

## 富含RNA酶组织总RNA提取方法的改良

张传仓, 刘卫鹏, 朱德新, 杜江, 封志纯

张传仓, 刘卫鹏, 朱德新, 杜江, 封志纯, 南方医科大学珠江医院儿科  
广东省广州市 510282

通讯作者: 封志纯, 510282, 广东省广州市工业大道中253号, 南方医科大学珠江医院儿科. zhifengztc2000@yahoo.com.cn

电话: 020-61643369 传真: 020-61643369

收稿日期: 2005-01-29 接受日期: 2005-03-03

### 摘要

**目的:** 简化富含RNA酶组织RNA的抽提方法。

**方法:** 健康SD大鼠10只, 随机分成液氮组及改良组, 每组5只, 用乙醚麻醉后, 分别取胰腺组织约50 mg, 液氮组组织迅速放入液氮中, 改良组组织放入一预装RNAguard 100  $\mu$ L的1.5 mL EP管中, 放入-70°C冰箱保存。液氮组将胰腺组织从液氮中取出, 立即放入预装适量液氮的研钵中迅速研磨至粉末(研磨过程中始终保持研钵内有适量液氮), 移入另一1.5 mL EP管中, 加入1 mL Trizol, 按Trizol法提取总RNA;改良组取眼科剪在酒精灯上消毒后冷却, 从-70°C冰箱中取出冻存的组织, 在冰盒上, 加入1 mL Trizol, 用眼科剪迅速剪切3 min(剪切过程组织不解冻), 剧烈振荡混匀30 s, 以后步骤按Trizol法。

**结果:** 改良法抽提RNA的效果与液氮研磨法无显著差异( $P>0.05$ ), 但方法简单方便。

**结论:** 改良法提取RNA简单方便, 结果稳定, 值得推广应用。

张传仓, 刘卫鹏, 朱德新, 杜江, 封志纯. 富含RNA酶组织总RNA提取方法的改良. 世界华人消化杂志 2005;13(7):797-799  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/797.asp>

### 0 引言

RNA的提取是分子生物学中最常用到的基础操作之一, 但由于mRNA分子的结构特点, 容易受RNA酶的攻击反应而降解, 加上RNA酶极为稳定且广泛存在, 因此, 如何抑制RNA酶的活性, 成为RNA提取过程中的关键。常规的组织或细胞RNA提取方法, 对提取RNA的环境、使用的物品等提出了较高的要求, 以避免外源性的RNA酶的污染, 但是在肝脏、胰腺、心肌等内脏组织中, 由于含有大量内源性的RNA酶, 常规的方法根本无法完全抑制其活性, 常常在组织匀浆的过程中, RNA即完全降解。液氮研磨法的出现, 使这一问题得以解决。但是, 该法操作非常复杂, 我们对该方法进行了改良, 大大简化了操作程序。现介绍如下:

### 1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠10只, 雌雄不拘, 体重150-200 g,

购自南方医科大学实验动物中心, Trizol(申能博彩生物科技有限公司), 氯仿/异丙醇(24/1)(申能博彩生物科技有限公司), 焦碳酸二乙酯(DEPC, Sigma), 75%酒精(DEPC处理), RNAguard(上海华舜生物工程有限公司),  $\beta$ -actin引物(北京赛百盛公司合成), DNA Marker(Promega), RT-PCR试剂盒(GIBCO), 液氮, 3-(N-玛琳代)丙磺酸(Sigma), 琼脂糖, UV-9100紫外分光光度仪、电热干燥箱、低温离心机、-70°C冰箱、电泳仪、电子天平、研钵、冰盒(300 mL/L的乙醇溶液放入-70°C冰箱)。

1.2 方法 SD大鼠10只随机分成两组(液氮组及改良组), 每组5只, 用乙醚麻醉后, 于胰腺的同一部位(胰头)分别取组织约50 mg, 液氮组组织迅速放入液氮中, 改良组组织放入一预装RNAguard 100  $\mu$ L的1.5 mL EP管中, 放入-70°C冰箱保存。

1.2.1 液氮法RNA提取程序 将胰腺标本从液氮中取出, 立即放入预装适量液氮的研钵中迅速研磨至粉末(研磨过程中始终保持研钵内有适量液氮), 移入一1.5 mL EP管中, 加入1 mL Trizol, 剧烈振荡混匀30 s;加入200  $\mu$ L氯仿/异戊醇(24/1), 剧烈振荡混匀15 s;12 000 g室温离心15 min;上清转入另一1.5 mL EP管中, 加入等体积异丙醇, 颠倒混匀, 室温下放置5 min, 12 000 g离心5 min;小心倒去上清, 防止沉淀丢失, 加入700  $\mu$ L 75%乙醇, 颠倒混匀, 7 500 g离心5 min, 弃上清;重复洗涤一次;在滤纸上沾干残留部分, 室温晾干10 min, 加100  $\mu$ L无RNA酶水溶解。取10  $\mu$ L用无RNA酶水稀释后测 $A_{260}$ 及 $A_{280}$ , 做RNA琼脂糖变性胶电泳及 $\beta$ -actin RT-PCR。

1.2.2 改良法RNA提取程序 眼科剪在酒精灯上消毒后冷却, 从-70°C冰箱中取出冻存的组织, 放在冰盒中, 加入1 mL Trizol, 用眼科剪迅速剪切3 min(剪切过程组织不解冻), 剧烈振荡混匀30 s;加入200  $\mu$ L氯仿/异戊醇(24/1), 以后步骤同液氮法。

#### 1.2.3 RT-PCR

1.2.3.1 大鼠 $\beta$ -actin引物序列<sup>[1]</sup>(上游:5' -CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC-3';下游:5' -TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3';PCR产物长度为240 bp)。

1.2.3.2 cDNA第一链的合成 取一0.5 mL EP管, 依次加入下列组分:总RNA 1ng-5  $\mu$ g、下游引物(10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L、10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L、无菌双蒸水补至12  $\mu$ L, 加热到65°C 5 min, 冰浴1 min, 短暂离心;加入下列组分:5  $\times$  First-Strand Buffer 4  $\mu$ L、0.1 mmol/L DTT 2  $\mu$ L、RNA inhibitor(40 kU/L)

1  $\mu\text{L}$ , 轻轻混合以上组分, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 min. 加入 M-MLV RT 1  $\mu\text{L}$ , 用移液管轻轻吹打混匀, 达总体积 20  $\mu\text{L}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 50 min, 继加热到 70 $^{\circ}\text{C}$  15 min 终止反应.

1.2.3.3 PCR 反应 取一 0.5 mL EP 管, 依次加入下列组分: 10 $\times$  PCR Buffer 2  $\mu\text{L}$ 、10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu\text{L}$ 、上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ 、cDNA 1  $\mu\text{L}$ 、无菌双蒸水 15  $\mu\text{L}$ 、Pfu DNA Polymerase 0.5  $\mu\text{L}$ , 总体积 20  $\mu\text{L}$ , 混匀后短暂离心. 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$  3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min. 取 PCR 产物 5  $\mu\text{L}$  在 14 g/L 的琼脂糖凝胶(含溴化乙锭 1 mg/L) 上电泳.

**统计学处理** 两种方法提取的 RNA 量( $\mu\text{g}$ )、 $A_{260}/A_{280}$  比值及 RNA 琼脂糖变性胶电泳 28S/18S 比值的比较采用 SPSS11.5 统计软件进行  $t$  检验.

## 2 结果

2.1 两种方法提取的 RNA 量( $\mu\text{g}$ )、 $A_{260}/A_{280}$  比值及 RNA 琼脂糖变性胶电泳 28S/18S 比值比较(表 1): 改良法提取的 RNA 量略少于液氮法, 但未见统计学差异( $P = 0.617$ ),  $A_{260}/A_{280}$  ( $P = 0.622$ ) 及 28S/18S ( $P = 0.614$ ) 比值亦未见显著差异.

表 1 两种方法提取的 RNA 量

样品	RNA量( $\mu\text{g}$ )		$A_{260}/A_{280}$ 比值		28S/18S	
	液氮组	改良组	液氮组	改良组	液氮组	改良组
1	76.5	87.6	1.85	1.76	1.84	1.96
2	121.0	134.5	1.79	1.97	1.98	1.89
3	154.3	127.2	1.96	1.88	1.56	1.75
4	106.7	94.0	2.04	1.82	1.66	1.69
5	95.5	62.1	1.89	1.95	1.89	1.88
均数	110.8	101.1	1.91	1.88	1.79	1.83
$t$ 值	0.521		0.512		0.525	
$P$ 值	0.617		0.622		0.614	

2.2 RNA 琼脂糖变性胶电泳(图 1) 及大鼠  $\beta$ -actin RT-PCR 产物琼脂糖电泳结果(图 2) 两种方法提取的总 RNA 变性胶电泳时, 均可见清晰的 28S 及 18S 条带; 大鼠  $\beta$ -actin RT-PCR 产物电泳结果, 均有清晰的  $\beta$ -actin(约 240 bp) 条带, 未见非特异性产物.

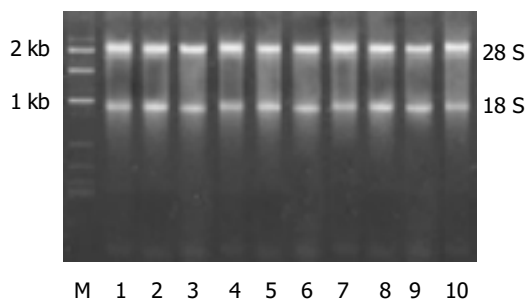


图 1 RNA 琼脂糖变性胶电泳. M: DNA Marker; 1-5: 液氮组; 6-10: 改良组.

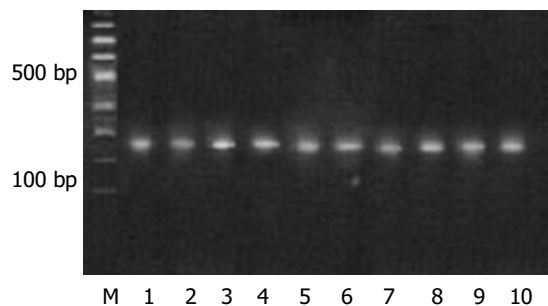


图 2  $\beta$ -actin RT-PCR 产物琼脂糖电泳. M: DNA Marker; 1-5: 液氮组; 6-10: 改良组.

## 3 讨论

对大部分研究者来说, RNA 抽提比基因组 DNA 抽提要困难得多. 事实上, 现有的 RNA 抽提方法, 如果用于从培养细胞中抽提 RNA, 比抽提基因组 DNA 更方便, 成功率也更高. 但用于组织 RNA 的抽提, 困难就比较大.

组织 RNA 抽提失败最常见的原因有两个: RNA 降解和组织内杂质的残留, 而前者则是重中之重. 现有的 RNA 抽提试剂, 都含有快速抑制 RNA 酶的成分. 在培养细胞中加入裂解液, 简单的振荡, 即可使所有的细胞与裂解液充分混匀, 细胞被彻底裂解. 细胞被裂解后, 裂解液中的有效成分立即抑制住细胞内的 RNA 酶, 所以 RNA 得以保持完整<sup>[2-4]</sup>. 而组织中的细胞不容易迅速与裂解液充分接触, RNA 酶的活性也就无法得到迅速充分的抑制. 因此, 如果在抑制 RNA 活性的同时使组织充分裂解, 降解问题也就可以彻底解决了. 液氮碾磨法<sup>[5]</sup> 的出现, 从根本上解决了这一问题. 组织在液氮中研磨的过程中, RNA 酶在低温环境中被完全抑制. 但是, 液氮碾磨方法非常麻烦, 特别是碰到样品数比较多的时候更是如此. 研究者不仅要把庞大的研钵进行高温处理, 以灭活 RNA 酶, 还要不厌其烦地取用液氮, 一不小心就可能面临被液氮冻伤的危险, 而且, 一旦液氮添加不及时, 组织就会化冻, 导致 RNA 提取失败. 有人采用电动匀浆器的方法<sup>[6-7]</sup>, 期望利用其破碎组织的速度将组织在 RNA 被大量降解前被匀浆, 但匀浆器方法并不能杜绝降解现象, 而且, 很重要的一点, 必须有电动匀浆器.

面对以上问题, 我们在实验过程中, 对富含 RNA 酶组织总 RNA 抽提的方法进行了改良. 首先, 我们找到了一种保存组织的有效试剂—RNAGuard. RNAGuard 是一种组织内源核酸酶的抑制剂, 能快速抑制样品中的内源核酸酶活性, 确保动物组织/细胞中的 RNA 在 37 $^{\circ}\text{C}$  1 d 不降解, 25 $^{\circ}\text{C}$  1 wk 不降解, 4 $^{\circ}\text{C}$  1 mo 不降解, -20 $^{\circ}\text{C}$  1 a 以上不降解. RNAGuard 适用的样品包括: 动物组织, 培养细胞, 昆虫, 及部分植物组织. 经过 RNAGuard 处理的样品可以用几乎所有常用的 RNA 方法/试剂抽提 RNA, 所有的操作与用新鲜组织没有什么不同(见 RNAGuard 试剂说明书). 我们将组织取出后, 浸泡在适量 RNAGuard 中, 并迅速在 -70 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中冻存, 基本上保证了组织内 RNA 不被降解, 以后随便什么时候做都可以, 非常方便. 而且, RNAGuard 非常便宜. 对于每个样品, RNAGuard 的用量