DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.058

技术方法

文章编号:1000-5404(2002)08-0992-02

一种快速鉴定RNA质量的方法

A simple method for identifying the guality of total RNA

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

提 要:目的 建立一种快速鉴定RNA完整性的方法。方法 在常规琼脂糖凝胶电泳的基础上,结合甲醛变性琼脂糖凝胶电泳加以改进而成。结果 提取的总RNA用此方法电泳后可得到28S、18S、5.8S(5S)三条清晰的rRNA条带。结论 此方法可以达到对RNA完整性进行快速鉴定的目的。

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。RNA质量的好坏直接关系到后续实验的成败。Northern印迹杂交分析、寡聚(Oligdt)纤维素选择分离mRNA、cDNA合成及体外翻译等实验的成败,在很大程度上取决于RNA的质量。因此在进行这些实验之前对RNA的质量进行快速可靠的鉴定就十分必要。目前RNA的质量采用变性琼脂糖凝胶电泳方法来鉴定[1],这些方法步骤繁琐、费时、费力。我室在长期进行RNA的研究中,摸索出了一套稳定、快速和可靠的鉴定RNA质量的方法,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

提取RNA的TriPure Isolation Reagent试剂盒、DEPC等购自B.M公司,常规试剂如琼脂糖等为进口或国产AR级以上。

1.2 RNA的提取

以人胎盘组织提取总RNA,方法按TriPure Isolation Reagent试剂盒说明书进行。对提取的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。

1.3 RNA的琼脂糖凝胶电泳

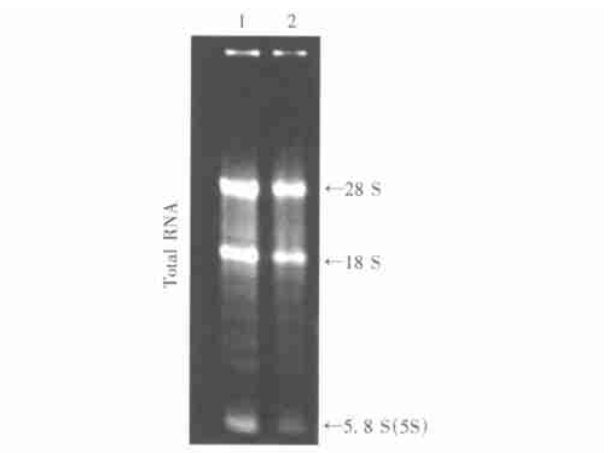
电泳方法、步骤大体同文献[2]中的琼脂糖凝胶电泳。为最大限度降低RNA在电泳时被降解,结合甲醛变性琼脂凝胶电泳分离RNA方法[1],在常规琼脂糖凝胶电泳的基础上进行如下改进。①电泳RNA所用器械如制胶的模具、梳子、电泳槽等用肥皂粉洗干净后用双蒸水冲洗二遍后在室温晾干备用。②用新的1XTBE配制1.2%琼脂糖凝胶,倒胶时溴化乙锭(EB)直接加入凝胶中。③制备好的琼脂糖凝胶板放入电泳槽后再加入经高压灭菌过的1XTBE,液面只能刚好同胶面平齐,缓冲液不要淹过胶面。④点样时,样品RNA每10μl加入2μl上样缓冲液,上样缓冲液是用DEPC处理的水配制的50%甘油,另外单独点一样品孔含有3μl溴酚蓝的上样缓冲液作为电泳指示剂,电泳电压4 V/cm,电泳时间2 h左右便可取出凝胶在紫外灯下观看所提取的RNA的质量或进行拍照记录。

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:2001-04-05;修回日期:2002-01-25

2 结果

取人胎盘组织RNA 3μg和6μg,按本方法以1.2%的琼脂糖凝胶进行电泳,可见28S、18S、5.8S(5S)三条清晰的rRNA条带。电泳结果见图1。



1:6μg胎盘组织RNA;2:3μg胎盘组织RNA

图1 RNA电泳结果

3 讨论

RNA作为分子生物学的主要研究对象之一,但它极易受到RNase的水解,在进行RNA操作时主要是避免外源RNase的污染,特别是在得到RNA沉淀以后,无RNase抑制剂存在的条件下尤其如此。因此,在RNA操作过程中必须对所有实验材料进行彻底的处理,灭活RNase,如EP管、Tip头等;另外,有一个良好的操作环境也是非常的重要。

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。此电泳的主要目的之一是为了Northern blot之用。但在RNA的其他用途中,如cDNA合成和寡聚(OligdT)纤维素选择分离mRNA等实验中要对RNA进行质量鉴定,此方法就现得繁琐、费时、费力,而用常规琼脂糖凝胶电泳RNA会水解而达不到鉴定的目的。如果用本研究改进的1.2%琼脂

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

糖凝胶方法电泳鉴定，简单、高效、经济实用，并且能达到同用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳相同的实验结果。因此本方法在常规琼脂糖凝胶电泳的基础上所作的每一项改进均是为了避免 RNA 在电泳过程中被水解，比如对所有电泳器具彻底的清洗处理就是为了尽量清除器具上存在的 RNase；在 RNA 样品中加入用 DEPC 水配制的 50%甘油作为上样缓冲液，目的也是为了在 RNA 样品中避免加入其他试剂时造成 RNase 的污染。

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，28S（约 4.5 kb）、18S（约 2.1 kb）、5.8 S（5 S）这三类 rRNA 的摩尔浓度大致相等，但他们的分子量相差较大，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。我们实验室还提取过多种组织 RNA 如外周血淋巴细胞培养后的 RNA、脂肪组织 RNA、肝脏 RNA 等，经此方法鉴定的 RNA 的质量同分子克隆手册等参考书用变性琼脂糖凝胶鉴定的 RNA 完全无异，结果稳定可靠。

关键词：RNA；电泳；质量鉴定
中图法分类号：R394－33 文献标识码：B

参考文献

[1] J. 萨姆布鲁克，E. 弗里奇，T. 曼尼蒂斯 著. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，1992.366－369.
[2] 卢圣栋，马清钧，刘德培，等 著. 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，1999.88－90.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2002)08-0993-02

技术方法

反相高效液相色谱法测定小鼠血浆和组织中阿昔洛韦浓度

An improved RP-HPLC method for the determination of acyclovir concentration in plasma and tissues of mice

项贵明，汤建林，周世文，徐 颖，黄永平 （第三军医大学附属新桥医院临床药理基地，重庆 400037）

提 要：目的 改良 HPLC 用于测定小鼠血浆和组织中阿昔洛韦浓度。方法 使用 Beckman Gold 系列高效液相色谱仪，ODS 柱，流动相为甲醇-水（5∶95，V/V），流速 1.0 ml/min，检测波长 254 nm，样品采用 12%三氯醋酸去蛋白。结果 血浆和组织中阿昔洛韦浓度在 0.05±20 mg/L 范围内与峰面积呈良好线性关系，最低检测浓度分别为 0.02，0.05 mg/L，天内及天间精密度均小于 6%。结论 该方法灵敏、精确，可供药代动力学研究使用。

阿昔洛韦（Acyclovir，ACV）为核苷类抗病毒药，已成为治疗单纯疱疹和带状疱疹病毒感染尤其是重症感染的首选药。后经临床试验证实其对慢性乙肝也有治疗效果。其血中药物浓度的测定虽已有 HPLC 方法报道[1,2]，但不理想且无法用于测定靶器官中的药物浓度。为此，对 ACV 的 HPLC 检测条件进行了较为系统的研究，改进后的方法用于测定血浆、肝、脾、肾组织中 ACV 浓度，获得了较好的结果。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

阿昔洛韦（纯度 99.5%，上海第六制药厂），甲醇、三氯醋酸（国产分析纯），水为一级纯（电阻率＞ 15 MΩ/cm）

1.2 样品制备

昆明株小鼠，体重（30±2）g，雌雄各半，眼眶取血后断头处死。收集肝、肾、脾等组织，取血浆 0.2 ml 和组织匀浆 0.2 g 于离心管中，加 12%三氯醋酸 0.4 ml，旋涡振荡 60 s，12 000 r/min 离心 5 min，吸取 20 μl 上清液进样。

1.3 色谱条件

Beckman Gold 系列高效液相色谱仪（美国 Beckman 公司），ODS 柱，流动相为甲醇-水（体积比 5∶95），流速 1.0 ml/min，检测波长 254 nm，柱温为室温。

2 结果

2.1 色谱图

按本方法测得的色谱图见图 1。在所检测的小鼠血浆及肝组织中，ACV 与杂质峰完全分离。

2.2 ACV 出峰时间的确认

小鼠尾静脉注射 ACV5 mg/kg 后 10 min 的血浆及组织匀浆中加入一定量的 ACV 标准液后测得的色谱峰与相应的空白对照品完全重叠，且前者峰较高，不同组织中 ACV 的出峰时间基本一致（tR＝7.50 min），证明所分离的化合物为 ACV。

作者简介：项贵明（1974－），男，湖北省武穴市人，硕士，主治医师，主要从事肝靶向药物的研究。电话：（023）68755114-74890

收稿日期：2000-11-15；修回日期：2001-03-25

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