

法优于以往的细胞计数法、³H-TdR 参入法。

· 关键词: 4-甲基伞形酮-乙酰氨基葡萄糖苷 3T3 细胞 碱性成纤维细胞生长因子

参 考 文 献

- [1] Gospodarowicz D. 1990, *Clin Orthop Relat Res.*, 257:231.
 [2] Tsuboi R. et al. 1990, *J Exp Med.*, 172: 245.
 [3] Cuevas P, et al. 1988, *Biochem Biophys Res Commun.*, 156:(2):611.
 [4] Aspenberg P, et al. 1991, *Acta Orthop Scand.*, 62:(5):481.
 [5] Kiyota Y, et al. 1991, *Brain Research.*, 545:322.
 [6] Gospodarowicz D. et al. 1974. *Nature*, 249: 123.
 [7] Mccarthy TL, et al. 1989, *Endocrinology*, 125(4):2118.
 [8] Landegren U. 1984, *J Immunol Methods*, 47(4):379.
 [9] 彭代智等, 1993, *中华外科杂志*, 31(8):501.
 [10] 郑杭民等, 1990, *免疫学杂志*, 6(1):45.

DETERMINATION OF 3T3 CELL PROLIFERATION BY MONITORING N-acetyl-β-D-GLUCOSAMINIDASE ACTIVITY AND ITS APPLICATION

DING Huan Wen SU Zeng Gui

(Department of Orthopedics, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou, 510010)

HE Xi Huang

(Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 400038)

ABSTRACT

In the present study 3T3 cell numbers were determined by monitoring its N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity. We studied the experimental condition of the method, and the bioactivity of bFGF was determined by the method. It was found that 3T3 cell numbers are proportional to its N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity. The experimental condition: 1. 3T3 cells were seeded to 96-well Micro Test plate about 10^3 — 1.5×10^3 per well. 2. 3T3 cells has a maximal response to bFGF when they were maintained in a low serum concentration between 0.4% and 0.8% calf serum. 3. N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity of 3T3 cells should be monitored after 48 hours of culture. 4. bFGF samples stimulated 3T3 cells proliferation as bFGF standard. Therefore 3T3 cell numbers can be determined by monitoring its N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity.

Key words: 4-methyl-umbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide 3T3 cell Basic fibroblast growth factor

用改进的 Mg^{++} 沉淀多聚核糖体法分离胞质 mRNA

张西平 黄磊 张楚瑜 王鄂生

(武汉大学生命科学学院 430072)

夏伏建

(中国农科院油料作物研究所 武汉 430062)

mRNA 的分离对于基因表达的调控, 核酸结构的分析及基因工程等方面的研究是十分重要的手段和工具。提取细胞 mRNA 目前大多采

用异硫氰酸胍^[1]或酸酚方法^[2]得到总 RNA, 继而用 oligo(dT)-纤维素层析柱或偶联有 oligo(dT)的磁珠纯化 mRNA。这些方法不需超离

心,简便,但实际提取的 mRNA 量往往偏低,不利于常规电泳检测。

本实验根据 Palmiter 的方法并加以改进,用镁离子沉淀多聚核糖体,只提取细胞质 RNA。这样既减少了提取的总 RNA 中的其它成分,特别是核前体 RNA 和细胞器 RNA 的干扰,同时也浓缩了细胞中的 mRNA。实验证明所得 mRNA 产量高于其他方法,可用常规方法检测,也不需超速离心

材料与 方法

1. 材料

酵母 *Candida utilis*, 培养基成分见文献^[3]。

2. 酵母细胞壁的裂解

参照文献^[4],用蜗牛酶处理酵母细胞壁,经显微镜检,待所有细胞都转化为原生质体后,1000g 离心 10 分钟。

3. 总 RNA 的提取参照文献^[5],并作了一些改进

收集原生质体,加入 3 倍的缓冲液 A (25mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 1mg/ml 肝素, 25mmol/L NaCl, 5mmol/L MgCl₂), 加入适量的玻璃珠 (0.45-0.5mm) 后用漩涡混合器高速振荡 10-15 次,每次 20 秒,并冰浴 1 分钟。静置,取悬浮液,27,000g 离心 5 分钟。取上清加入等体积的缓冲液 B (4 份缓冲液 A + 1 份 1mol/L MgCl₂) 混匀,4℃ 静置 1 小时。按 2ml 样品/1ml 缓冲液 C (0.2mol/L 蔗糖,其它成分与缓冲液 A 相同),将样品铺在缓冲液 C 上,27,000g 离心 10 分钟。取沉淀,加入适量的缓冲液 D (1% SDS, 0.05mol/L 醋酸钠缓冲液, pH5.0), 悬浮,酚-氯仿、氯仿抽提。取上清,加入 1/10 体积的 2mol/L NaCl 和 2 倍体积的无水乙醇, -20℃ 沉淀 30 分钟, 12,000g 离心 10 分钟,用 3mol/L 的醋酸钠洗涤两次, 75% 乙醇洗一次,待干燥后,加入无菌水溶解, -20℃ 保存。

4. mRNA 的分离纯化

参照文献^[4],用 0.05mol/L KOH 悬浮 oligo(dT)-纤维素 (Serva), 将悬浮液装入塞有灭菌玻璃棉的塑料枪头,柱床体积 0.5-1ml。用无菌水洗涤,用数倍体积的缓冲液 E (2.5mol/L KCl, 50mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 用时稀释 5 倍) 平衡。

总 RNA 样品于 65℃ 温浴 5 分钟,然后迅速冰浴 3 分钟,加 1/4 体积的缓冲液 E。样品加到层析柱上用

冲液 E 洗脱,用核酸蛋白检测仪监测。当扫描曲线再次降低到基线附近时,换无菌水洗脱。收集无菌水洗脱部分,加 1/4 体积的缓冲液 E,再次上柱,收集无菌水部分,加入 1/10 体积 3mol/L NaAc 和两倍体积无水乙醇沉淀。12,000g 离心 10 分钟, 75% 乙醇洗涤,干燥,无菌水溶解, -20℃ 保存。

5. 检测

总 RNA 和 mRNA 的纯度用 A260/A280 比值测定。其质量可用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,电极液使用 0.5×TBE。

6. cDNA 合成

参照文献^[4],所用逆转录酶为 Gibco 公司产鼠源逆转录酶。

结果与 讨论

细胞总 RNA 提取方法有多种,目前常用酚或硫氰酸胍提取。与这些方法相比,本方法的优势在于,减少了总 RNA 中细胞核 RNA 前体和细胞器 RNA 的干扰。并且得到的 mRNA 是正在翻译的成熟的 mRNA。同时由于镁离子沉淀的多聚核糖体对 mRNA 有保护作用,使 mRNA 免于被核糖核酸酶降解,有利于得到完整的 mRNA 分子。

RNA 的常规电泳检测需用甲醛,乙二醛变性电泳,但耗时多,不适于快速检测。本实验采用常规琼脂糖电泳,即可得到良好的实验结果。结果显示(图 1),总 RNA 有两条典型的 28S 和 18S 谱带,以及清晰的小分子 RNA 带。经两次柱层析纯化得到的胞质 mRNA 样品基本不含或仅含有微量的核糖体 RNA 和小分子 RNA。进一步柱层析纯化所得 mRNA 的纯度并没有明显的改善。

肝素钠是核糖核酸酶的竞争性抑制剂,防止 mRNA 被降解。本方法在 mRNA 提取纯化的整个过程中,未使用 DEPC 处理的水,而是双蒸无菌水,从实验结果(图版图 1)看, mRNA 并没有产生明显的降解。多次的实验证明,只要严格控制无菌操作条件,是可以将 RNA 的降解控制在最小程度的。琼脂糖电泳显示,所有的 mRNA 都在溴酚蓝指示剂之后,并一直延伸到

28S 的位置以上。估计这与提取过程中多聚核糖体的保护作用有一定的关系。因此对一些分子量较大的 mRNA 的提取,采用本方法有一定的优势。

采用本方法所得的细胞总 RNA 和 mRNA 样品的 A260/A280 比值都在 1.9—2.0 之间。

据 Palmiter 报道^[5],当镁离子的浓度达到 100mmol/L, mRNA 的回收率可达 88% 以上。每 200ml 酵母培养液(对数中,晚期)可得到 100 μ g 以上 mRNA。因此所得到的 mRNA 样品不论是进行消光值测定,还是电泳检测,数量都是足够的。根据我们的研究,在其它条件相同的情况下,采用镁离子沉淀法, mRNA 的得率是酸酚法的 5.2 倍。推测这可能是由于多聚核糖体的形成,一方面使 mRNA 得到保护,另一方面也使 mRNA 得到了浓缩。因此与一般的方法不同,镁离子沉淀法得到的 mRNA 可进行常规琼脂糖电泳,而用酸酚或异硫氰酸胍等方法,由于得率低,通常不适于常规电泳。由于得率高,因此该方法是细胞来源较少时提取 mRNA 的首选方法。

镁离子沉淀核糖体提取胞质 mRNA 的方法,本实验室曾成功用于分离大鼠肝细胞和油菜胞质 mRNA。

由本方法得到的 mRNAs 可直接用于合成 cDNA, PCR 扩增等实验。图版图 2 所示为用本方法得到的 mRNA 经逆转录得到的 cDNA。虽

然在 500bp 以下有一定的小分子产物,但在 500bp—2kb 之间也有大量的 cDNA 产物,可进一步用于 cDNA 文库构建。这也证明纯化 mRNA 的方法是可行的。本实验室目前已从所得的 cDNA 中用 PCR 扩增出特异蛋白质的 cDNA, 并已克隆成功(未发表)。有关工作还在深入研究中。

摘 要

本文报道一种用改进的 Palmiter 的方法分离纯化胞质 mRNA。即利用镁离子沉淀核糖体,提取细胞质总 RNA,进而纯化胞质 mRNA 的方法。该方法得到的 mRNA 是正在翻译的成熟的胞质 mRNA。所得 mRNA 得率和质量都优于其他方法,便于常规检测,并可用于 cDNA 的合成和 PCR 扩增。

关键词:镁离子沉淀法 多聚核糖体 mRNA

参 考 文 献

- [1] 宋学文等, 1996, 生物化学与生物物理进展, 23(2):169.
- [2] 蒋达和等, 1995, 武汉大学学报, 生物物理学专刊, 48.
- [3] Kalebina T S, et al., 1994, *Bioorganic Chemistry*, 20(6):627.
- [4] Sambrook J et al., 1993. 分子克隆, 第二版, 科学出版社.
- [5] palmiter R D, 1974, *Biochemistry*, 13(17): 3606.

AN AMELIORATED METHOD FOR ISOLATION OF CYTOPLASMIC mRNA BY MEANS OF Mg⁺⁺ PRECIPITATION OF POLYSOMES

Zhang Xi Ping Huang Lei Zhang Chu Yu Wang E sheng

(College of Life Sciences, Wuhan University, 430072)

Xia Fu jiang

(Oil Crops Research Institute CAAS, Wuhan 430062)

ABSTRACT

This paper describes an ameliorated method of Palmiter for isolation of mRNA, who used magnesium ions to precipitate polysomes. Only mature and translating mRNAs are purified by this method. The production and quality of isolated mRNAs were high and suitable for conventional analysis. The mRNA could be used for cDNA synthesis and PCR amplification.

Key words: Magnesium precipitation Polysomes mRNAs