋白酶 K 和 RNasin 等试剂, 且制备的 DNA 和 RNA 质量高, 可满足对 DNA 和 RNA 各种分析的要求, 尤其适合于应用在哺乳动物细胞基因表达与调控的研究中.

参 考 文 献

1 Chomczynski P, Sacchi N. Anal Biochem. 1987; 162: 156
2 Chirgwin J M, Przybyla A E, MacDonald R J et al. Biochemistry, 1979; 18: 5294
3 Karlinsey J, Stamatoyannopoulos G, Enver T. Anal Biochem, 1989; 180: 303

food industry.

Key words superoxide dismutase, chemical modification, enzyme engineering, cosmetics

Phase-Resolved Photoacoustic Spectroscopy and Photoacoustic Phase Spectrum of the Intact Leaf.

Du Hao, Fang Jianwen, Zheng Jinju. (*Dept. of Phys., Zhejiang Normal University, Jinhua 321004*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (2): 158

The phase-resolved photoacoustic spectroscopy has been used to analyse the pigmental distribution in intact plant leaves and has been compared with the photoacoustic phase spectrum of the leaves. The inverse correlation between the photoacoustic phase spectrum and absorption bands of chloroplasts has been observed. The characteristic valley exists in the photoacoustic phase spectrum of the leaf cuticle. In addition, there are some differences in the photoacoustic phase spectra obtained at different modulation frequency. The phenomena show that photoacoustic phase spectra can also be used for the nondestructive depth-profile analyses of biological sample as good as photoacoustic spectroscopy.

Key words phase-resolved photoacoustic spectroscopy, photoacoustic phase spectrum, phase-resolved method, intact plant leaf, depth-profile analysis

A New HPLC Separation for PTC Derivatives of Amino Acids by Ethanol Elution.

Zhu Shudong, Zhao Huiren, Zhao Shenghao. (*Department of Biochemistry, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (2): 162

Analysis of phenylthiocarbonyl (PTC) amino acids with ethanol as organic eluent is described. Compared with acetonitrile elution

system, ethanol is less toxic, easier to obtain and much cheaper. Under optimized chromatographic conditions, the resolution, sensitivity and accuracy are excellent.

Key words ethanol, PTC amino acid, HPLC

Simultaneous and rapid purification of total cytoplasmic RNA and genomic DNA from small numbers of transfected mammalian cells.

Zhang Hongquan, Wang Huixin, Zhou Tingchong, Wang Yunling. (*Inst. Bas. Med. Sci, Acad. Mil. Med. Sci. Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (2): 165

A protocol by using 4 mol/L LiCl phasing the DNA and RNA could lead to simultaneous and rapid purification of total cytoplasmic RNA and genomic DNA from small numbers of transfected mammalian cells. Comparing with other methods, this protocol shows rapid, easy and economic, and can be used in many aspects especially in the studies of mammalian cell gene expression and regulation.

Key words total cytoplasmic RNA, genomic DNA, gene expression and regulation

The Method of PCR Direct Sequencing and It's Application in Cancer Research.

Li Huachuan, Lu Shixin. (*Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (2): 167

PCR direct sequencing is a method which combined PCR amplification with nucleic acid sequencing technique. According to this technique, direct sequencing DNA strand of PCR amplification using PCR primer, α -³⁵S dATP and Taq DNA polymerase. The experiment showed that it is simple, rapid and stable. This method was used to analyze the tumor