

实验技术

一种改良的RNA超离心制备方法

孙慧斌 宋秋宝

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

RNA制备是分子生物学中常用的实验技术之一。RNA的常用制备方法包括蛋白酶K/SDS法、异硫氰酸胍或盐酸胍超离心法^[1,2]以及热酚法^[3]等。我们在制备非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)早期胚胎RNA的过程中,通过对不同实验方法的比较,摸索出一种RNA制备方法(改良法),提高了超离心的效率,简要介绍如下。

实验步骤

1. 将新鲜或液氮冻存的胚胎组织置于冰冷的约10倍体积的NTES缓冲液(50 mmol/L NaCl/50 mmol/L Tris-Cl, pH 7.5/5 mmol/L EDTA, pH 8.0/0.5% SDS)中,以涡式振荡器剧烈震荡约10分钟至细胞完全裂解后,加入蛋白酶K至终浓度为200 μg/ml, 37℃, 温育20分钟。

2. 加入0.1倍体积冰冷的3 mol/L 醋酸钠(pH 5.2), 4℃, 5,000 × g 离心10分钟后, 收集上清。以经醋酸钠(pH 5.2)饱和的重蒸酚抽提1次后, 将上层水相移至新管, 加入0.1倍体积的3 mol/L 醋酸钠(pH 5.2)和2.5倍体积预冷的乙醇, 经短时冰浴后, 置-70℃保存。分次制备的初提样品积累到相当数量后, 进行下一步超离心。

3. 将初提样品于4℃, 10,000 × g 离心30分钟。弃上清, 以70%冷乙醇离心洗沉淀物1次后沥干, 置超净台内干燥10分钟。将相当于约2000个非洲爪蟾早期胚胎的初提样品溶于8.1 ml TE缓冲液(pH 7.5)。然后加入0.9 ml 2 mol/L 醋酸钾(pH 5.0), 并按1 g/2.5 ml的比例加入3.6 g CsCl, 溶解、摇匀, 得到9 ml超离心样品(HITACHI-RDS 65 转子全部3只5 PA 管1次超离心样品量)。铺样于5.6 mol/L CsCl缓冲液的顶层, 20℃, 139,000 × g 离心, 21—24小时。常规收集分离的RNA。

讨论与说明

1. 在常用的RNA制备方法中, 蛋白酶K/SDS法和热酚法比较简便, 不需要特殊设备。但在用于非洲爪蟾等的卵和早期胚胎材料的RNA制备时, 由于不能有效地去除样品中的卵黄, 糖蛋白等杂质, 降低了所制备RNA的质量。为此, 通常采用LiCl处理的方法对样品做进一步纯化。但由于LiCl中的Cl⁻对体外翻译系统中的蛋白合成和依赖RNA的DNA聚合酶活性有抑制作用, 因而经它处理的RNA不能用于体外翻译和cDNA的反转录合成^[2]此外, 蛋白酶K/SDS法和热酚法都是采用DNA酶消化的方法去除样品中的DNA^[2,3]。由于市售的DNA酶仍含有RNA酶活性, 通常需要纯化^[2], 也给实验带来一定困难。

采用常规超离心法虽没有上述问题, 但它的实验费用高, 并受离心条件的限制。在离心条件有限的情况下, 同样不适合于进行较大量RNA的制备。

这里介绍的改良法, 不仅可以提高超离心的制备效率, 而且能够保证RNA的质量。所制备的RNA可以满足包括体外翻译和反转录合成cDNA在内的各种实验需要。

2. 本方法分为两步。首先, 用于RNA提取的组织在蛋白酶K/SDS作用后, 经离心和抽提, 部分除去卵黄和蛋白。进而, 对初提样品进行超离心, 去除混杂的DNA和蛋白, 使

本文在写作过程中得到庄孝德教授的指导, 特此致谢。

RNA 进一步纯化。由于对样品进行了初提, 所以提高了超离心的处理样品的数量。以 HITACHI·RPS 65 转子为例, 用本室常规盐酸胍超离心方法^[4], 每次离心一般只能处理约 300—500 枚非洲爪蟾胚胎。而采用经改进的方法, 每次离心处理的胚胎数量可增加到 2000 枚, 即提高 4—6 倍, RNA 的得率基本不变 (两种方法均为约 0.25—0.3 μg/胚胎), 表明没有出现超载。这样不仅解决了多量 RNA 制备经常遇到的超离心容积不足的问题, 提高了超离心的工效, 而且可以减少 CsCL 等的用量。

3. 改良法集中了其他几种方法的优点, 前面已经提到, 用蛋白酶 K 法或热酚法都很难完全去除样品中混杂的卵黄和糖蛋白等, DNA 也是用酶解的方法去除的。而用超离心的方法则可以有效地去除这些杂质。在改良法中, 由于样品在超离心前已经过初提, 因此可以通过有限的超离心处理大量样品。并且 RNA 纯化效果与我室通常采用的盐酸胍超离心法^[4]基本相同(表)。

表 不同方法制备的非洲爪蟾神经胚总 RNA 的紫外分光光度检测*

	超离心法	改良法	蛋白酶 K/SDS 法	热酚法
OD 260/280	2.15	2.11	1.83**	1.73**

*在数次实验结果一致的情况下, 重复实验的检测结果。

**经 4 次有机抽提。

(上接插页 2)

9. 摘要应放在文章的开头, 文字力求简练, 能表达文章的中心意思, 以 150—200 个字为限。

10. 文内引用参考文献应按其在文中出现先后编号, 用方括号括起, 未经公开发表的资料不得引用。文献应举重要的, 一般应不超过 30 篇。文稿所附参考文献应列在文章的最后部分, 作者姓名超过 6 个以上的, 只列 3 个并加 et al., 书写格式如下:

1) 引用期刊的:

(1) Saito T, Ogawa K. Lysosomal changes in rat hepatic parenchymal cell after glucagon administration. *Acta histochem cytochem* 1974; 7: 1-18.

(2) 引用著作的:

(2) Hirsimaki P, Arstuka AU, Trump BF, Marzella L. Autophagocytosis In: Trump BF, Arstuka AU, eds. *Pathobiology of cell membranes*. Plenum Press, New York, 1983; 201-36.

11. 来稿请寄: 上海市岳阳路 320 号, 200031. 中国科学院上海细胞生物学研究所。《Cell Research》编辑部收。

4. 由于在方法设计上采取了抑制 RNA 酶活性的措施, 如在蛋白酶 K 酶解反应中加入适当浓度的 EDTA, 适当缩短温育时间; 尽可能降低溶液及反应的温度; 控制体系的 pH 及使用酸性醋酸钠饱和的苯酚等, 因而有效地防止了 RNA 的降解。尽管如此, 实验中还应尽可能采取措施以防止 RNA 酶的污染, 如: 使用无污染的一次性塑料制品; 用于实验的玻璃器皿应在 180℃ 下烘烤 6 小时或 240℃ 下烘烤 4 小时以上; 除 Tris 以外的所用溶液最好以 DEPC(焦磷酸二乙酯) 处理过的双蒸水配制并高压灭菌或以 0.22 μm 的无菌滤膜过滤; 戴手套进行实验操作等。

参 考 文 献

- [1] Davis, L. G. et al., 1986, *Method in Molecular Biology*, pp. 129-138, Elsevier Science Publishing Co, Inc., New York. Amsterdam. London.
- [2] Sambrook, J. et al., 1989, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Ed., pp. 7.3-7.25, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- [3] Hennig, W., 1991, *Molecular-Cell- and Developmental Biology IV*, pp. 6, Guest Laboratory of Max-Planck-Gesellschaft, Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica, Shanghai.
- [4] 寿伟年, TGF β 相关分子与爪蟾胚胎早期发育 (中国科学院上海细胞生物学研究所博士学位论文) P.27, 1991, 中国·上海。