

以 CB-F83-Oligo(dT)-纤维素批量亲和层析分离 poly(A)RNA

孙慧斌 宋秋宝

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

Poly(A)RNA 分离是反向转录 cDNA, 构建 cDNA 文库以及进行差异杂交等的基础工作, 也是改善 RNA 凝胶吸 Ep 和 S₁ 核酸酶保护实验质量的基本措施^[1]。Poly(A) RNA 的分离主要采用 Oligo(dT)-纤维素柱亲和层析的方法^[1,2]。我们在非洲爪蟾卵母细胞及早期胚胎 Poly(A) RNA 的分离过程中, 先后使用了 Poly(A) Quick Column (Stratagene 产品) 和 Oligo(dT) Cellulose, Type 7 (pharmacia 产品) 柱亲和层析以及 CB-F 83-Oligo(dT)-纤维素^[3] (中国科学院上海细胞生物学研究所, 苏州试剂厂产品) 批量亲和层析 (batch affinity chromatography), 其中以后者的分离效果最好。下面先介绍一下 CB-F 83-Oligo(dT)-纤维素批量亲和层析分离 poly(A)RNA 的实验方法, 然后结合我们的体会, 简要分析比较它的使用效果。

实验方法

1. 在 Oligo(dT)-纤维素中加入预冷的约 10 倍体积的 TK₁ 缓冲液 (10 mmol/L Tris·Cl, pH 7.5/0.5 mol/L KCl), 于 4℃ 下溶胀过夜, 然后用冰冷的 TK₂ 缓冲液 (50 mmol/L Tris·Cl, pH 7.5/2.5 mol/L KCl) 平衡备用。

2. 将溶于 TK₂ 缓冲液中的总 RNA (浓度约为 50 A 260/ml) 与处理好的纤维素混合, 置冰箱中吸附数小时。然后用预冷的约 10 倍于纤维素体积的 TK₁ 缓冲液洗涤离心 (Eppendorf 离心机, 下同), 每次 2 分钟, 6—8 次。以除去不吸附的 RNA (洗涤离心后, 上清液核酸检测应为阴性)。

3. 加入少量 DEPC (焦磷酸二乙酯) 处理过的无菌重蒸水, 于 55℃ 保温 10 分钟后, 离心 5 分钟洗提 Poly(A) RNA, 收集上清; 再加入少量 DEPC 处理的无菌蒸馏水。重复洗提 1 次。合并离心上清液, 加入 0.2 倍体积的 2 mol/L NaCl 和 3 倍体积的冷乙醇, 混合后置 -20℃ 4 小时以上。用前离心, 用 75% 的冷乙醇洗涤沉淀, 真空抽除残醇, 然后溶于少量 DEPC 处理过的无菌重蒸水。

实验体会

下表总结了我们以不同材料和方法分离非洲爪蟾卵母细胞和早期胚胎 Poly(A)RNA 的情况。

最初, 我们使用 Stratagene 的 Poly(A) Quick Column 分离非洲爪蟾囊胚和神经胚的 Poly(A)RNA, 得率极低, 无法满足实验要求。以后改用 Pharmacia 的 Oligo(dT) Cellulose, Type 7 作柱层析, 虽可初步满足实验要求, 但得率仍低于预期值^[4]。但在使用这种柱层析分离非洲爪蟾卵母细胞的 Poly(A)RNA 时, 得率很低。在此情况下, 我们试用了 CB-F 83-Oligo(dT)-纤维素批量层析法, 取得了成功。Poly(A)RNA 的得率高, 质量好 (用所分离的 Poly(A)RNA 作模板反转录合成 cDNA、构建 cDNA 文库, 结果令人满意)。我们再把该材料和方法试用于非洲爪蟾囊胚和神经胚 Poly(A)RNA 的分离, 也都得到了满意结果。

本文在写作过程中得到庄孝德教授的指导, 特此致谢。

表 非洲爪蟾卵母细胞和早期胚胎 Poly(A)RNA 分离实验小结[□]

非 洲 爪 蟾	Poly(A) Quik Column* (Stratagene)			Oligo(dT)Cellulose* (Pharmacia)			CB-F 83 Oligo(dT)-纤维素* (国产)		
	总 RNA* (μg)	Poly(A)RNA ^Δ (μg)	得率 (%)	总 RNA* (μg)	Poly(A)RNA ^Δ (μg)	得率 (%)	总 RNA* (μg)	Poly(A)RNA (μg)	得率 (%)
卵母细胞				2,000	≤ 1.2	0.06	2,000	45	2.25
囊 胚	650	≤ 1	0.15	697	4	0.57	500	9	1.8
神经胚	650	≤ 0.15	0.02	594	9	1.5	500	11	2.2

□ 用于分离的总 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.98—2.24 之间。

* 按产品说明书操作；表内所列为一次过柱结果。

^Δ 以紫外分光光度法定量。

^Δ 以溴化乙锭-琼脂糖凝胶法定量。

为进一步分析上述实验结果，我们在实验条件完全相同的情况下，同时用以 Oligo(dT) Cellulose, Type 7 (pharmacia) 为亲和体的层析柱分别从非洲爪蟾卵母细胞和某人肝癌细胞株的总 RNA (OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均 ≥ 2.0) 中分离 poly(A) RNA。结果，后者的分离效果较好，得率基本在正常范围内 (李建明，未发表资料)；而前者的分离则很不理想 (见表)。

综上所述，Oligo(dT) Cellulose Type 7 (Pharmacia) 对 Poly(A)RNA 的分离效果与用于分离的组织或细胞材料有关。用于一般组织或细胞时，可能效果较好；但不适用于如非洲爪蟾卵和早期胚胎一类实验材料。当用于这类材料时，卵母细胞或发育时期较早的，分离效果较差；反之，则较好些。

CB-F 83-Oligo(dT)-纤维素和 Oligo(dT) Cellulose, Type 7 (pharmacia) 对上述组织细胞 Poly(A)RNA 的不同分离效果，反映出非洲爪蟾卵母细胞和早期胚胎组织的 Poly(A) RNA 与其它组织的 Poly(A)RNA 在分离特性上存在着不同程度的差异，并可能因此决定或影响两种纤维素 (Oligo(dT)Cellulose) 在上述实验中的分离效果。至于是何种因素导致了这种差异；以及这种差异是否与在卵母细胞和早期胚胎中大量的卵原性 mRNA 含有共价连接

的重复序列^[6]，并以多聚状态存在^[6]等特性有关，都是些很有兴趣的问题，值得进一步研究。

尽管经验有限，但根据我们的体会，至少对非洲爪蟾卵母细胞和早期胚胎这类组织的 Poly(A)RNA 分离，国产的 CB-F 83-Oligo(dT)-纤维素优于其他两种国外产品。此外，由于以 CB-F 83-Oligo(dT)-纤维素作亲和体分离 Poly(A)RNA 通常采用批量亲和层析的方法，因而方便省时，具有很强的实用性。

参 考 文 献

- [1] Davis, L. G., et al., 1986, Method in Molecular Biology., pp. 139—142, Elsevier Science Publishing Co, Inc., New York. Amsterdam. London.
- [2] Sambrook, J. et al., 1989, Molecular Cloning. A Laboratory Manual., 2nd Ed., pp. 7.26—7.29, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- [3] 上海实验生物研究所三室等，生物化学与生物物理进展，1977，4：8。
- [4] Davidon, E. H., 1976, Gene Activity in Early Development., 2nd Ed., Academic Press, New York.
- [5] Anderson, D. M. et al., 1982, J. Mol. Biol., 155: 281.
- [6] Ballantine, J. E. M. et al., 1979, J. Embryol. Exp. Morphol., 51: 137.