

• 实验技术与方法 •

简便、快速提取高质量的 RNA 分子

杜 鉴 袁艳华 马生林 董志伟

(北京市肿瘤防治研究所 北京 100034)

Methods for Handy, Rapid Isolation of High Quality RNA by Guanadim Thiocyanate

Du Jian Yuan Yanhua Ma Shenglin Dong Zhiwei

(Beijing Institute for Cancer Research Beijing 100034)

硫氰胍是一种有效的蛋白变性剂。早在 1979 年, Chirgwin 等就利用氯化铯/硫氰胍超离心技术成功地从 RNA 酶富集的胰脏组织中提取出未降解的 RNA 分子⁽²⁾, 从而使它成为抑制 RNA 酶的首选药物并得到广泛使用, 但受到超速离心设备的限制。1983 年, Cathala 报道了氯化锂/硫氰胍 RNA 提取法⁽¹⁾。该方法操作简便, 获得的 RNA 质量很高, 但所需时间较长。为了能在短时间内更快更好地提取 RNA 分子, Chomczynski 等人用硫氰胍结合热酚法推出了酸性/硫氰胍/酚/氯仿一步法提取总 RNA⁽³⁾。该方法能在 4 小时内完成总 RNA 提取, 并可同时制备多个 RNA 样品, 目前已被许多实验室采用。本文对上述三种方法获得的 RNA 进行了全面的分析与比较, 探讨了各种方法的优缺点, 同时根据 RNA 的用途及不同的标本来源, 推荐了提取 RNA 的最佳选择方法。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

酸性/硫氰酸胍裂解液 4mmol/L 硫氰酸胍, 25mmol/L 枸橼酸钠, pH7.0, 加热至 65℃, 加入 0.1% Sarkosyl, 用 0.45μ 滤膜过滤, 使用前加 0.1mmol/L β-巯基乙醇(β-ME)。

氯化锂/硫氰酸胍裂解液 5mmol/L 硫氰酸胍, 10mmol/L EDTA, 50mmol/L Tris·HCl, pH7.5, 8% β-ME(用前加)。

氯化铯/硫氰酸胍裂解液 4mmol/L 硫氰胍, 20mmol/L 乙酸钠, pH5.2, 0.1mmol/L DTT, 0.5% Sarkosyl。

DEPC-H₂O 0.1% 焦碳酸二乙酯(DEPC)的去离子水轻摇过夜, 15 磅 20 分钟灭菌。

水饱和酚 重蒸酚加 0.1% δ-羟基喹啉, DEPC-H₂O 饱和和 3-4 次。

RNA 提取酚 1mmol/L EDTA, 50mmol/L Tris · HCl, pH7.0, 饱和重蒸酚 3-4 次。

RNA 溶解液 1mmol/L EDTA, 10mmol/L Tris · HCl, pH7.5, 0.1% Sarkosyl。

10 × MOPS 0.2mmol/L MOPS, 0.05mmol/L 乙酸钠, 10mmol/L EDTA。

RNA 提取过程中所有试剂除含 Tris · HCl 的试剂外, 其余均用 0.1% DEPC 处理。玻璃器皿于 160℃ 干热 6 小时灭菌。塑料离心管、吸头于氯仿中浸泡过夜, 次日用 0.1% DEPC-H₂O 冲洗, 室温静置 30 分钟后, 15 磅 20 分钟高压灭菌。

1.2 实验方法

1.2.1 标本的预处理

1.2.1.1 培养细胞 对于悬浮生长的细胞(包括酵母), 300 × g 离心收集, 冷 PBS 冲洗后加硫氰酸胍溶液, 用 Teflon 玻璃匀浆器匀浆, 或用 20 G 针头的注射器反复抽打 4-5 次; 对于贴壁生长的细胞弃去培养上清, PBS 冲洗 3 遍, 直接在培养瓶或培养皿中加入硫氰酸胍裂解液, 用橡皮刮刮取细胞裂解液, 转入匀浆器匀浆。

1.2.1.2 组织块 对大多数的组织标本, 应在离体后尽可能快地放入液氮中冻存(10 分钟以内)。用组织粉碎器或研磨器 (-70℃ 预冷) 在冷冻状态下粉碎并研磨至粉末, 再转入预冷的离心管, 加入不含 Sarkosyl 的硫氰酸胍溶液, 高速匀浆 3 次, 每次 5-10 秒, 然后 65℃ 水浴, 加入 0.1% Sarkosyl 与 β-ME 混合; 如要提取脏器中某种细胞的 RNA, 首先须分离目的细胞。本文以提取脾淋巴细胞的总 RNA 为例: 获取新鲜脾脏, PBS 冲洗后置于无菌的细胞分离网上, 滴加红细胞溶胀液, 同时轻轻研磨组织, 收集细胞悬液。以下步骤同上。该方法适于 RNase 富集的组织, 如脾、胰腺等。

1.2.2 总 RNA 的提取

1.2.2.1 酸性硫氰酸胍法(一步法)⁽³⁾

1.2.2.2 氯化锂硫氰酸胍法⁽¹⁾

1.2.2.3 氯化铯硫氰酸胍法⁽²⁾

3 种方法的简要流程如图 1 所示。

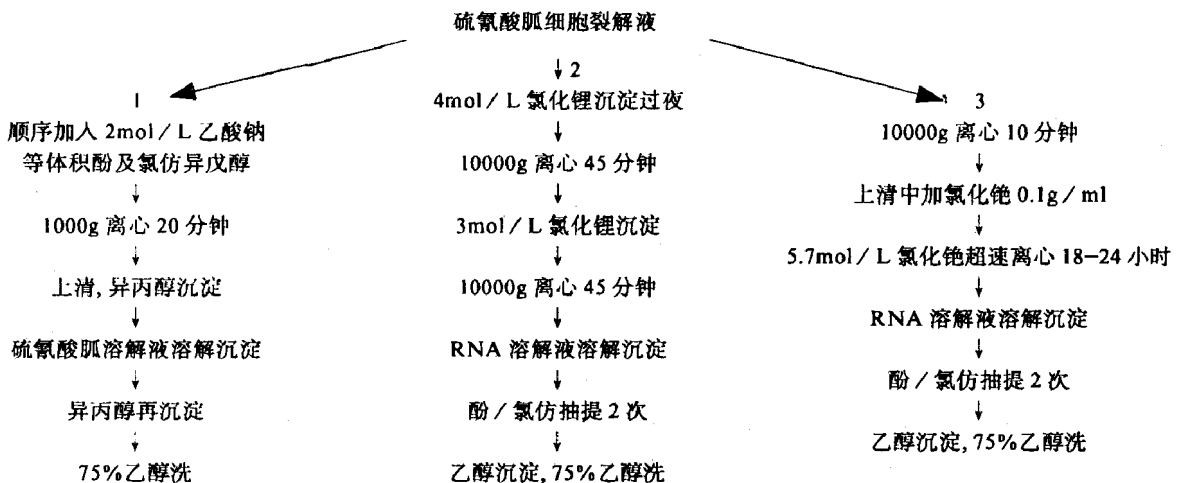


图 1 提取总 RNA 3 种方法的简要流程图

1.2.3 Poly(A)⁺RNA 分离⁽⁵⁾

1.2.4 变性凝胶电泳分析总 RNA

1.2.4.1 甲醛琼脂糖变性凝胶电泳⁽⁴⁾1.2.4.2 聚丙烯酰胺变性凝胶电泳分析小分子 RNA⁽¹⁾1.2.5 cDNA 合成及 cDNA 产量测定⁽⁵⁾

RNA 溶于 DEPC-H₂O, -70℃ 保存; 或用 2 倍乙醇沉淀, -70℃ 保存。

2 结果与讨论

高质量的总 RNA 在甲醛琼脂糖凝胶电泳上可见典型的二条带: 18S 与 28S, 其中 28S 是 18S 的二倍。图 2 说明 3 种方法均能获得完整的 RNA 分子。聚丙烯酰胺变性凝胶电泳主要用于分析小分子 RNA, 图 3 显示: 酸性硫氰酸胍与氯化铯/硫氰酸胍法提取的 RNA 小分子较全而且量较大, 而氯化锂/硫氰酸胍法提取的 RNA 小分子(< 500bp)包括 5S、5.8S 及 Sn RNA 易于丢失。

在 RNA 提取过程中, 由于组织标本成分多, RNase 活性相对较高, 因此, 标本预处理的好坏直接影响着 RNA 的产量与质量(见表 1)。

表 1 各种不同来源标本的 RNA 产量*

标本	预处理情况	提取方法	总 RNA 产量(μg / g 组织)	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀
小鼠肝脏	离体后 2hr 未冷冻 冷冻, 匀浆	LiCl	580	1.87
		LiCl	720	1.98
		LiCl	1020(1000-2000)	1.85-2.0
小鼠脾脏	同上	一步法	564(500-800)	1.75-1.85
乳腺组织	同上	一步法	1080(1000-1500)	1.75-1.80
胃瘤组织	同上	一步法	1135(1000-1500)	1.75-1.80
COS 细胞	同上	一步法	500 / 10 ⁸ cell	1.82
NIH3T3	同上	一步法	770 / 10 ⁸ cell	1.83
酵母细胞	同上	一步法	450 / 10 ⁸ cell	1.78

* 提取过程受多种因素影响, 此数据仅供参考。

表 2 3 种硫氰酸胍提取 RNA 方法的比较¹⁾

方法	标本	总 RNA 产量 μg ²⁾ 每克组织	10 ⁸ 细胞	Poly(A) ⁺ 产量 μg	% ³⁾	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	RNA 活性 ⁴⁾ μg / 10μg Poly(A) ⁺	cDNA 产量
一步法	803 细胞		876	15.8	1.8	1.89	4.08	
	肝组织	1860		22.3	1.2	1.75	—	
CsCl	803 细胞		559	11.2	2.0	1.78	3.80	
	肝组织	960		16.3	1.7	1.80	—	
LiCl	803 细胞		600	13.8	2.3	2.0	4.44	
	肝组织	1020		23.56	2.3	1.86	—	

1) 本实验重复 3 次, 结果基本相同, 本表所列为其中一次结果; 2) RNA 产量 = A_{260nm} × 40 μg / ml; 3) Poly(A)⁺ 占总 RNA 的百分比; 4) 以 α-³²P-dCTP 的掺入率计算 cDNA 产量^(1,2)。

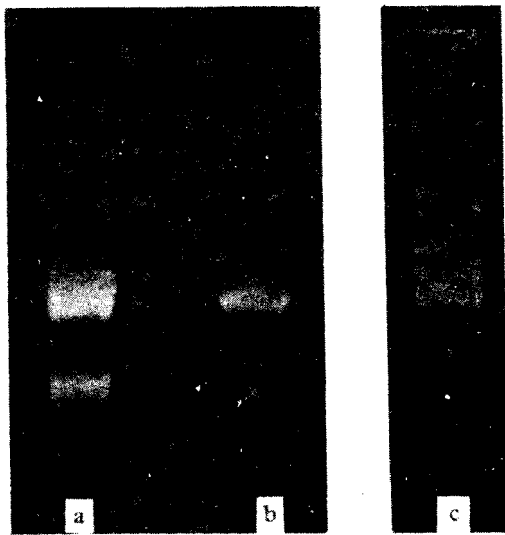


图2 甲醛琼脂糖凝胶电泳分析总 RNA
a.酸性/硫氰酸胍法; b. 氯化锂/硫氰酸胍法;
c. 氯化铯/硫氰酸胍法。

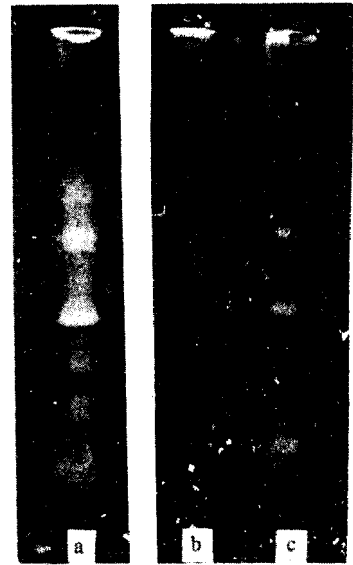


图3 聚丙烯酰胺变性凝胶电泳分析总 RNA
a.酸性/硫氰酸胍法; b. 氯化锂/硫氰酸胍法;
c. 氯化铯/硫氰酸胍法。

对于不同的标本及 RNA 提取后不同的用途,选择合适的提取方法十分重要。本文以细胞和组织二种材料比较了 3 种 RNA 提取方法的优劣(见表 2)。实验证明:酸性/硫氰酸胍法操作简便,用时短且总 RNA 产量大,适于从多个样品中同时制备总 RNA;另外,还可用于微量组织或细胞(10mg 组织, 10^6 细胞)的总 RNA 制备,主要应用于 Northern Blot, 基因克隆及有限生物标本的基因表达研究。氯化锂/硫氰酸胍法提取的 RNA, 蛋白含量低, Poly(A)⁺RNA 中所占比例较大, 逆转录活性也相对较高, 且没有小分子 RNA (<300bp), 故适于构建 cDNA 文库, 但不适于小片段基因的克隆 (<500bp)。该方法在提取富含糖原的组织标本时(如肝脏), 优点更为突出, 在制备大质量标本 (>5g 组织) 时, 比其余二种方法更为优越。氯化铯/硫氰酸胍是经典的 RNA 提取法, 由于其设备要求高, 并且在 RNA 制品中盐含量大, 故在大多数实验室已被前二种所取代。但该方法可从一份标本中同时制备 RNA 与 DNA。

总之, 本文从不同侧面比较了 3 种 RNA 提取法, 并介绍了 3 种方法的不同用途, 适用于 Northern 印迹、逆转录 PCR、cDNA 文库及体外翻译等实验。

参考文献

- (1) Cathala G, 1983. DNA, 2(4): 329-335.
- (2) Chirgwin J M, 1979. Biochemistry, 18: 5294-5299.
- (3) Chomzynski P, 1987. Analytical Biochemistry, 162: 156-159.
- (4) Leonard G O, 1986. In: Basic Methods in Molecular Biology, Sec II, Elsevier Press, pp. 143-145.
- (5) Sambrook J, 1989. In: Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor Press, pp. 7-8.

本文于 1992 年 2 月 15 日收到。