

细胞数呈线性关系(见图1)。

我们在测试 TGF- $\beta$  1 生物活性的实验中, 加 TGF- $\beta$  1 浓度范围为 0.1—10  $\mu\text{g/ml}$ 。每组作三孔测定, 取其 O.D 值的平均值, 然后计算出 TGF- $\beta$  1 每一浓度时的细胞数, 计算对 CCL/64 细胞生长抑制率。结果明确显示, 随着 TGF- $\beta$  1 浓度增加, CCL/64 细胞生长抑制

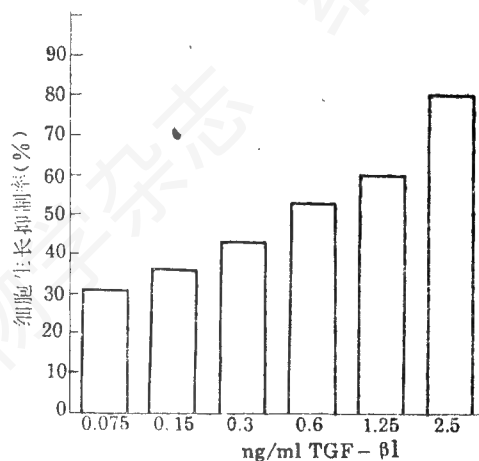


图 2 不同浓度 TGF- $\beta$  1 对 CCL/64 细胞生长的抑制。  
细胞接种量  $2.5 \times 10^4$ /孔

率也增加(图 2)。

多孔比色法除了测定 TGF- $\beta$  活性外, 同样也可用作测定其它细胞生长因子对靶细胞生长抑制或促进的活性[6]。我们曾应用这一方法测定了人或动物一些贴壁生长细胞系的生长曲线, 结果表示比常规手掀式计数器计数更精确、方便(未发表资料)。这种甲烯蓝染色法预期将可用于检测化疗药物、细胞毒素等对肿瘤细胞或其它靶细胞生长影响研究中。

### 参 考 文 献

- [1] De Larco, J. E., et al., 1978, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 75: 4001—4005.
- [2] Sporn, M. B., et al., 1986, *Science*, 233: 532—534.
- [3] Assoian, R. K., et al., 1983, *J. Biol. Chem.*, 27: 739—746.
- [4] Ikeda, T., et al., 1987, *Biochem.*, 26: 2406—2416.
- [5] Absher, M., et al., 1991, *J. Immunol Methods.*, 138: 301—303.
- [6] Oliver, H., et al., 1989, *J. Cell. Sci.*, 92: 513—518.

### 经验交流

## 一种快速分离真核细胞 RNA 的方法\*

顾建明 吴庆宇 王晓冬 李佩霞 阮长耿

(苏州, 江苏省血液研究所, 苏州医学院血栓与止血研究室, 215007)

RNA 的制备和纯化是分子生物学研究中极为重要的一环, 在 cDNA 文库的建立、细胞基因表达研究等方面都是不可缺少的。大量 RNA 的取得通常是采用氯化铯超速离心方法, 这个方法的缺点在于需要长时间的超速离心, 且需要昂贵的试剂与仪器设备。为了克服该方法的缺点, 我们参考了 Chomczynski 等人<sup>[1]</sup>的

工作, 经过摸索和改进, 用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿抽提及两次异丙醇沉淀, 可制备到较纯的真核细胞 RNA, 能满足各种实验的要求。此法简便、快速、无需特殊仪器要求, 现介绍如下。

\* 国家自然科学基金会资助课题。

本文制图得到过宇同志大力支持, 特此致谢。

## 材料与方 法

1. 细胞来源 NS-1 小鼠骨髓瘤细胞株, 为我室引进的长期传代细胞。

### 2. 主要试剂配制

1) DEPC H<sub>2</sub>O 每 1 升三蒸水, 加 DEPC (焦碳酸二乙酯, Fluka 产品) 1 ml, 混匀后置 37°C 水浴 12 小时, 15 磅消毒 30 分钟。

2) 溶解缓冲液 4 mol/L 异硫氰酸胍 (Sigma), 25 mmol/L 柠檬酸三钠, pH 7.0; 0.5% 月桂酰肌酐酸钠 (Sigma); 0.1 mmol/L β-巯基乙醇 (Fluka)。室温放置一月。

3) 处理苯酚 新鲜重蒸苯酚, 加 0.1% 8-羟喹啉, 以等体积 DEPC H<sub>2</sub>O 饱和和处理 3—4 次。

4) 醋酸钠缓冲液 2 mol/L 醋酸钠, 用冰醋酸调 pH 至 4.0。

5) 5 × 电泳缓冲液 200 mmol/L MOPS (Sigma), 50 mmol/L 醋酸钠, pH 4.0; 5 mmol/L EDTA。以 NaOH 调 pH 至 7.0。

以上试剂均以 0.1% DEPC H<sub>2</sub>O 配制, 12 小时后 37°C 水浴放置高压消毒 30 分钟。

6) 其它试剂 0.24—9.5 Kb RNA Ladder 为美国 BRL 公司产品; [α-<sup>32</sup>P]-dCTP 为英国 Amersham 公司产品; 0.8 Kb 肌动蛋白 cDNA 探针由美国芝加哥大学 Hanukoglu 博士惠赠<sup>[2]</sup>。

3. RNA 抽提 NS-1 骨髓瘤细胞培养液, 2500 rpm 离心 10 分钟。细胞团块以 0.01 mol/L PBS 洗涤两次后移至 Eppendorf 离心管。加入 0.5 ml 溶解缓冲液悬浮 NS-1 细胞, 然后依次加入 50 μl 2 mol/L NaAc, 0.5 ml 处理苯酚, 100 μl 氯仿/异戊醇 (49:1), 立即上下颠倒混匀 1 分钟。冰浴 15 分钟后, 于 4°C 12,000 rpm 离心 20 分钟。将含有 RNA 的水相转移至另一 Eppendorf 离心管中, 加入等体积的预冷异丙醇, 混匀后, -20°C 放置 1 小时。然后于 4°C 12,000 rpm 离心 20 分钟。为了获得较纯的 RNA, 将 RNA 团块再溶解于 0.3 ml 溶解缓冲液中, 同上以异丙醇沉淀 RNA。最后以 75% 乙醇洗涤一次, 室温干燥 15 分钟后, 将 RNA 溶解于适量体积的 DEPC H<sub>2</sub>O 中, 置 65°C 水浴 15 分钟, -80°C 保存备用。若长期保存, 加入 2.5 倍体积乙醇, 置 -80°C。

### 4. RNA 样品鉴定

1) 微电泳检查 每样品取 5 μg RNA 置 1% Ag-rose 凝胶上电泳 2 小时, 6 V/cm。电泳缓冲液: 1 ×

MOPS。泳毕, 溴乙锭染色 30 分钟后, 置紫外灯下观察。

2) Northern blot 参见分子克隆方法<sup>[3]</sup>。肌动蛋白 cDNA 探针标记采用随机引物延伸法<sup>[4]</sup>。

## 结果与讨论

本法制备的 RNA 纯品在紫外分光光度计上测定 OD 260 nm 和 OD 280 nm 吸收值, 通过计算 OD 260/OD 280, 比值均大于 1.8, 说明制

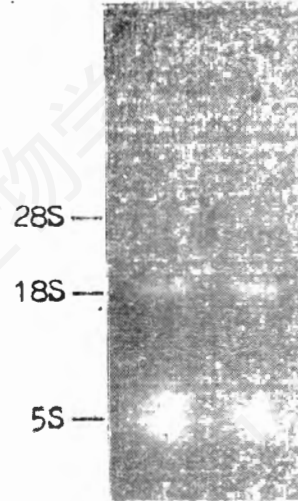


图 1 制备的真核细胞核糖体 RNA

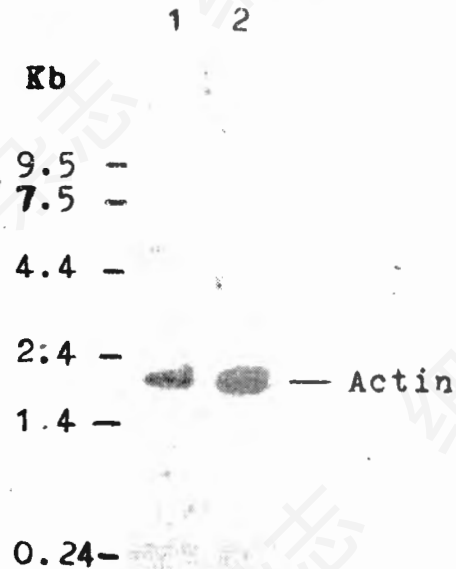
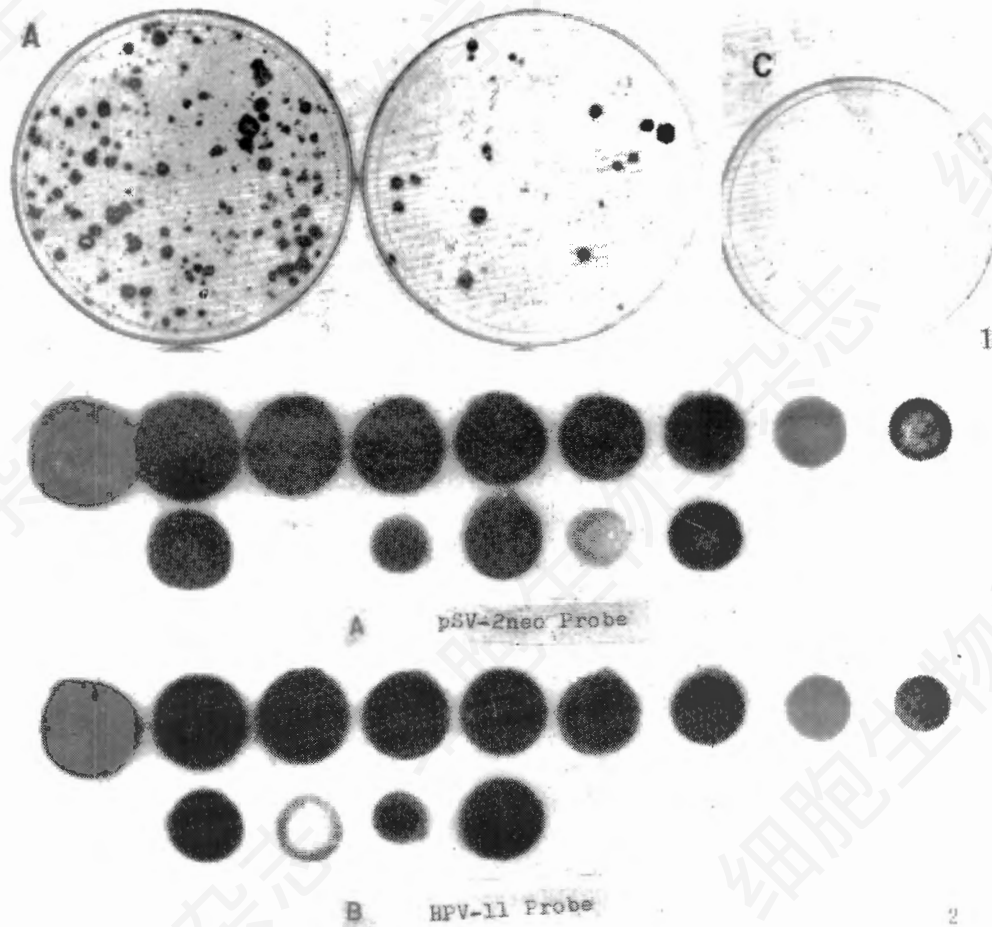


图 2 Northern blot 分析

(1) 3 μg RNA; (2) 6 μg RNA  
左: 0.24—9.5 Kb RNA Ladder

(下转插页 1)



(上接第192页)

备的 RNA 较纯。制备的 RNA 样品, 经琼脂糖微电泳检查, 无 DNA 污染, 可清楚见到较锐的真核细胞核糖体 RNA 条带(28 S, 18 S, 和 5 S)(图 1)。经 Northern blot 分析, 可见 1.9 Kb 肌动蛋白 mRNA 杂交区带, 而没有任何降解的迹象(图 2)。

用本法制备 RNA 具有简单、快速等优点, 整个分离过程在 4 小时内即可完成。在本法中, 我们使用乙醇代替异丙醇沉淀 RNA 得到同样的结果。经过多次使用本法制备 NS-1 细胞、淋巴细胞和血小板 RNA, 证明方法稳定可靠。制备的 RNA 适用于 Dot blot、Northern blot 以及逆转录 PCR 等分析。

#### 摘 要

以改良的异硫氰酸胍-苯酚-氯仿法从真核

细胞中制备 RNA, 经琼脂糖微电泳检查, 可清楚见到三条真核细胞核糖体 RNA 带(28 S, 18 S, 和 5 S); 经 Northern blot 检测可见未降解的 1.9 Kb 肌动蛋白 mRNA 杂交区带。该法具有快速、简便、产率和纯度均较高等优点。

#### 参 考 文 献

- [1] Chomczynski, P and N. Sacchi., 1987, *Anal. Biochem.*, 162: 156—159.
- [2] Hanukoglu, I. et al., 1983, *J. Mol. Biol.*, 163: 673—678.
- [3] Sambrook, J. et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Second Edition)*, Ed. by Sambrook, J et al., pp. 7.39—7.52, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- [4] Feinberg, AP and B. Vogelstein., 1983, *Anal. Biochem.*, 143: 6—10.