DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.09.034

技术方法

文章编号:1000-5404(2003)09-0822-02

一种用 Tripure 试剂从冻存组织分离纯化 RNA 的方法

Isolation and purification of RNA from frozen tissues by Tripure reagent

曹廷兵,彭家和,巩 燕,叶治家,江 渝 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探索一种使提取的冻存组织 RNA 纯度和完整性均较高的方法。方法 在 Tripure 分离试剂说明书基础上,结合异硫氰酸胍等提取 RNA 的方法,对提取组织 RNA 的操作步骤进行调整、改进。结果 用此法提取的冻存组织 RNA,经电泳鉴定及进一步 RT-PCR 检测,显示 RNA 的纯度及模板性较好。结论 用此法提取的冻存组织 RNA 质量稳定可靠。

随着分子生物学技术的迅猛发展及在医学领域中的普及,以 RNA 为研究对象的实验与日俱增。要对 RNA 进行研究,就需要从各种组织或细胞中提取 RNA,提取 RNA 质量如何,将直接关系着后续实验的成败。提取 RNA 的常用方法有异硫氰酸胍一步法[1~3]等。目前,Roche 公司生产的 Tripure 分离试剂也是用于提取组织或细胞 RNA 的常规试剂,这两种方法提取 RNA 总的效果不错,但如果用于组织,特别是冻存组织 RNA 的提取,要想获得高纯度和模板性俱佳的组织 RNA,就需要加以调整和改进。我室在长期进行 RNA 的研究中,摸索出了一套稳定可靠的提取组织 RNA 的方法,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Tripure 分离试剂购自 Roche 公司;M-MLV Reverse Transcriptase 购自 Promega 公司;引物合成和 PCR 试剂盒购自上海 Sangon 公司。

1.2 组织的来源及 RNA 提取

本研究提取 RNA 的组织来自人的肝脏、胎盘、脂肪等组织。把得到的组织置于冰上,剔除无用组织,然后把组织分成若干1~2 g 的小块,液氮中速冻保存(-70 ℃以下也可以)。现以冻存6个月的肝癌组织为例介绍本法提取组织 RNA 的过程。

RNA 提取步骤如下:从液氮中取出肝癌组织 1 块,置于盛有少量液氮的碾钵中,用碾棒把组织块碾磨成细细的粉末状,用药勺盛于 1.5 ml 的离心管中,每管约 100 mg;加入 1 ml Tripure 试剂,涡旋器上高速振荡 2 min,室温放置 10 min;12 000×g,4 ℃离心 10 min;吸取上清于另一离心管中,室温放置 10 min;加入 0.2 ml 氯仿,剧烈混匀20 s,室温放置 10 min;12 000×g,4 ℃离心 15 min;吸取上清于 1.5 ml 离心管中,加入 0.5 ml 异丙醇颠倒混匀 5 次,室温放置 10 min;12 000×g,4 ℃离心 10 min;去上清,沉淀用 1 ml 75%乙醇洗 1 次;10 000×g,4 ℃离心 10 min;75%乙醇再洗 1 次;RNA 沉淀加入 1 ml 无水乙醇洗 1 次;去上清,在无尘环境或超净工作台上平放离心管,待离心管管壁无明显液滴时加入 20 μl DEPC 处理的灭菌双蒸水溶解 RNA 沉淀。

1.3 RNA 定量、纯度测定以及电泳分析

提取的 RNA 在紫外分光光度计上测 A_{260} 值和 A_{260}/A_{280} 比值,确定所提取 RNA 的浓度和纯度。取 3 μg 或 6 μg 总 RNA 按我室常规方法[4]电泳分析 RNA 的质量。

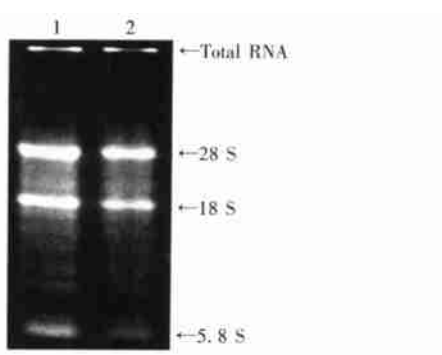
1.4 RNA 的 RT-PCR 分析

取 2 μg 总 RNA 以 Oligo(dT)$_{15}$ 为引物,以 25 μl 反应体积进行逆转录,转录方法按 M-MLV Reverse Transcriptase 说明书进行。取逆转录产物 2 μl 分别以β-actin(长度为 800 bp)和 PPARγ-LBD(长度为 810 bp)的 PCR 引物进行 PCR 扩增,扩增反应体积 50 μl,然后电泳检测 RT-PCR 结果。

2 结果

2.1 提取的冻存组织 RNA 电泳分析

取人肝癌组织总 RNA 6 μg 和 3 μg 按文献[4]进行电泳,可见 28 S、18 S、5.8 S(5 S)3 条清晰的 rRNA 条带,见图 1。



1:6 μg 肝癌组织 RNA;2:3 μg 肝癌组织 RNA

图1 肝癌组织 RNA 电泳结果

2.2 RT-PCR 实验结果电泳分析

取β-actin PCR 产物 4 μl,PPARγ-LBD PCR 产物 8 μl 进行琼

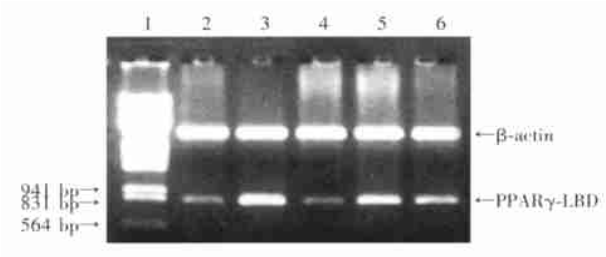
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070358),重庆市科技攻关项目(200126)

作者简介:曹廷兵(1968-),男,重庆市璧山县人,实验师,主要从事真核基因表达调控方面的研究。电话:(023)68752261

收稿日期:2002-09-05;修回日期:2003-01-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

脂糖凝胶电泳。由于β-actin 和 PPARγ-LBD PCR 片段大小相近(800 bp 左右),因此,电泳时 DNA 标准和 PPARγ-LBD 片段按正常电泳 40 min,再上样β-actin PCR 产物,相同条件电泳 40 min,紫外灯下观察电泳结果,见图 2。



1: λDNA/*Eco*RⅠ＋*Hind*Ⅲ双切; 2～6: 为正常、肝癌、肝硬化、胆道淤集肝组织以及脂肪组织 RNA 的β-actin 和 PPARγ-LBD 基因的 RT-PCR 产物

图 2　不同组织 **RNA** 的 **RT-PCR** 电泳结果

3　讨论

RNA 作为分子生物学的主要研究对象之一,它极易受到 RNase 的水解,在提取冻存组织 RNA 时为了避免内源性和外源性 RNase 对 RNA 的降解,本研究在提取 RNA 的过程主要进行了以下一些改进:①为了避免解冻时内源性组织 RNase 释放造成 RNA 的降解,取得组织后立即在冰上把需要的组织切成 1～2 g 左右小块,迅冻存于－70 ℃以下,这样每次提取 RNA 时就不必对组织块解冻分割。②为了避免把组织块解冻切成小块才能用匀浆器来破碎细胞,我们把冻存的组织块直接置于含有少量液氮的碾钵中碾成细细的粉末,然后加入 Tripure 试剂,涡旋器上高速振荡,便可达到破碎细胞释放出 RNA 的目的;这样提取 RNA 的组织总是处于低温或 Tripure 试剂的保护之中。③提取得到 RNA 沉淀以后,应特别小心防止外源性 RNase 污染,因为此时已无 Tripure 试剂中 RNase 抑制剂的保护,因此用 75%的乙醇洗完后,再用无水乙醇洗 1 次,可以大大缩短 RNA 沉淀晾干的时间,可避免 RNA 在空气中暴露时间过长而增加外源 RNase 对 RNA 的降解。

分离纯化的 RNA 质量如何、是否被降解通常采用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳方法来鉴定,以及进一步的 RT-PCR 来分析 RNA 作为逆转录模板的完整性。在提取的真核细胞总 RNA 中核糖体 RNA(rRNA)占总 RNA 的 90%以上,它们主要由 28 S、18 S、5.8 S(5 S)组成,这 3 类 rRNA 的摩尔浓度大致相等,但他们的分子质量相差较大,在紫外灯下的亮度依次为 28 S＞18 S＞5.8 S(5 S)。在电泳后能观察到 28 S、18 S、5.8 S(5 S),特别是 28 S 清晰的带型,通常认为所提取的 RNA 未被降解,可以用提取的 RNA 进行后续实验。进一步 RT-PCR 分析 RNA 模板的完整性时我们以β-actin 作为标准参照,检测不同组织或同种组织不同疾病时某一基因的 mRNADH 丰度,以此便可确定 RNA 模板性的优劣。实验结果表明,用此方法分离纯化的冻存组织 RNA 质量稳定可靠。

关键词: RNA; RT-PCR; Tripure 试剂
中图法分类号: R394-33　　文献标识码: B

参考文献:

[1] F 奥斯伯, R E 金斯顿, J G 塞得曼, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林 译. 北京: 科学出版社, 2001. 123－126.
[2] 卢圣栋, 马清钧, 刘德培, 等. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 139－144.
[3] J 萨姆布鲁克, E 弗里奇, T 曼尼蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 366－369.
[4] 曹廷兵, 叶治家, 巩　燕, 等. 一种快速鉴定 RNA 质量的方法[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(8): 992－993.

(编辑　郭建秀)

文章编号: 1000-5404(2003)09-0823-02

技术方法

术中颅脑 B 超辅助下的显微手术

Intraoperative ultrasound-guided microneurosurgical operation

吴　南, 冯　华, 王宪荣, 朱　刚, 高伯元　(第三军医大学附属西南医院神经外科, 重庆 400038)

提　要: 目的　总结术中颅脑 B 超在显微神经外科手术中的初步应用经验。方法　开颅后在硬脑膜外或硬脑膜下,使用 ALOKA 型 B 超,结合术前的影像学资料,进行病变定位,选择手术路径后,在显微镜下切除病变,并用 B 超判断切除程度。结果　30 例病变中,29 例定位准确。其中 25 例全切除,4 例次全切除,术后 2 例症状加重,其余病人神经功能保留良好。讨论　术中颅脑 B 超可以实时显示病变的部位与轮廓,有助于病变的切除和减少手术副损伤。

作者简介: 吴　南(1971－),男,河南省新乡县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事功能神经外科方面的研究,发表论文 7 篇。电话: (023)68754000-73071
收稿日期: 2002-03-21; 修回日期: 2002-05-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net