

从鱼类胚胎分离总 RNA 的新方法*

A NEW METHOD FOR ISOLATION OF TOTAL RNA FROM FISH EMBRYO

张均顺 徐永立 张培军

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

众所周知,提取高纯度和完整的 RNA 是开展鱼类胚胎发育分子生物学的前提。据 Sambrook, J. 等 1989 年, Chomczynski, P. 等 1987 年报道,分离动物细胞质的总 RNA 主要是在强变性试剂,如:盐酸胍、异硫氰酸胍,或在含有蛋白酶 K 的缓冲溶液中,通过匀浆细胞来分离和提取细胞质的总 RNA。用这类方法提取的总 RNA 往往受少量 DNA 的污染,可能在构建 cDNA 文库和反转录聚合酶链式反应中引起混乱。用无 RNA 酶的 DNA 酶处理提取的总 RNA 也不是十分理想的方法,为克服以上方法的缺陷,本文在已有的鱼类胚胎总 RNA 提取方法的基础上,设计了一种从鱼类胚胎分离总 RNA 的新方法。

1 材料与方 法

将牙鲆受精卵置于培养皿中,用过滤海水轻轻将卵子洗净,然后将卵转移到有过滤海水的培养皿中,在室温条件使其发育,定期用解剖显微镜观测。分别收集原肠期和尾动期的胚胎 50~70 个于 1.5 ml 离心管中,吸干胚胎周围的海水,用 0.3% NaCl 水溶液洗涤一次后,放于 -70 °C 低温冰箱备用。

实验时,将胚胎样品离心管置于手心融化,加入 500 μ l 裂解缓冲液(10 mmol/L Tris. HCl pH7.6, 10 mmol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA pH8.0), 55 μ l 10% SDS 和 5.5 μ l 20 mg/ml 蛋白酶 K, SDS 的终浓度为 1.0%, 蛋白酶 K 终浓度为 250 μ g/ml, 在 55 °C 水浴中不断摇动,至胚胎膜破裂为止,时间大约为 60 min。再加入等体积水饱和苯酚/氯仿,剧烈振荡 1 min,室温下, 8 700 r/min 离心 10 min,收集上清液,重复苯酚/氯仿抽提步骤一次,将上清液转移到 1.5 ml 离心管中,加入 0.1 倍体积的 3 mol/L 乙酸钠(pH5.2)和 2.5 倍体积的无水乙醇混匀后, -20 °C 冰箱放置 2 h。于 4 °C, 8 700 r/min 离心 15 min,小心弃去上清液,于室温空气干燥沉淀的核酸,用 200 μ l 焦碳酸二乙酯处理的水溶解核酸。加入等体积的 8 mol/L 氯化锂,混匀, -20 °C 放置 4 h。于 4 °C, 以 12 300 r/min 离心

30 min,沉淀 RNA,小心弃去上清液。用 4 °C, 70% 冷乙醇洗涤沉淀, 13 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,空气中干燥沉淀 RNA 10 min。用 20 μ l 焦碳酸二乙酯处理的水溶解 RNA 沉淀。

2 结果与讨论

在 260 nm 和 280 nm 波长下,用紫外分光光度计测定本方法提取的原肠期和尾动期胚胎细胞质 RNA 的吸光度,可以获得以下结果,原肠期和尾动期细胞质 RNA 的吸光度比率 $A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}$ 分别在 1.98~1.99 和 1.93~1.95 之间,同时 RNA 的产量分别为 $3.9 \pm 0.4 \mu\text{g}$ 和 $5.0 \pm 0.5 \mu\text{g}$ 。而 P. Chomczynski 等报道的方法提取的细胞质 RNA 在 260 nm 和 280 nm 吸光度比率为 1.85 ± 0.04 。由此比较,本方法获得的 RNA 纯度更高。RNA 极易降解,为防止 RNA 被污染的 RNA 酶的降解,提取 RNA 的试剂用焦磷酸二乙酯处理是重要的前提,减少 RNA 提取的操作步骤也可以减少受 RNA 酶污染的机会。本文提出的方法,在胚胎裂解缓冲液中使用蛋白酶 K,在 55 °C 水浴条件下裂解胚胎,不仅可以减少匀浆器可能直接带来的 RNA 酶污染,而且胚胎膜裂解后,立即用水饱和苯酚和氯仿抽提,将使细胞核和蛋白质等直接转入有机相,从而防止了基因组 DNA 对总 RNA 的污染。

Mg^{2+} 对核酸酶的活性是必不可少的二价金属离子,本文的裂解液使用了高浓度络合剂 EDTA,其目的是络合胚胎裂解液中的 Mg^{2+} 和二价金属离子,达到抑制核酸酶活性的目的。利用青鳉孵化酶 cDNA 序列设计的引物,进行牙鲆孵化酶 RT-PCR 扩增,其反应的底物为本文的新方法提取的总 RNA。从 RT-PCR 扩增的产物电泳(图 1),可以清楚看到孵化酶基因片段的存在。

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3697 号。

收稿日期:1998-10-29;修回日期:1999-03-08

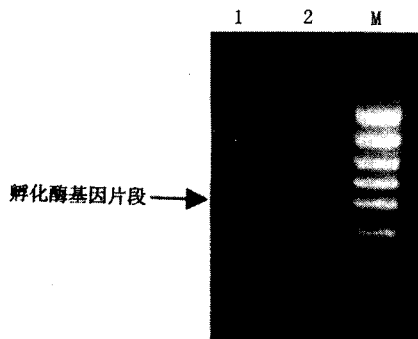


图1 原肠期、尾动期牙鲆胚胎孵化酶基因的表达
M为核酸分子量标准;1为原肠期;2为尾动期

本结果表明,该总 RNA 可用于 PCR 扩增,另一

方面,作者认为提取的鱼类胚胎总 RNA 不受细胞核 DNA 的污染。这是因为没有沿用对胚胎进行机械匀浆,改用在高浓度的 EDTA 条件下,用蛋白酶 K 破膜,当膜恰好破裂时,立即用水饱和苯酚抽提,此时细胞核应该比较完整的。水饱和苯酚抽提能将其完全移到有机相中,而水相中的 RNA 则免受基因组 DNA 的污染。

3 结语

本文提出了一种简便、经济和快速的鱼类胚胎总 RNA 提取方法,获得的总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 紫外吸光度比值为 1.93~1.99 之间,表明 RNA 纯度高。RT-PCR 反应显示,提取的总 RNA 能用于 RT-PCR 表达的研究。