

同时测定牙鲆肌肉中 DNA 和 RNA 的简便方法*

A SIMPLE METHOD DETERMINING DNA AND RNA CONTENT IN FLOUNDER MUSCLE

刘宗柱^{1,2} 徐永立¹ 锁宋丽² 张培军¹

(¹ 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(² 莱阳农学院 265200)

组织细胞中 DNA 的含量是基本恒定的,但 RNA 含量则随细胞中蛋白质代谢水平的不同发生很大变异,进一步的研究证实,RNA/DNA 比值与鱼类体重及体长增长速率相关,因而在研究鱼类的生长时,一般要考察其组织中 RNA 含量及 RNA/DNA 比值的变化,作为反映其蛋白质代谢及生长速率的生化指标。

本文建立了一种可同时测定样品中 DNA 及 RNA 的简便方法。

1 材料与方法

1.1 仪器

小型离心机、消化炉、水浴锅、722-型光栅分光光度计等。

1.2 肌肉中 DNA 和 RNA 的抽提

1.2.1 精确称取 0.1 g 左右冰冻保存的肌肉样品,较碎,加入 0.5 ml 10 mmol/L EDTA(pH 8.0)、0.5 %SDS 于冰水浴中匀浆 2 min,以分散并破碎细胞。

1.2.2 加入 0.5 ml 100 mmol/L 乙酸钠 (pH 5.2)、10 mmol/L EDTA(pH 8.0),混匀后移入 5 ml 带

盖塑料离心管中。

1.2.3 加 2 ml 用 Tris-HCl 平衡的苯酚 (pH 8.0),于室温振荡 2 min,使之与细胞裂解物混匀,细胞 DNA 形成白色丝状沉淀。

1.2.4 于 4 ℃ 以 7 000 r/min 离心 15 min 分相,两相之间可见致密的 DNA 沉淀层。

1.2.5 用吸管将上层水相 (RNA 溶液) 移至另一个装有 1 ml 氯仿:异戊醇 (24:1) 的离心管中,振荡 5 min 后于 4 ℃ 以 7 000 r/min 离心 15 min 分相。

1.2.6 将上层水相移至另一个装有 110 μl 预冷的 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 和 45 μl 5 mol NaCl 的离心管中。

1.2.7 加 2 倍体积冰冷的乙醇,混匀,于 -20 ℃ 放置至少 30 min。

* 国家科委“九五”攻关项目 96-C01-05-04 号;中国科学院海洋研究所开放研究实验室调查研究报告第 195 号;中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3493 号。

收稿日期:1998-08-17;修回日期:1998-10-26

1.2.8 于4℃以10 000 r/min离心15 min沉淀RNA,弃去乙醇,倒置离心管于洁净的吸水纸上,使残留的乙醇挥发。

1.2.9 小心挑出步骤1.2.4中DNA沉淀层,移入另一个装有1 ml TE(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)的离心管中溶解沉淀,加入1 ml 氯仿:异戊醇(24:1),振荡5 min以去除蛋白,于4℃以7 000 r/min离心15 min,之后按1.2.6~1.2.8操作,得到DNA沉淀。

1.3 DNA及RNA的定量测定

1.3.1 消化 DNA或RNA沉淀溶于500 μl TE中,移入凯氏烧瓶,加1 ml浓H₂SO₄及1~2滴30%过氧化氢,于通风橱中加热消化,消化至澄清后冷却,以6 mol/L NaOH中和过量的H₂SO₄(约需2~3 ml),并定容至50 ml。

1.3.2 标准曲线的绘制及样品测定 (1)定磷试剂:17% H₂SO₄:25%钼酸铵:10%抗坏血酸:蒸馏水=1:1:1:2。(2)标准磷溶液:准确称取0.8775 g烘至恒重的磷酸二氢钾(AR)溶于少量重蒸水中,加入5 ml 27% H₂SO₄和数滴氯仿,定溶至500 ml,临用时准确稀释20倍(含磷量20 μg/ml)。按表1顺序操作,混匀,置45℃水浴保温10 min,保温结束后流水冷却,用722型光栅分光光度计测定各管660 nm处的光密度(OD₆₆₀),绘制标准曲线,并求出回归公式,计算样品管含磷量。

RNA含量为:含磷量×10.5, DNA含量为:含磷量×10.1。之后再根据样品稀释倍数换算出每100 mg样品中DNA及RNA的含量。

表1 标准磷溶液及样品测定

管号	标准磷溶液 (ml)	样品液 (ml)	重蒸水 (ml)	定磷试剂 (ml)
0	0	0	3.0	3.0
1	0.1	0	2.9	3.0
2	0.2	0	2.8	3.0
3	0.3	0	2.7	3.0
4	0.4	0	2.6	3.0
5	0.5	0	2.5	3.0
6	0.6	0	2.4	3.0
7	0.7	0	2.3	3.0
样品管	0	3.0	0	3.0

注:加液顺序为:标准磷溶液→样品液→重蒸水→定磷试剂。

2 结果

提取过程结束时得到的两种沉淀,用考马氏亮蓝染色液(蛋白质染料)实验呈阴性反应,溶于TE后经波长扫描分析,得到两种不同的光谱吸收曲线(图1、图2);固定波长紫外吸收测定结果,其中DNA样品的OD₂₆₀/OD₂₈₀为1.875, RNA样品的OD₂₆₀/OD₂₈₀为

2.162。

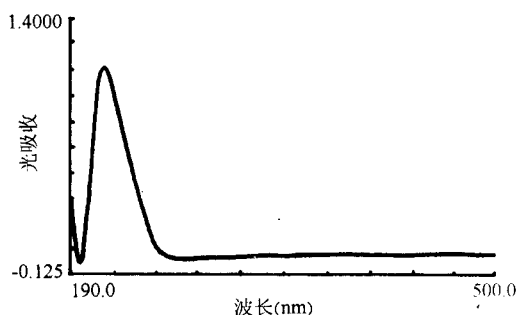


图1 DNA样品扫描图谱

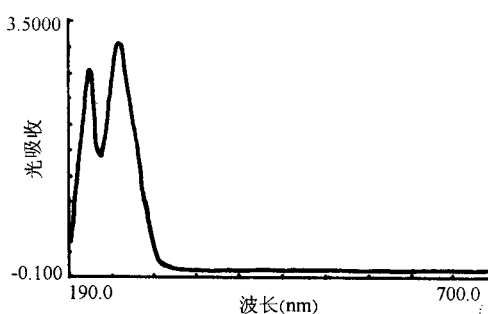


图2 RNA样品扫描图谱

图3为定磷法测定核酸浓度的标准曲线,回归方程为: $Y=6.513X$, $r=0.986$ 。该曲线最低检出浓度为0.06 μg/ml,本次实验测定批内误差为3.9%,批间误差为7.8%。

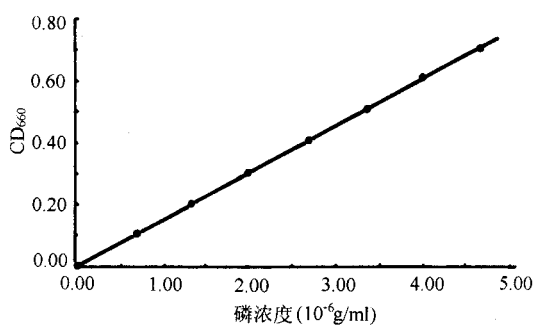


图3 定磷标准曲线

用酵母RNA及鱼精DNA所做的回收实验结果, RNA回收率为89.5%~95.8%, DNA回收率为

97.6%~99.2%。采用此方法测定正常牙鲆鱼肌肉组织中 DNA 含量为 $117.89 \pm 92 \times 10^{-6}$, RNA 含量为 $447.96 \pm 43.29 \times 10^{-6}$, RNA/DNA 比值为 3.80 ± 0.04 。

3 讨论

鱼类组织中 RNA 和 DNA 的定量测定方法目前尚无标准的程序。最早的方法是由 Munro 和 Fleck 1966 年建立并由 Buckley 1979 年修订的,基本过程是先从组织中抽提并纯化 RNA 和 DNA,然后测定其 260 nm 处的紫外吸收,这种方法要求每个样品中核酸含量在 800 μg 以上,并且用紫外吸收定量影响因素较多,精确度不高;Lepecq 和 Paoletti 1966 年建立了测定微量核酸的方法,之后经许多研究者修订,这种方法省去核酸纯化步骤,直接在组织匀浆中加入核酸染料溴乙锭,根据核酸与溴乙锭结合后的荧光强度来定量,其中 RNA 的量以加入 RNA 酶后荧光强度的降低来测定。这种测定方法的缺点在于其他物质可能影响组织匀浆的荧光强度,其次 RNA 酶的活性降低,则可能使 DNA 的测定值偏高,另一方面,溴乙锭是强烈的致癌剂,实验操作不方便。Clemmesen 1988 年对上述方法做了进一步修订,先抽提出核酸混和物,充分冲洗后加入溴乙锭测定核酸浓度,平行样品中加入对 DNA 特异染色特殊荧光染料 bisbenzimidazole 以测定 DNA 浓度。但这种测定方法亦不能避免有强烈的致癌作用的核酸染料的使用。McGurk 和 Kusser 1992 年曾比较了上述 3 种典型方法,发现第二类方法误差较大,建议 RNA-DNA 的测定应在分离纯化后进行。作者在实验中参照分子生物学技术中有关方法^[1,3],简化了组织中 RNA 和 DNA 的分离纯化步骤,将肌肉组织匀浆分散裂解细胞后,加入用水平衡的酚,使细胞中 DNA 形成丝状沉淀,经离心分相后, RNA 溶于水相中, DNA 则形成致密沉淀层于两相之间;分离的 RNA 及 DNA 再用氯仿抽提以去除可能残留的结合蛋白,经乙醇沉淀分别得到两种核酸制

品,紫外扫描及固定波长紫外吸收测定表明,所得到的两种核酸是比较纯的样品。

定磷法是比较精确的核酸定量方法,其原理是磷酸可与钼酸铵反应,生成黄色磷钼酸铵,当有还原剂存在时,进而转化为钼蓝(蓝色),一定浓度范围内,蓝色的深浅与磷酸含量成正比^[2]。实验中经抽提、沉淀,去除了样品中的无机磷, DNA, RNA 中的有机磷经强酸消化转化为无机磷,由于 DNA, RNA 中磷的含量是恒定的(分别为 9.9% 和 9.5%),故用测得的含磷量即可分别换算出 DNA, RNA 含量。与用苔黑酚法及二苯胺法分别测定 RNA 及 DNA 相比,这种方法所用试剂简单,只需绘制一条标准曲线,操作简便,干扰因素少。虽然样品需经消化过程,但比较起来还是简单易行的,分析小量样品(0.1 g 湿组织)时,消化可在硬质大试管中进行,消化完成后要用 NaOH 中和过量的 H_2SO_4 ,再定容至 50 ml(混和液可稍呈碱性,但不可过碱,要保证加入定磷试剂后呈酸性,否则影响测定结果)。

运用这种方法,本实验中测得鱼肌肉组织中 RNA 及 DNA 的数值范围与 Danzmann 等 1990 年及 McGurk 和 Kusser 1992 年运用其他方法的测定结果基本一致,说明新改进的这种简易方法与传统方法有很强的平行性,是比较准确可靠的。

本方法亦适用于鱼类其他组织中 DAN 和 RAN 的定量测定,其他动物软组织、植物体易碎组织及培养细胞中 DAN 和 RAN 的定量测定亦可参照本法进行。

参考文献

- 1 刘定干. 生命的化学, 1998, 18(2): 40~41
- 2 戴玉锦(主编). 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 1992. 356~358
- 3 Sambrook, J., Fritsch, E. F. & T. Maniatis. Molecular Cloning. A laboratory manual 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 345~348

