文章编号:1000-5404(2009)24-2495-03

技术方法

一种富含多糖的关节软骨组织总RNA提取方法初探

刘玉刚,胡 旭,付建军,张 莹,廖通权,周 跃,初同伟 (第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400037)

摘 要:目的 探索一种适合富含蛋白多糖的关节软骨组织总RNA提取方法。**方法** 用一步法、Trizol法、plant RNAout法和一步法结合plant RNAout法4种方法提取了兔膝关节软骨组织的总RNA,对各种方法进行比较分析,并以获得总RNA为模板,用RT-PCR的方法对Ⅱ型胶原蛋白进行了扩增。**结果** 一步法、Trizol法、plant RNAout法获得的总RNA均含有蛋白多糖污染或DNA污染,不能满足实验需要,用一步法结合plant RNAout法提取的总RNA纯度高、完整性和稳定性好,成功逆转录合成双链cDNA。**结论** 一步法结合plant RNAout法适合关节软骨组织小量、高质量的总RNA的提取。

提取高质量的总RNA合成cDNA是进行基因表达研究的基础。关节软骨组织细胞含量少,细胞的比例约占10%,软骨基质含有大量的蛋白多糖,而多糖的许多理化性质与RNA很相似,在沉淀RNA时,产生富含多糖的凝胶状沉淀[1]。这种含有多糖的RNA沉淀难溶于水,或溶解后产生黏稠状的溶液,在去除多糖的同时RNA也容易被带走,造成RNA得率的减少,因此从关节软骨中提取高质量的RNA有相当的难度[2]。现有的用于提取动物组织细胞总RNA的方法,如一步法、Trizol法等,都是基于酸酚/胍原理基础上的,因其对多糖和RNA分离效果差,不适合提取含蛋白多糖丰富的软骨组织总RNA。为后续研究关节软骨损伤后的差异表达基因的需要,本实验在参照现有总RNA提取方法的基础上,成功提取出了高质量关节软骨组织总RNA,以此继续进行RT-PCR合成了双链cDNA,解决了关节软骨组织总RNA提取的难题,为后续关节软骨基因表达的研究提供了条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织来源 实验用材料为新西兰白兔膝关节软骨损伤后修复组织。4周龄新西兰白兔由本院实验动物中心提供,雌雄不限,体质量(0.5±0.1)kg。通过开放手术用电钻在双侧膝关节股骨关节面造成直径3 mm、深3 mm的损伤模型,损伤后4周处死动物,取损伤部位修复组织及周围2 mm范围软骨组织及软骨下骨组织,立即放入液氮中冷冻保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 变性液(6 mol/L异硫氰酸胍,37.5 mmol/L柠檬酸三钠,0.75%十二烷基肌氨酸钠),β-巯基乙醇,氯仿:异戊醇(49:1)混合液,2 mol/L醋酸钠50 ml(pH 4.0),酸性水饱和酚(pH 4.5,上海生物工程公司),DNA Marker DL 1 000(大连宝生物公司),Trizol(大连宝生物公司),plant RNAout(绵阳天泽基因公司),SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit(Clontech, USA),PrimeScript™ RT reagent Kit(大连宝生物公司)。AJ-30I型低温超速离心机(Beckman, USA),Chemilmager 5500型凝胶成像仪(Alpha Innotech, USA),PTC-200型梯度PCR仪(Bio-Rad, USA),DU-800型核酸/蛋白检测仪(Beckman, USA)。

1.2 实验方法

1.2.1 软骨组织总RNA提取

1.2.1.1 一步法 组织称量后,按每50毫克加变性液1 ml,7 μl β-巯基乙醇,玻璃匀浆器于冰水浴中匀浆,直至无明显组织块为止。室温静止5 min,将匀浆液分装入无RNase 1.5 ml离心管,每管0.5 ml,每管加500 μl酸性水饱和酚、50 μl 2 mol/L醋酸钠、100 μl氯仿:异戊醇混合液,用力摇匀,置于冰水浴上15 min,于4 ℃,12 000×g,离心10 min。取上清加入无RNase 1.5 ml离心管,每管加500 μl氯仿:异戊醇(49:1)混合液,用力摇匀,于4 ℃,12 000×g,离心5 min。取上清加入无RNase 1.5 ml离心管,每管加等体积异丙醇,用力摇匀,置于-20 ℃沉淀15 min,于4 ℃,12 000×g,离心15 min。吸弃上清,每管加入75%乙醇1 ml漂洗管壁及RNA沉淀,于4 ℃,12 000×g,离心5 min。吸弃上清,室温放置10 min使乙醇挥发干净,加无RNase水溶解RNA沉淀,置冰水浴上备用。

1.2.1.2 Trizol法 参见Trizol试济使用说明书。

1.2.1.3 plant RNAout法 参见plant RNAout使用说明书。

1.2.1.4 一步法结合plant RNAout法 用一步法提取总RNA参见1.2.1.1。在加入异丙醇后,-20 ℃沉淀30 min,于4 ℃,12 000×g,离心15 min,吸弃上清后,加入20 μl无RNA酶水,振荡溶解沉淀,将凝胶状溶液合并于1个无RNase 1.5 ml

基金项目:国家自然科学基金(30672120);重庆市自然科学基金(CSTC2006BB5355)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672120) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2006BB5355)

作者简介:刘玉刚,男,吉林省榆树市人,博士研究生,主治医师,主要从事脊柱关节损伤的修复方面的研究。E-mail: bear219@126.com
通信作者:初同伟,电话:(023)68774080,E-mail: Chtw@sina.com

收稿日期:2009-08-20;修回日期:2009-10-20

离心管。之后按照 RNase 说明书操作。

1.3 RNA 样品纯度、浓度及完整性检测

取少许 RNA 样品稀释,加入微量石英比色杯中,用 DU-800 型紫外分光光度计测定 RNA 样品的核酸的光密度值 $D(260)$、蛋白质的光密值 $D(280)$、背景杂质的光密值 $D(320)$ 和 $D(260)/D(280)$ 值(以无 RNase 水为空白液调零),每样品重复 3 次,取其平均值。用甲醛变性 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测样品 RNA 的完整性。

1.4 cDNA 合成与Ⅱ型胶原 RT-PCR 扩增

按照 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ RT reagent Kit 说明书进行。以合成的单链 cDNA 为模板,选择 β-actin 作为内参照,对Ⅱ型胶原蛋白进行 PCR 扩增。Ⅱ型胶原蛋白上游引物 5′-GCCACGCTCAAGTCCCTCAACAAC-3′;下游引物 5′-ACAGCAGGCGCAGGAAGGTCATCT-3′,片段长度为 276 bp。β-actin 上游引物 5′-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3′;下游引物 5′-CTTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3′,片段长度为 540 bp。按以下条件进行 PCR 扩增:94 ℃预变性 1 min,94 ℃预变性 30 s,58 ℃复性 30 s,72 ℃延伸 1 min,扩增 30 个循环,72 ℃延伸5 min,4 ℃保存。

2 结果

2.1 关节软骨组织总 RNA 的 4 种提取方法的比较

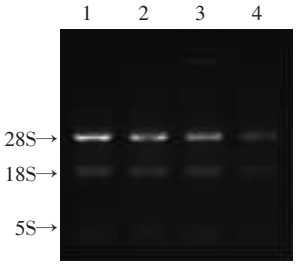
2.1.1 总 RNA 纯度、浓度及完整性检测 4 种方法提取的总 RNA 经过紫外分光光度计检测,准确计算 RNA 的产率和纯度,光密度值和产量见表 1。

表 1 关节软骨组织总 RNA 不同提取方法紫外分光光度计检测结果比较

总 RNA 提取方法	$D(260)$	$D(280)$	$D(320)$	$D(260)/D(280)$	RNA 产率 (μg/g)
plant RNAout	0.524 5	0.277 1	0.013 8	1.892 9	150
Trizol 法	0.731 1	0.444 1	0.125 7	1.646 3	60
一步法	0.526 4	0.311 9	0.003 8	1.687 7	64
一步法 + plant RNAout	0.631 9	0.314 6	0.000 7	2.008 5	50

高质量 RNA 溶液的 $D(260)/D(280)$ 值应介于 1.8 ~ 2.0 之间,越接近 2.0,说明 RNA 的纯度越高。表 1 结果中显示用 plant RNAout 法和一步法 + plant RNAout 法提取的总 RNA 的 $D(260)/D(280)$ 值分别为 1.89 和 2.01,说明提取的总 RNA 或核酸(包括总 RNA 和 DNA)的纯度高;一步法和 Trizol 法提取的总 RNA 的 $D(260)/D(280)$ 值分别为 1.65 和 1.69,在异丙醇沉淀 RNA 后形成大量乳白色不溶沉淀,经过振荡溶解后溶液呈乳白色黏稠凝胶样,说明沉淀中含有大量蛋白多糖,其他 2 种方法未见多糖沉淀。从得率看,4 种方法组织量均为 0.3 g, plant RNAout 法得率最高,但尚需要排除是否含有 DNA 污染,一步法 + plant RNAout 法虽然没有多糖沉淀,但经过 2 次提取后总 RNA 损失较多,其他 2 种方法因沉淀不溶故得率都比较低。

2.1.2 总 RNA 的完整性的甲醛变性胶检测 4 种方法所获得的总 RNA 经 EB 染色,1.5% 琼脂糖甲醛变性凝胶电泳(图 1)。结果显示 28S 和 18S 条带清晰整齐,28S∶18S 为 2∶1左右,可见 5S 条带,未见明显的弥散带和明显降解。应用一步法和 Trizol 法提取的总 RNA 点样孔内可见亮带。plant RNAout 法提取的总 RNA 在点样孔附近有荧光亮带,疑为基因组 DNA 污染,因基因组 DNA 分子质量大,电泳时不能跑出点样孔或在邻近点样孔处形成荧光亮带,将样品经过 RNA 酶在 65 ℃消化 1 h 后于 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳,RNA 条带消失,而点样孔附近荧光亮带仍存在;加入 RNA 酶和 DNA 酶消化后,点样孔条带消失,证明点样孔条带为 DNA 污染(图 2)。一步法 + plant RNAout 法未见 DNA 污染。



1:一步法; 2:Trizol 法; 3:plant RNAout 法; 4:一步法结合 plant RNAout 法

图 1 总 RNA 甲醛变性胶电泳结果

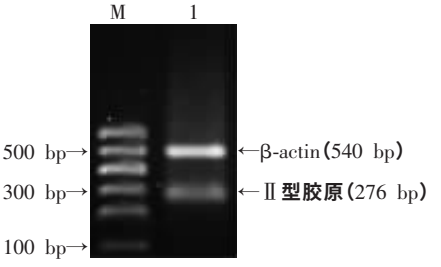


1:加入 RNA 酶消化后; 2:加入 RNA 酶和 DNA 酶联合消化后

图 2 plant RNAout 法提取总 RNA 经酶消化后电泳结果

2.2 Ⅱ型胶原蛋白的 RT-PCR 检测

以一步法结合植物总 RNA 提取方法提取的总 RNA 反转录合成 cDNA。取 5 μl PCR 产物及 5 μl DL1 000,用 1.5% 的琼脂糖凝胶上样电泳,凝胶成像系统分析电泳结果(图 3)。



M: 标准;1: 扩增产物

图 3 Ⅱ型胶原 PCR 扩增产物电泳结果

3　讨论

关节软骨损伤的修复一直是医学界面临的难题之一。如何从关节软骨组织中获取高质量的总 RNA 是进行分子生物学实验的基础,由于关节软骨的结构特点,使从软骨组织中提取高质量总 RNA 非常困难[1]。

目前,对软骨组织提取总 RNA 方法的研究,国内外均有文献报道。Mallein-Gerin 等[3]通过向裂解液中加入蛋白酶 K,使蛋白多糖分解后进行关节软骨总 RNA 提取,后续的提取过程中再除去蛋白酶,获得的总 RNA 能成功进行 RT-PCR。McKenna 等[4]对 Qiagen 公司的总 RNA 提取试剂盒进行优化,用植物 RNA 提取试剂能够有效解决蛋白多糖污染,然后用 DNA 酶在室温进行消化 25 min 来除去 DNA 污染,并用荧光定量 PCR 验证提取的总 RNA 能够满足实验需要。Smale 等[5]引用三氟醋酸铯溶液梯度离心的方法使蛋白多糖与 RNA 分离,逐步沉淀 RNA,也能够成功从软骨组织提取总 RNA。上述方法向裂解液中加入蛋白酶消化或向 RNA 溶液中加入 DNA 消化,无疑都增加了总 RNA 被 RNA 酶污染的机会,并使提取时间延长。尤其在向 RNA 溶液中加入 DNA 酶,不仅在没有 RNA 酶抑制剂存在的情况下,进行 DNA 消化大大增加了 RNA 降解机会,而且引入蛋白污染,必须再进行蛋白抽提去除 DNA 酶,三氟醋酸铯梯度离心使整个提取过程达到 3 h,也增加了 RNA 降解的机会。在 RNA 提取过程中,最重要的问题是避免 RNA 酶的污染和 RNA 的降解,提取时间越长,步骤越多,RNA 降解风险就越大,因此,如何寻求一种快速、简便的关节软骨总 RNA 提取方法至关重要。

动物组织总 RNA 提取方法主要是基于酸酚/胍盐原理,如一步法[6]、Trizol 法等,但基于酸酚/胍盐原理的方法不适于富含多糖的动物组织,因为该种方法不能区分理化性质相似的多聚核糖和蛋白多糖,在进行 RNA 沉淀的时候,蛋白多糖和 RNA 一起沉淀下来,而去除蛋白多糖的步骤也是 RNA 损失的步骤,我们曾试图通过增加酚抽提的次数来改进一步法,但因 RNA 得率低且纯度差,无法满足后续实验需要。从各种方法的电泳结果看,一步法和 Trizol 法提取的总 RNA 不仅纯度差,而且在点样孔均有荧光亮带形成,分析原因为因样品中含有蛋白多糖,蛋白多糖相对分子质量大,不能跑出点样孔。植物中含有大量的多糖,植物总 RNA 提取主要是基于 CTAB 原理的各种提取方法,能成功解决了多糖污染的问题[7,8]。应用植物总 RNA 提取试剂盒提取动物组织总 RNA 从原理上讲是可行的,但尚缺乏有关实验依据。我们应用植物总 RNA 提取试剂盒,成功解决了多糖污染的问题,获得了高纯度的核酸。但从电泳结果看,在点样孔附近有荧光亮带形成,考虑为大分子的基因组 DNA 污染,因为 DNA 相对分子质量大,电泳速度十分缓慢。同时我们通过酶消化实验证实了该荧光条带为 DNA 条带。

综上所述,我们将动物和植物总 RNA 提取方法结合起来,即将一步法和 plant RNAout 法结合起来,有效地综合了 2 种方法的优点,解决了单用 1 种方法出现的多糖污染和 DNA 污染的问题。从本次实验的结果看,此种方法提取的总 RNA,紫外分光光度计测定结果表明核酸纯度高,电泳图片未见点样孔和点样孔附近有荧光亮带形成,总 RNA 完整性好,无明显降解,对软骨组织中的总 RNA 和蛋白多糖的分离效果好。应用该方法提取的总 RNA 进行逆转录并对Ⅱ型胶原蛋白和 β-actin 进行了 PCR 扩增,均获得理想的目的基因片断条带,并说明提取的总 RNA 中无 DNA 污染。通过对现有总 RNA 提取技术方法的改进,我们成功从富含蛋白多糖的关节软骨组织中提取了高质量的总 RNA,从总 RNA 的得率看,完全可以满足后续的实验需要。因此,一步法结合 plant RNAout 法是一种简便、有效、经济的关节软骨少量高、质量总 RNA 的提取方法。

关键词: 关节软骨;RNA 提取;一步法;plant RNAout 法
中图法分类号: R394-33　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] 杜中军, 徐兵强, 黄俊生, 等. 一种改进的富含多糖的芒果组织中完整总 RNA 提取方法[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(2): 202 - 204.
[2] Vincourt J B, Lionneton F, Kratassiouk G, *et al*. Establishment of a reliable method for direct proteome characterization of human articular cartilage[J]. Mol Cell Proteomics, 2006, 5(10): 1984 - 1995.
[3] Mallein-Gerin F, Gouttenoire J. RNA extraction from cartilage[J]. Methods Mol Med, 2004, 100: 101 - 104.
[4] McKenna L A, Gehrsitz A, Soder S, *et al*. Effective isolation of high-quality total RNA from human adult articular cartilage[J]. Anal Biochem, 2000, 286(1): 80 - 85.
[5] Smale G, Sasse J. RNA isolation from cartilage using density gradient centrifugation in cesium trifluoroacetate: an RNA preparation technique effective in the presence of high proteoglycan content[J]. Anal Biochem, 1992,203(2): 352 - 356.
[6] 林　明, 张　页, 张　沙, 等. 从血液中提取总 RNA 的一种快速高效方法[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(6): 786 - 787.
[7] 曾凡锁, 南　楠, 詹亚光. 富含多糖和次生代谢产物的白桦成熟叶中总 RNA 的提取[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(5): 913 - 916.
[8] Wang T, Zhang N, Du L. Isolation of RNA of high quality and yield from Ginkgo biloba leaves[J]. Biotechnol Lett, 2005, 27(9): 629 - 633.

(编辑　吴培红)