胞的分离培养和鉴定.新消化病学杂志, 1995, 3(1): 8
4 王宇明,陈国致,董家鸿,等.分离肝细胞的一种体外灌流法.中华消化杂志, 1994, 14(2): 175
5 Ballardini G, Faccani A, Fanani M, *et al*. Appearance of sinusoidal inclusion-containing endothelial cell in liver disease. Hepatology, 1994, 19: 440
6 朱永红,聂青和,胡大荣.储脂细胞与肝脏循环.国外医学:流行病学传染病分册, 1998, 25(1): 17

(收稿: 1998-07-11;修回: 1999-03-27)
(编辑 冷怀明)

烧伤后小鼠小肠潘氏结 RNA的快速制备

Fast preparation of RNA from Peyer's patches of small intestine in burned mice

刘贤华* 胡川闽 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所)重庆, 400038
白晓东 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆, 400038

提 要 目的: 本实验拟建立一种更经济、实用、简便又快速的 RNA制备方法。方法: 利用改进后的方法及试剂盒提取烧伤后小鼠小肠潘氏结组织中的 RNA,紫外分光光度计测定 D_λ 值、电泳、然后进行 RT-PCR 结果:① 紫外分光光度计测定所提 RNA D_{260}/D_{280}比值均在 2.0左右。每 1 g小鼠小肠潘氏结组织 RNA的平均产量为 300~ 500μg ② RNA甲醛变性琼脂糖凝胶电泳显示所提总 RNA完整性好。③ RT-PCR获得成功。结论: 此快速制备 RNA的方法纯度和产量都较高,而且经济、简便又快速,我们已常规应用到其它组织细胞 RNA的制备中,值得应用与推广。

RNA的提取是分子生物学研究中的基本技术,有关固体组织 RNA的提取已有不少方法,但它们各有优缺点。本文所介绍的是经作者反复实践,现已常规应用的一种改良后的 RNA制备方法。它主要有 4个优点:① 操作简单,流程短,速度快;② 所收获的 RNA产量和纯度都较高,可满足做 RT-PCR和 Northern杂交;③ 所配试剂可较长时间保存,随时可进行 RNA提取;④ 不需使用特殊试剂,很大程度上节约了经费。

1 材料与方法

1.1 试剂及配制

① 变性液 (4 mol/L异硫氰酸胍+ 0.025 mol/L柠檬酸三钠+ 0.017 mol/L Sarkosyl);② 2 mol/L醋酸钠;③ 水饱和酚;④ 49∶1的氯仿∶异戊醇;⑤ 异丙醇;⑥ 75%乙醇 (用 0.1% DEPC水配制);⑦ 1%β-巯基乙醇;⑧ 0.01 mol/L PBS;⑨ 10× MOPS(0.2 mol/L MOPS+ 0.05 mol/L NaAc+ 0.01 mol/L EDTA);⑩ RNA载样缓冲液(0.1% DEPC水配制, 0.05 mol/L EDTA+ 0.25%溴酚蓝+ 0.25%二甲苯青 FF+ 50%甘油);⑪ 1 mg/ml溴化乙锭。

1.2 操作步骤及方法

1.2.1 无菌条件下打开小鼠腹腔,取出小肠潘氏结。0.01 mol/L PBS清洗 2次。

1.2.2 匀浆器内加入 350μl变性液,将潘氏结放入匀浆器中匀浆,尽量使其分散成单个细胞。

1.2.3 将浆液倒入 1.5 ml Eppendorf管中,补足变性液至 500μl,再加β-巯基乙醇 1.6μl,充分混匀。

1.2.4 加水平衡酚 500μl,充分混匀。

1.2.5 加 2 mol/L醋酸钠 50μl,充分混匀,加氯仿∶异戊醇 100μl,充分混匀, 4°C冰浴 5 min。

1.2.6 4°C 13 000 r/min离心 10 min,吸上层水相,加氯仿∶异戊醇 500μl,弹匀, 4°C 13 000 r/min离心 5 min。

1.2.7 吸上层水相,加异丙醇 500μl, -20°C放置 20 min, 4°C 13 000 r/min离心 10 min。

1.2.8 弃上清,加 70%乙醇洗 1次, 13 000 r/min离心 10 min。

1.2.9 弃乙醇,控干水分。

1.2.10 加 0.1% DEPC水 30μl溶解 RNA,取 5μl,加双蒸水至 500μl,紫外分光光度计测定 D_λ 值及含量。

1.2.11 按文献[1]的方法灌制 RNA甲醛变性琼脂糖凝胶,凝固 1 h备用。

1.2.12 取 RNA溶液 5μl(约 15~ 20μg)加 10× MOPS 1μl,甲醛 3.5μl,甲酰胺 10μl, 68°C变性 5 min转至冰浴,加 2μl溴化乙锭溶液(1 mg/ml), 2μl载样缓冲液,混匀后加样至甲醛凝胶中,在装有 1× MOPS缓冲液的电泳槽内, 3~ 4 V/cm电泳约 2 h,透射紫外光下观察 RNA的完整性。

1.2.13 取 RNA 1μl(约 2μg)进行逆转录后做 PCR 1.5%琼脂糖凝胶电泳。

2 结果

经紫外分光光度计测定,其 D_{260}/D_{280}在 2.0± 0.1左右, RNA浓度为 2μg/ml,每 1 g小鼠小肠潘氏结组织 RNA的平

* 刘贤华,女, 27岁,实验师

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

均产量为 300~ 500μg

RNA甲醛变性琼脂为交电泳显示,见图 1,可见 28 S,18 S和 5 S RNA 3条带和介于它们之间呈云雾状的 mRNA,说明所提的 RNA是完整的。 RT-PCR后 PCR产物凝胶电泳结果,见图 2

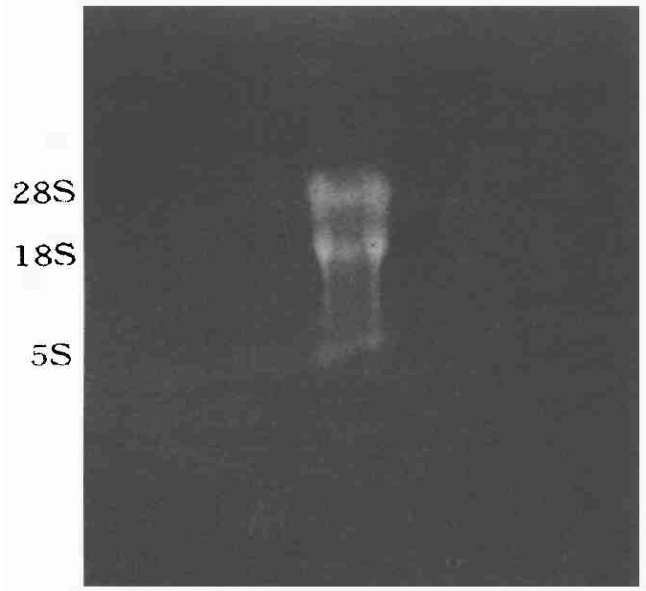


图 1　RNA甲醛变性琼脂糖凝胶电泳

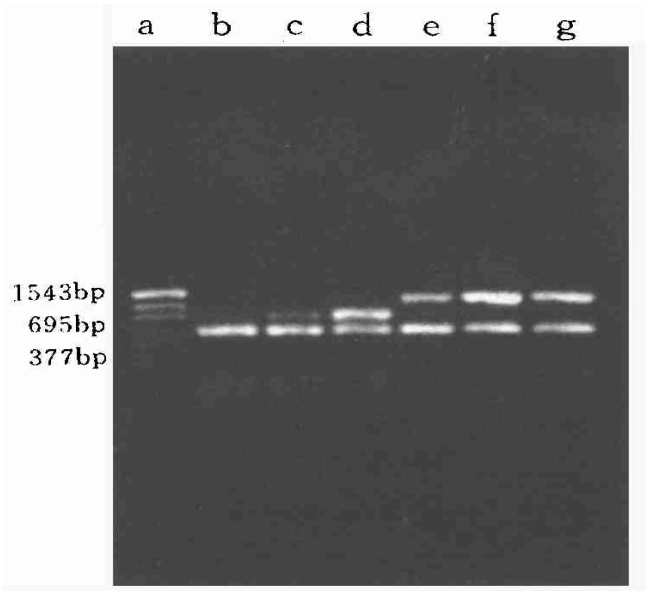


图 2　RT-PCR琼脂糖凝胶电泳

a: PCR marker　b~ d: PCR产物　e~ g: PCR产物

3 讨论

RNA的提取是分子生物学研究中的基本技术,有关固体组织 RNA的提取已有不少方法,但它们各有优缺点。根据文献 [1]有关章节报道,从固体组织中提取 RNA是采用异硫氰酸胍氯化锂离心法来提取的,作者按照此法提取烧伤后小鼠小肠潘氏结中的 RNA,其产量和纯度并不十分理想,可能是由于操作复杂,从中丢失了部分 RNA。另外,它的主要缺点是所需试剂种类多,流程长,一次提取的样品数量有限,给实验带来了诸多不便。现在有许多实验室直接采用进口的 RNA提取试剂盒,很大程度上简化了操作步骤,但所需试剂盒费用太高,不利于实验室长期大量应用。作者在本实验中将烧伤后小鼠小肠潘氏结作为实验标本,结合文献报道[1,2],按照它们的基本原理,综合采用试剂,优化试剂的配制,单纯采用异硫氰酸胍强烈变性的方法来提取了其中的 RNA,结果其产量和纯度都比较理想。紫外分光光度计测定 D_{260}/D_{280}接近 2.0,电泳显示所提 RNA完整性好。此方法所提 RNA还可满足做 RT-PCR。通过实验我们认为用磁珠分离法将所提的 mRNA分离出来后做 Nothern杂交效果也十分理想。

潘氏结是固体组织,且组织块极小,要想收获较多量的 RNA有一定的困难,因此,在提取固体组织 RNA中关键的一步是首先要将组织分离成单个细胞,单个细胞愈多,则收获的 RNA量相对愈多。而本方法正是采用了强烈变性的方法,直接将组织加入变性液内匀浆,其目的在于将染色体 DNA剪切断,使得细胞能尽量多的分散且充分变性而释出 RNA,如果预先直接用 PBS液匀浆,则其效果不如直接用变性液匀浆效果好。

本方法中所配的试剂全部放在 4°C冰箱内保存,其保存时间可长达一年左右,本方法操作简单,流程短,这使得 RNA的提取变得方便且迅速,整个提取过程约需 1.5 h左右即可。而且所提取的 RNA纯度和产量都较理想,无需使用特殊试剂,很大程度上节约了经费,又不受样品数量的限制。另外,本方法应用到其它组织和细胞的 RNA提取中也收到了良好的效果。鉴于以上优点,此方法很有应用与推广价值。

关键词　潘氏结; RNA;快速; RT-PCR;异硫氰酸胍
中图法分类号　Q78-33

参考文献

1 [美]萨姆布鲁克, E. F.弗里奇, T.曼尼阿蒂斯.分子克隆实验指南.北京:科学出版社, 1996. 343~ 388
2 卢圣栋　主编.现代分子生物学实验技术.北京:高等教育出版社, 1993. 137~ 154

(收稿: 1998-10-30;修回: 1999-02-01)
(编辑　汪勤俭)

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