

冰冻组织切片 RT-PCR 法快速检测组织内的 mRNA

涂正超 黄海宁 赵寿元 李昌本

(复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

RT-PCR 检测组织特异性表达 mRNA 的常规方法^[1]是先抽提组织的 RNA,然后反转录成 cDNA,再设计特定的引物进行 PCR 扩增。由于抽提 RNA 一般包括很多步骤,在这一过程中,不可避免地会造成 RNA 的丢失,有时易造成 RNA 的降解,而且还费时、费力。Jiang 等(1995)^[2]提出用石蜡包埋的组织切片作 RT-PCR 以检测组织的 mRNA,该方法虽然不需要抽提组织的总 RNA,但石蜡切片的制作、脱蜡、水化等过程都很复杂,所以该方法并不简便也不实用。我们改用冰冻组织切片 RT-PCR 检测 mRNA,既省略了 RNA 抽提过程,又克服石蜡切片的缺点,实验过程快速、简便、经济,且可同时处理大量的样品。

材料与 方法

1. 冰冻切片及其处理

从成年 SD 大鼠取新鲜的肝、肾等组织样品,剪成 $2 \times 2 \times 5 \text{mm}^3$ 的组织块,用 OCT 冰冻包埋剂包埋速冻,用冰冻切片机切成厚度 $10 \mu\text{m}$ 的切片,转移至 $500 \mu\text{l}$ 的离心管中,管内预先充满 $400 \mu\text{l}$ 的 4% 多聚甲醛固定液 (pH7.2),固定 10 分钟后,吸去固定液并用 PBS (pH7.2) 洗 3 次,用 $10 \mu\text{l}$ 的 0.1mg/ml 的蛋白酶 K 溶液 (用 DEPC 处理水配制) 于 55°C 消化 1 小时,于 95°C 温育 10 分钟灭活蛋白酶 K。

2. 反转录反应

采用 Promega 公司的 AMV 反转录酶,总体积为 $20 \mu\text{l}$,操作按说明书进行。

3. PCR 反应

我们用的一对引物是,引物 1: $5' \text{-TCATGAAGT-GTGACGTTGACATCCGTAAG-3'}$,引物 2: $5' \text{-CC-TAGAAGCATTGCGGTGCACGATGGAGG-3'}$ 。检测大鼠的 β -肌动蛋白的 mRNA^[3]。用复华公司的 FD Taq DNA Polymerase, PCR 反应按总体积 $50 \mu\text{l}$,含 1u 的 Taq 酶, 20pmol 的引物,反应条件为 93°C 预变性 5 分钟, 40 个循环 (93°C , 45s ; 55°C , 45s ; 72°C , 45s), 后延

伸 72°C 5 分钟。用 2% 的琼脂糖电泳检测。

结果与 讨论

我们设计的引物能够扩增大鼠 β -肌动蛋白 cDNA 的片段,长度为 285bp ^[3],也能同时扩增该基因的基因组 DNA,其扩增片段长度应该为 380bp (包含一个 95bp 的内含子)。我们同时用大鼠肝组织和肾组织的冰冻组织切片进行 RT-PCR,均能扩增出两条带 (图中之 2, 3),表明能够同时检测大鼠 β -肌动蛋白基因的 cDNA 和基因组 DNA 的片段。当用 DNA-free RNase 酶处理时,只能检测到基因组 DNA 的扩增片段 (图中之 5),用 2u RNA-free DNase 酶 (Promega) 处理切片 1 小时 (于 95°C 灭活 15 分钟),只能够检测到该基因的 cDNA 扩增片段 (图中之 6)。由此可知,用冰冻组织切片 PCR 方法,同样可检测出基因组的 DNA 片段 (不需要反转录反应)。当检测特定的 mRNA 时,可设计直接跨越内含子的引物,这样就只扩增该基因的 cDNA 片段,而不扩增其基因组 DNA 片段。

我们用多聚甲醛固定了 6 个月大鼠肝组织,用本方法仍能检测出该基因的 cDNA 片段和基因组 DNA 片段 (图中之 4)。所以本方法可用于检测固定保存的组织标本的 mRNA。用这种新方法进行 RT-PCR 检测组织的 mRNA,所有的反应均在一个小离心管中进行,可以避免污染及 RNA 的损失。由于本方法先将组织固定,然后直接用蛋白酶 K 消化,这样就可消除内源 RNA 酶的作用,使组织内的 RNA 不被降解。

摘 要

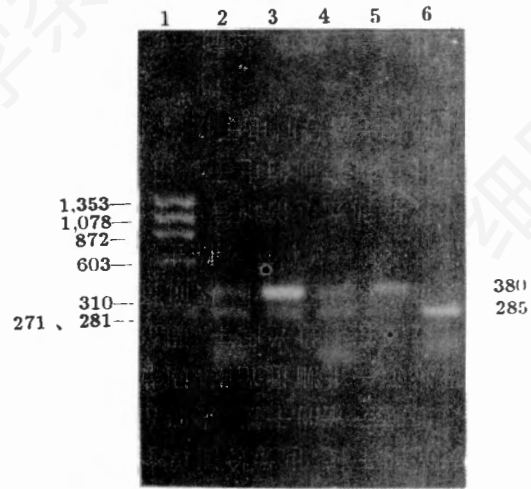
本文设计了大鼠 β -肌动蛋白基因的一对

引物,用冰冻组织切片 RT-PCR 方法,检测了鼠肝、肾该基因的 mRNA,结果能够扩增该基因的 cDNA 片段和基因组片段。用这种新的方法进行 RT-PCR 检测组织的 mRNA,快速、简单,同时也能够避免组织 RNA 的降解、污染。该方法也能直接 PCR 检测基因组的 DNA 片段。

关键词: RT-PCR 组织 mRNA 冰冻切片
大鼠 β -肌动蛋白基因

参 考 文 献

- [1] Sambrook, J., Fritsh, E. F. and Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- [2] Jiang Y. H. et al., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23:3071-3072.
- [3] Nudel, U. et al., 1983, *Nucleic Acids Res.*, 11:1759-1771.



冰冻组织切片的 RT-PCR 方法检测鼠组织 β -actin 基因 mRNA

1. Φ X174DNA/Hae III 分子量标记, 2. 肝组织切片 RT-PCR, 3. 肾组织切片 RT-PCR, 4. 固定 6 个月后鼠肝组织切片 RT-PCR, 5. 用 DNase-free RNase 处理的肝组织切片 RT-PCR. 6. 用 RNase-free DNase 处理的肝切片 RT-PCR

A SIMPLE AND RAPID RT-PCR METHOD FOR DETECTION OF TISSUE MRNA USING CRYOSECTIONS

TU Zheng Chao HUANG Hai Ning ZHAO Shou Yuan and LI Chang Ben
(State Key Laboratory of Genetic Engineering, Fudan University, Shanghai 200433)

ABSTRACT

Using a specific primers for rat β -actin gene, we have detected rat liver and kidney tissue β -actin gene mRNA by RT-PCR method using cryosections. Both the cDNA and genomic DNA of the gene was detected. As a new method to detect tissue mRNA, it is rapid, simple and can avoid RNA degrading. In addition, using this method we can directly amplify genomic DNA.

Key words: RT-PCR Tissue mRNA Cryosections Rat β -actin gene

《细胞生物学杂志》1998 年(第 20 卷)总目录

专论与综述

- 果蝇生殖细胞的性别决定 赵德标 俞慧 I:(1)
- 小鼠原始生殖细胞的起源、迁移和增殖 李光鹏 谭景和 I:(4)
- c-Myc 和细胞凋亡 黄行许等 I:(9)