

of gastric carcinogenesis. Silver staining PCR-SSCP is a convenient, rapid, sensitive and reliable method for detecting of MIN in gastric carcinoma.

Key words: Gastric neoplasm Microsatellite instability Polymerase chain reaction

一种用矽石快速提取总 RNA 的方法

游力 赵跃然 张建 高春义

(山东省医学科学院基础医学研究所, 山东肿瘤生物治疗研究中心 济南 250062)

核酸的提取是分子生物学研究中最基本的方法。目前从组织或细胞中抽提总 RNA 的方法主要是根据 Chomczynski 介绍的异硫氰酸胍-酚-氯仿法^[1] 或在其基础上加以改进, 但仍存在着步骤多、时间长且收率不高等缺陷。我们参考国外文献, 根据矽石(Silica)能够吸附核酸的特性, 从组织和细胞中抽提总 RNA, 并经过 RT-PCR, 克隆了人血小板生成素(TPO)片段, 取得了满意的结果。现将方法介绍如下:

材料与 方法

一、材料

1. 溶液 D 4mol/L 异硫氰酸胍、25mmol/L 柠檬酸钠 (pH7.0)、0.5% 十二烷基肌氨酸钠、0.1mol/L β -巯基乙醇。

2. 矽石 (Silica) Sigma 产品, 5 克矽石溶于 50ml 双蒸水中, 振摇 5 分钟, 室温静置 4 小时吸去上清, 以去除小的矽石颗粒, 取适量的矽石加入 TE (pH7.4) 缓冲液中, 使终浓度为 30mg/ml。

3. 洗涤液 50% 乙醇、10mmol/L EDTA (pH 8.0)、50mmol/L Tris-HCl (pH7.4)、200mmol/L NaCl。

4. TPO 引物 上游 5'-ATGTCGACCATG-GAGCTGACTGAATTG-3'、下游 5'-TTACCT-GACGCAGAGGGTGGACC-3'。由上海生工公司合成。

二、方法

1. 细胞和组织总 RNA 的抽提 2×10^6 细胞或 100mg 胎肝组织经研磨后, 生理盐水洗一次, 加 200 μ l 溶液 D。悬浮细胞, 再依次加入 20 μ l 2mol/L NaAc (pH4.0)、200 μ l Tris-HCl (pH8.0) 饱和酚、40 μ l 氯仿-

异戊醇(49:1), 处理组织时所加各种试剂量均相应增加 5 倍。每种试剂加入后均需混匀, 最后震荡 5 分钟, 置冰浴 15-30 分钟, 12000 转/分离心 5 分钟, 取上清置于另一 Eppendorf 管中, 加矽石液(用时摇匀) 1ml, 颠倒混匀, 室温放置 2 分钟, 10 000 转/分离心 1 分钟, 弃上清, 加洗涤液 1ml, 悬浮沉淀, 离心后重复一次, 用丙酮洗一次, 室温干燥, 加 60 μ l 经焦碳酸二乙脂(DE-PC)处理过的双蒸水, 悬浮沉淀, 置 65 $^{\circ}$ C 水浴 5 分钟, 12000 转/分离心 1 分钟, 上清即为细胞或组织总 RNA。

2. TPO 片段的 RT-PCR 取 7 μ l 胎肝总 RNA 为模板, 0.5 μ g 随机引物, 经逆转录获得 TPO cDNA, 再以 0.5 μ g TPO 引物, 25mmol/L MgCl₂ 3 μ l、10 \times buffer 5 μ l、2.5mmol/L dNTP 4 μ l、cDNA 1 μ l、Taq 酶 1.25u 进行 RT-PCR, 循环参数为 95 $^{\circ}$ C 10 分钟变性, 再 94 $^{\circ}$ C 1', 60 $^{\circ}$ C 1' 72 $^{\circ}$ C 1' 30", 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 分钟延伸, 扩增结束后经 1% 琼脂糖电泳观察。

3. 总 RNA 纯度及完整性的鉴定 制备 1.5% 的琼脂糖凝胶于 1 \times TAE 电泳缓冲液中, 每孔上样 6 μ l 总 RNA 及 6 \times 上样液 2 μ l, 加水至 12 μ l, 电压为 50v/cm, 当溴酚蓝指示剂到整个凝胶长度的 2/3 时, 于紫外分析仪上观察总 RNA 情况。同时于 754 紫外分光光度计上检测 RNA 的含量和纯度。

结果与 讨论

1. RNA 的鉴定 用矽石法提取胎肝及 K562、P158、人单核细胞等十种细胞总 RNA。对细胞样品总 RNA 的产量为 5-10 μ g/2 \times 10⁶, 100mg 胎肝组织可得 80 μ g 左右的总 RNA, OD260/OD280 为 1.820 \pm 0.002, 琼脂糖凝胶电泳分析, 细胞及组织均可见清晰的

18S 和 28S 带(图 1),说明所得 RNA 未发生降解。

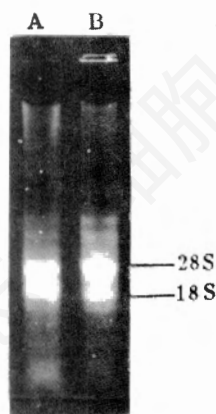


图 1 细胞及组织总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图
A. 胎肝组织总 RNA;
B. 细胞总 RNA。

2. RNA 的 RT-PCR 为进一步鉴定砂石法制备的 RNA 用于分子生物学研究的可行性,我们以该法制备的胎肝总 RNA 为模板,进行 RT-PCR,扩增人 TPO cDNA 上游序列。PCR 产物凝胶电泳分析显示,在 500bp 左右可见一扩增 DNA 片段,与预期扩增产物大小一致(图 2)。序列分析显示扩增片段即为人 TPO cDNA 5' 端 500bp 的序列(图略)。

清除 RNA 酶对 RNA 的影响对总 RNA 的提取起重要作用,因此在操作前需要彻底清除 RNA 酶的影响以保证得到完整的 RNA。异硫氰酸胍既是 RNA 酶的抑制剂,又可活化砂石,活化的砂石具有吸附核酸的特性^[2],因此我们在使细胞裂解的方法中利用异硫氰酸胍的性

质,使 RNA 与砂石相结合,在 65℃ 温度下 RNA 又从砂石上解脱下来,利用此方法制备一个 RNA 样品仅需 40 分钟,与 Chomczynski 介绍的一步法相比,由于操作步骤少、时间短,减少了 RNA 酶作用机会,因而所得 RNA 不仅在数量上而且在质量上均达到较高水平。这种提取 RNA 的方法适合各类实验室应用。

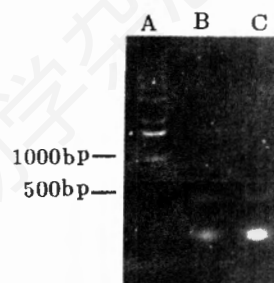


图 2 RT-PCR TPO 特异扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图
A. 1kb ladder DNA 标准;
B. C. 500bp TPO 扩增产物。

摘 要

根据砂石能与核酸结合的特性,建立了用砂石提取细胞和组织总 RNA 的方法,方法简便、快速,所得 RNA 适用于各种研究。

关键词: 砂石 总 RNA

参 考 文 献

- [1] Chomczynski P, Saechi N, 1987, *Analytic Biochem.*, 162:156-159.
- [2] Sparks RB, Elder JH, 1983, *Analytic Biochem.*, 135:345-348.

A RAPID METHOD FOR RNA ISOLATION BY SILICA

YOU Li ZHAO Yue Ran ZHANG Jian GAO Chun Yi

(Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062)

ABSTRACT

By means of binding capability of silica with nucleic acid, a simple and rapid method for total RNA isolation by silica is described. The method is adapted for isolation of RNA from cells and variable tissue samples. RNA isolated by

this method can be used for various researches.

Key Words: Silica Total RNA

AFLP-银染法检测植物基因组多态性*

张峰 宋文芹 陈瑞阳**

(南开大学生物系 天津 300071)

扩增性酶切片长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism,简称 AFLP)是 1992 年由 Zabeau 等人发明的一项新的 DNA 指纹技术。该方法结合了 RFLP(Restricted Fragment Length Polymorphism)技术与 PCR 技术的特点,其基本原理是:将植物的总体 DNA 用一定的限制酶消化后,和特定的人工接头连接,然后用特异性引物进行扩增,最后通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增片段的多态性。

AFLP 技术虽然刚产生不久,却受到了广泛的重视。它较其他的 DNA 指纹技术,如 RFLP、RAPD、SSR,具有检测的多态性多,对模板浓度不敏感,扩增结果稳定,不需要了解序列信息的优点^[1,2]。该技术现已广泛用于拟南芥^[3]、水稻^[4]、大麦^[5]、马铃薯^[6]、番茄^[7]等植物的高密度遗传图谱的构建、分子标记的筛选,以及遗传多样性的研究,是目前一种比较理想的 DNA 指纹技术。

但是,目前 AFLP 技术一般采用同位素标记的方法进行检测,由于放射性同位素操作不便,而且曝光时间长,限制了该方法的推广。本文采用银染的方法检测扩增产物,取得了很好的效果。而且使用银染法能够降低试验成本,缩短试验周期,提高了 AFLP 技术的实用性。

材料和方法

1. 材料

玉米种子:父本获唐黄,母本黄野 4 号,杂种一代唐抗 5 号;父本八苏,母本 DB 丹,杂种一代黄玉 5 号;杂交种沈丹 7 号,掖单 13 号,农大 60,津鲜 1 号,冀单

17,都是由天津市种子公司提供。番茄总体 DNA 由 AFLP 试剂盒(购自 GIBCO-BRL 公司)提供。菜花种子由天津农科院蔬菜研究所提供。

2. 玉米、菜花总体 DNA 的提取

采用 Murray 等人^[8]的方法。取 0.2g 新鲜植物叶片,在液氮中研成粉末,加入 2ml CTAB 提取缓冲液[0.7mol/L NaCl,1%CTAB(十六烷基溴化铵),50mmol/L Tris-HCl pH8.0,10mmol/L EDTA],充分混匀,56℃保温 30 分钟,5000rpm 离心 10 分钟,取上清。加等体积酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)混匀,5000rpm 离心 10 分钟,取上清。再加等体积氯仿/异戊醇(24:1)混匀,5000rpm 离心 10 分钟,取上清。加入等体积 CTAB 沉淀缓冲液(1% CTAB,10mmol/L EDTA,50mmol/L Tris-HCl pH8.0)。室温放置 30 分钟,3000rpm 离心 5 分钟收集沉淀。晾干沉淀后,溶于 400 μ l 1mol/L NaCl 中,再加入 2 倍体积无水乙醇,-20℃沉淀半小时,12000rpm 离心 15 分钟收集沉淀,75%乙醇洗涤沉淀,室温晾干,溶于 50 μ l TE(50mmol/L Tris-HCl pH8.0,10mmol/L EDTA)中。加入 2%(v/v)RNase(10mg/ml)除去 RNA。0.7%琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 质量。

3. AFLP

AFLP 试剂盒购自 GIBCO-BRL 公司,操作步骤如下:

(1) 总体 DNA 限制性酶切反应 在 25 μ l 反应体系中含有 5 μ l 5 \times 酶切反应缓冲液(50mmol/L Tris-HCl pH7.5,50mmol/L MgAc₂,250mmol/L KAc),250ng 总体 DNA,2.5U EcoRI 酶,2.5U MseI 酶,37℃酶切 3 小时。

(2) 接头连接 限制性酶消化后,再加入 1 μ l T4 DNA 连接酶(1unit/ μ l),24 μ l 接头混和液(0.4mmol/L ATP,10mmol/L Tris-HCl pH7.5,10mmol/L

*天津科委科技攻关资助项目。

**通讯联系人。