DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.01.027

性能很可能在阻碍表皮的水分蒸发,导致角质层在水储留过程中起到重要作用。但在 CRSS防治瘢痕的作用机制中,硅油究竟有何作用,尚待进一步研究。

3.3 关于毒副作用

医用硅凝胶制品无毒,无刺激性,无抗原性,无致癌及致畸性。本研究的临床应用观察表明瘢痕贴在使用过程中,除部分患者在开始使用时有瘙痒现象外,尚未发现其它不良反应及不适,使用安全可靠。

关键词 瘢痕贴;增生性瘢痕

中图法分类号 R619.6

参考文献

1 Sawada Y. A method of recording and objective assessment of hypertrophic burn scars. Burns, 1994, 20(1): 76

2 Quinn J K. Silicone gel in scar treatment. Burns, 1987, 13(10): 513

3 Davey R B, Wallia K A, Boweing K. Adhesive contract madiaan update on graft fixating and burn scar management. Burns, 1991, 17(4): 313

4 Hosoda G, Holloway A G, Heimbach D W. Laser Doppler flowmetry for the early detection of hypertropyic burn scar. J Burn Csre Rehabil, 1986, 7(6): 496

5 Helal B, Chapman R, Sllis M, *et al*. The use of siliconeoil for mobilisation of the hand. J of Bone and Joint surg, 1982, 64(1): 67

6 Sawada Y, Ara M, Yotsuyanagi T. Treament of dermal depth burn wound with an antimicrobial agent-releasing silicone gel sheet. Burns, 1990, 16(5): 347

7 吕 林.硅油在视网膜脱离复位术中的用.国外医学:眼科学分册, 1991, 15(5): 273

(收稿: 1998-03-30;修回: 1998-09-10)

(编辑 张大春)

改进 SDS-Phenol法快速提取细胞总 RNA*

Preparation of cellular total RNA by improved SDS-phenol method

吴丽娟** (第三军医大学附属大坪医院检验科) 重庆, 400042

黎 燕 胡美茹 沈倍奋 (军事医学科学院基础医学研究所分子免疫室) 北京, 100850

提 要 目的:比较改进 SDS-Phenol法与常用的 AGPC法提取细胞之总 RNA优缺点。方法:同时采用两种方法对同批稳定培养的一株淋巴瘤细胞系进行总 RNA提取,以收获 RNA的产量和纯度为比较指标,并用甲醛变性电泳验证 SDS-Phenol法提取 RNA的完整性。结果:改进 SDS-Phenol法可从 1× 10^6细胞中提取(1.93± 0.20)μg的总 RNA,是 AGPC法的两倍以上。细胞数在 1× 10^5~ 100× 10^5范围内时其 RNA产量与细胞数量呈线性相关。5× 10^5以上细胞所提取的 RNA, $A_{260/280}$在 1.78~ 1.83之间,无蛋白质,纯度平均在 90%以上,甲醛变性电泳示 RNA完整无降解。5× 10^6细胞可收获 RNA(55.34± 3.02)μg,变异系数 5.45%。结论:改进 SDS-Phenol法优于 AGPC法,有快速、简便和高效的特点,值得推广应用。

RNA提取技术是分子生物学技术的重要基础,也是现代临床医学科研技术的重要组成部分。临床科研的各种 cDNA文库构建、RNA序列分析、Norhtern印迹及 RT-PCR等均需要一定纯度和完整的 RNA。目前,最常使用的 RNA提取方法当推 1987年 Chomczynski等[1]提出的"硫氰酸胍-酚-氯仿抽提法"(简称"一步法"或 AGPC法),其优点是收获的非降解 RNA产量大、纯度高,不需超速离心或多步酚——氯仿抽提。这里,我们将推荐一种改进十二烷基硫酸钠-酸性酚法(简称改进 SDS-Phenol法),经我们验证该法较 AGPC法更为优越。

1 材料与方法

1.1 细胞系及其培养

人 Burkitt淋巴瘤细胞系 Raji由英国帝国肿瘤基金会惠赠。细胞悬浮在含 10%灭活小牛血清(FCS)的 RPIM-1640培养体系中,37℃ 5% CO_2条件下培养,每 2~ 3天换液传代一次。

1.2 AGPC法提取细胞总 RNA

按文献[1]。

1.3 改进 SDS-Phenol法提取细胞总 RNA

参照文献[2]并加以改进。细胞用 PBS或生理盐水洗涤 2次,加入 250μl 10 mmol/L EDTA(pH8.0)/0.5% SDS溶液,

* 本课题受军事医学科学院基础医学研究所分子免疫全军重点实验室资助,并在该室完成

** 吴丽娟,女,32岁,主治医师,硕士

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

250μl 0.1 mmol/L NaAc(pH5.2)/10 mmol/L EDTA(pH8.0)溶液和500μl水饱和酚,在旋涡器上振荡1 min,4℃ 10000 r/min离心10 min转移上清入另一新1.5 ml管,加88μl 1 mol/L Tris-HCl(pH8.0),36μl 5 mol/L NaCl和1 ml预冷无水乙醇,-20℃ 30 min,4℃ 10000 r/min离心10 min,弃上清,将沉淀溶于200μl TE(即10 mmol/L Tris-HCl pH8.0/1 mmol/L EDTA pH8.0)中。加入8μl 5 mmol/L NaCl和1 ml预冷无水乙醇,-20℃ 30 min,4℃ 10000 4/min离心10 min,弃上清,抽干。将RNA溶于50μl TE或合适的溶液中。

1.4 RNA定量及纯度鉴定

将上述RNA产品适当稀释后于RNA/DNA测定仪(Pharmacia产品)上进行测定,记录$A_{260/280}$、蛋白质(g/L)、RNA浓度(μg/ml)和纯度(%)。根据RNA浓度计算实际收获的RNA产量:即 RNA(μg)= RNA浓度(μg/ml)× 稀释倍数 × 0.05

1.5 RNA完整性鉴定(即RNA的甲醛变性电泳)

按文献[3]进行。

2 结果

2.1 灵敏度

改进SDS-Phenol法同AGPC法一样可有效提取1× 10^6细胞之总RNA,改进SDS-Phenol法RNA产量为1.93± 0.20μg,AGPC法为0.67± 0.14μg,改进SDS-Phenol法灵敏度是AGPC法的两倍以上。

2.2 线性范围

在1× 10^5~ 1× 10^7范围内,改进SDS-Phenol法同AGPC法一样,其RNA产量与细胞数量呈线性关系,见图1

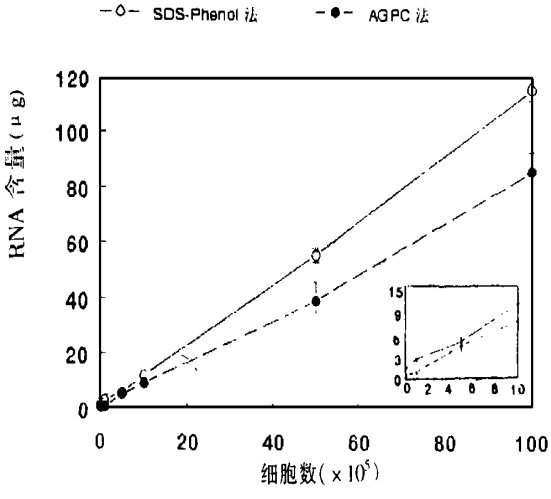


图1 RNA产量曲线

2.2 RNA的纯度鉴定

细胞数在5× 10^5以下时,改进SDS-Phenol法提取的RNA时纯度在70%以上,而AGPC法≤ 70%。细胞数在5× 10^5以上时,改进SDS-Phenol法提取的RNA的纯度平均在90%以上,$A_{260/280}$在1.78~ 1.83之间。而AGPC法细胞数在1× 10^6以上时,其RNA产品的纯度在83%以上,$A_{260/280}$在1.68~ 1.80之间。两种方法细胞数在1× 10^4~ 1× 10^7范围内时,各RNA产品中均无蛋白质存在,见图2

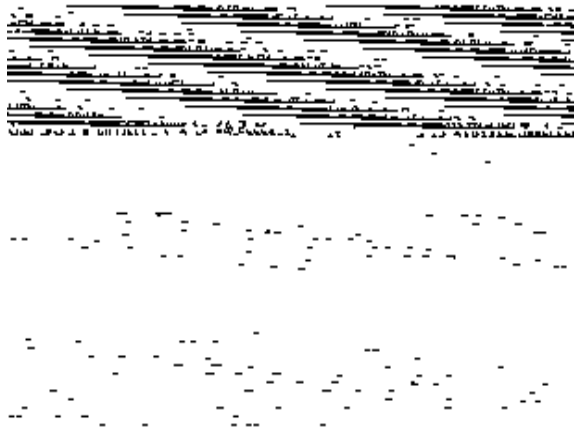


图2 细胞数量与RNA纯度关系

2.4 RNA的完整性鉴定

见图3,通过甲醛变性电泳清晰可见RNA的23S 18S和5S带型,且28S与18S的亮度比为2:1



图3 RNA的甲醛变性电泳结果

2.5 重复性试验

用5× 10^5细胞重复10次提取RNA,改进SDS-Phenol法RNA产量为55.34± 3.02μg,变异系数*CV*为5.45%;AGPC法RNA产量为40.70± 2.06μg,*CV*为5.06%。经*t*检验,改进SDS-Phenol法RNA产量明显高于AGPC法($P < 0.05$)。

3 讨论

完整和均一是评价RNA质量的两个最关键指标。完整的RNA取决于最大限度地避免纯化过程中内源性及外源性的核酸酶对RNA的降解,均一的RNA取决于有效地去除RNA提取物中的DNA、蛋白质、痕量酚等。一般可用$A_{260/280}$值对RNA样品纯度

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

进行估计。$A_{260/280}$值应大于 1.8,说明无 DNA 酚和蛋白质残余;同时,该值应小于 2.0,表明 RNA未发生降解。既混有 DNA 酚、蛋白质残余,又已发生降解的 RNA样品,该值也可在 1.8~2.0之间。因此,有必要进行 RNA的甲醛变性电泳以检测 RNA样品的完整性。

SDS-Phenol法是一种细菌总 RNA制备方法,我室将其适当改进后用于动物细胞总 RNA的快速提取,经我们验证,改进 SDS-Phenol法提取的 RNA样品甲醛变性电泳证实 RNA完整性好,蛋白质测定为阴性,纯度略高于 AGPC法,我们已将该法提取的 RNA成功地用于 RT-PCR 斑点杂交、Northern印迹及 Runoff Assay等 RNA分析技术中。若样品 RNA 纯度要求还高,可增加一次乙醇沉淀操作,收获的 RNA样品 $A_{260/280}$值可达 1.85±0.03(n=19),纯度达 92%±3% (n=19)。同时,改进 SDS-Phenol法 RNA 产量明显高于 AGPC法,特别适用于从少量细胞标本中提取 RNA,如外周血及骨髓新分离的单个核细胞、体液脱落细胞等。改进 SDS-Phenol法也适用于各种细胞培养、大量培养的细菌样品的 RNA提取。总之,该法操作简单,全程只需 2 h,无需超速离心和多次酚-氯仿抽提,是一种快速高效的细胞总 RNA提取方法,值得推荐使用。

关键词 RNA纯化;细胞 RNA
中图法分类号 Q522

参考文献

1 Chomczynski P N. Single-step method of RNA isolated by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987; 162: 156
2 Frederick M A, Roger B, David D M, *et al*. Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. Jhohn wiley & Sons. Inc, 1995. 4~7

(收稿: 1998-03-09;修回: 1998-03-27)
(编辑 汪勤俭)

氨气敏电极终点法测定腺苷脱氨酶活性

Assay of adenosine deaminase activity by end-point method with NH_3 sensitive electrode

阳明福* 李 文 张世德 牟绍洪 (第三军医大学医学检验系分析化学教研室)重庆,400038

提 要 目的:建立血清腺苷脱氨酶传感器分析方法。方法:血清样品与腺苷溶液恒温反应 30 min,三氯乙酸终止反应,调溶液 pH值 9.0,氨气敏电极测定,标准曲线法定量。结果:线性范围 5~100 U/L,日内、日间相对标准偏差(RSD)分别为 2.86%、3.92%,平均回收率 101.7%。结论:方法线性范围宽,准确度高,重现性好,且操作简便,无需较多的酶试剂,可用于临床样品测定。

腺苷脱氨酶(Adenosine deaminase, ADA, EC 3.5.4.4)是一种与机体免疫系统有重要联系的核酸分解代谢酶类,可特异性催化腺苷产生不可逆的脱氨反应[1]。近年来,测定体液中 ADA水平对白血病等多种疾病的诊断与鉴别诊断,治疗和免疫功能障碍研究都有重要意义,已被越来越广泛地应用。现行的测定方法主要有 NH_3比色法[2]、酶偶联分光光度法[3,4]和凝胶电泳法[5]。尚未见过传感器进行测定的研究报道。本文以氨气敏电极为传感器,建立了血清腺苷脱氨酶活性的传感器分析方法,准确、精密,成本低,操作简便,适用于临床样品测定。

1 材料与方法

1.1 原理

$$\text{腺苷} + H_2O \xrightarrow{ADA} \text{肌苷} + NH_4$$

通过调节溶液的 pH值,使 $NH_4 \longrightarrow NH_3$,然后用氨电极测量。$NH_3$的生成量与 ADA活性相关,氨电极的响应值(E)与 NH_3浓度负对数线性相关。故可通过氨气敏电极测定 NH_3浓度而测定 ADA活性。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 PXJ-130离子分析仪(萧山科学仪器厂),pNH3-型氨气敏电极(泰县电分析仪器厂)。

1.2.2 试剂 腺苷、腺苷脱氨酶均为 Sigma产品,KH_2PO_4、

* 阳明福,男,31岁,讲师,硕士

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