

高效快速提取股骨头中总RNA的方法***

柳 铭¹, 李章华¹, 陈 颖², 王 芳², 夏 伟², 陈友浩¹, 潘 峰¹

Efficient and quick method of extracting total RNA from the femoral head

Liu Ming¹, Li Zhang-hua¹, Chen Ying², Wang Fang², Xia Wei², Chen You-hao¹, Pan Feng¹

Abstract

BACKGROUND: There are no ideal methods to extract total RNA from bone tissues.

OBJECTIVE: To explore an efficient and quick method of acquiring total RNA from bone tissue.

METHODS: Ten healthy rabbits were divided into experimental group and control group on average. The femoral heads of experimental group were removed by rongeur which has been disinfected, then stored in liquid nitrogen after quick-freeze. Normal way was used to get control group's femoral heads. Experimental group's femoral head was immediately placed in mortar that has been precooled by liquid nitrogen. The bone was grinded iteratively in mortar until it became bone powder, the powder was transferred into a homogenizer which has been precooled, added Trizol, centrifuged at 4 °C after fully homogenized to get supernatant. Then chloroform and other organic solvents were added, centrifuged, and then the total RNA was separated from DNA, protein and other tissues. Control group's RNA was extracted by traditional Trizols method. The concentration, purity and productive rate were measured by ultraviolet spectrophotometer. Finally, denaturing agarose-formaldehyde gel electrophoresis was used to observe if the two bands (28 S, 18 S) of RNA were clear, RNA was degraded and with/without DNA contamination.

RESULTS AND CONCLUSION: The extracted RNA were in high purity without DNA and protein contamination; The result of degenerated formaldehyde electrophoresis shows that the 28 S and 18 S bands were clear and the ratio of them was about 1:1, which confirmed that RNA was complete with no degradation. The findings from the present study show that this method is a rapid and efficient purification method for gaining total RNA form bone tissue, and it can be used for analyzing molecular biology of bone tissue.

Liu M, Li ZH, Chen Y, Wang F, Xia W, Chen YH, Pan F. Efficient and quick method of extracting total RNA from the femoral head. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(20):3697-3700.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 从骨组织中有效提取总 RNA 是进行骨科相关实验的基础, 目前所知方法的提取效果不理想。

目的: 探寻一种高效、快速的骨组织总 RNA 提取方法。

方法: 取健康大耳白兔股骨头迅速置于用液氮预冷过的研钵中, 液氮中反复研磨至粉末状, 再将其移至预冷的匀浆器内, 加入 Trizol, 充分匀浆后 4 °C 离心, 取上清, 加入氯仿离心, 使 RNA 与细胞 DNA、蛋白质及其他成分分离从而得到总 RNA。另取兔股骨头, 按传统方法取材后保存, 无匀浆过程, 传统 Trizol 法提取总 RNA 作为对照。紫外分光光度计测定 RNA 样品浓度、纯度及产率。甲醛变性胶电泳观察 RNA 的 28 S, 18 S 条带是否清晰, 有无降解和 DNA 污染。

结果与结论: 实验方法提取的总 RNA 浓度在 0.80~0.90 g/L, A_{260}/A_{280} 在 1.90~2.00 之间, A_{260}/A_{230} 在 1.4~1.6 之间, 明显高于传统方法提取的 RNA 各指标, 说明实验方法提取的总 RNA 纯度高, 无 DNA、蛋白质污染。甲醛变性胶电泳可清晰显示 28 S, 18 S 两条带, 大体观察其比例大约为 1:1, 证实 RNA 提取完整, 没有降解。由此可见, 实验方法提取的骨组织总 RNA 质量高, 提取方法方便、快捷, 可用于骨组织分子生物学研究。

关键词: 股骨头; 抽提; 总 RNA; 方法; 组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.20.021

柳铭, 李章华, 陈颖, 王芳, 夏伟, 陈友浩, 潘峰. 高效快速提取股骨头中总 RNA 的方法[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(20):3697-3700. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

兔股骨头中RNA的提取是研究股骨头坏死过程中基因表达变化的基础, 只有获得高质量RNA才能较好地进行后续相关实验。由于股骨头中骨细胞含量较少, 本身组织又坚硬, 在提取过程中易造成RNA的丢失^[1], 故一直没有较好的总RNA提取方法。传统方法很少重视取材过程, 一般处死动物后再取骨, 取出后也没有迅速冷冻组织, 造成总RNA的损失^[2]。

实验以传统的Trizol法为基础, 针对骨组织

RNA提取的特殊性, 对一些提取过程进行改良, 探讨快速提取高纯度股骨头总RNA的方法。

1 材料和方法

设计: 多样本对照实验。

时间及地点: 于2010-07在解放军军事医学科学院完成。

材料:

实验动物: 清洁级12月龄大耳白兔10只, 雌雄不限, 体质量2.5~3.2 kg, 由解放军军事医学科学院动物实验中心提供, 合格证号: SCXK(京)

¹Department of Orthopaedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China; ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Basic Medical Science, Academy of Military Sciences, Beijing 100085, China

Liu Ming★, Studying for master's degree, Department of Orthopaedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
wang52736lm@163.com

Correspondence to: Li Zhang-hua, Doctor, Associate chief physician, Master's supervisor, Department of Orthopaedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
lzh99999@yaho.com.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30700854*, 81071463*; the Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2009CDB414*

Received: 2011-02-28
Accepted: 2011-03-26

¹ 武汉大学人民医院骨一科, 湖北省武汉市 430060;
² 解放军军事医学科学院基础医学研究所生物化学与分子生物学研究室, 北京市 100850

柳铭★, 男, 1986年生, 湖北省潜江市人, 汉族, 武汉大学在读硕士, 主要从事股骨头坏死过程中相关基因表达变化的研究。
wang52736lm@163.com

通讯作者: 李章华, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 武汉大学人民医院骨一科, 湖北省武汉市 430060
lzh999999@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)20-03697-04

收稿日期: 2011-02-28
修回日期: 2011-03-26
(20110228015/WLM-L)

2007-0003。动物单笼饲养, 自由饮水进食。

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
Trizol	Invitrogen, 美国
氯仿	北京化工厂, 中国
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司, 中国
DEPC 水	上海生工生物工程有限公司, 中国
体积分 75%乙醇(DEPC 水配制)	解放军军事医学科学院, 中国
4 °C 离心机	SIGMA 公司, 德国
紫外分光光度计	Gene Quant 公司, 德国
电泳槽	北京市六一仪器厂, 中国

方法:

实验分组: 将10只大白兔随机分为对照组和实验组, 每组5只。对照组总RNA提取采用传统Trizol法, 实验组采用改良后Trizol法提取总RNA。

股骨头标本的采集: 取实验组白兔, 乌拉坦(0.6~0.8 g/kg)腹腔注射麻醉^[3], 取髁部外侧入路显露股骨头^[4], 用烘烤并预冷过的咬骨钳咬取出股骨头, 迅速放置于已用液氮预冷好的研钵内, 注意骨块应完全浸泡于液氮中, 然后用烘烤预冷过的镊子将研钵中的股骨头转置冻存管中, 迅速放于液氮罐中保存(可保存1个月)^[5]。对照组白兔麻醉处死后, 迅速离断整个股骨头后装于冻存管内, 放于液氮罐中保存。

骨标本RNA的提取: 将实验组保存好的骨组织从液氮中取出, 称质量后倒入预冷好的研钵内, 使之浸没于液氮中, 开始研磨, 研磨过程中要始终保持液氮浸没骨组织, 直至将骨组织研成粉末状。将研磨好的骨粉倒入预冷过的简易匀浆器中, 加入1 mL的Trizol液, 于冰上匀浆组织直至液体呈清亮, 再将匀浆好的组织转移至1.5 mL的离心管中, 4 °C, 12 000 r/min离心15 min, 取上清液, 转移至另一1.5 mL离心管中, 加入200 mL氯仿, 剧烈摇晃30 s后在室温下静置5 min, 4 °C, 12 000 r/min离心15 min。取出上清移至1.5 mL离心管中, 加入等体积异丙醇, 室温下静置30 min后, 再次4 °C, 12 000 r/min离心10 min。弃上清, 沉淀物用1 mL预冷的体积分数75%乙醇冲洗, 室温静置5 min后, 4 °C, 9 800 r/min离心5 min。弃上清, 空气中自然干燥20~30 min, 待大部分残留乙醇挥发后, 用60~80 μL DEPC溶解RNA沉淀, 震荡混匀后-70 °C保

存。对照组不进行匀浆, 其余步骤与实验组相同。

RNA浓度和纯度测定: 取2 μL提取好的RNA样品, 加入98 μL体积分数0.1%DEPC水, 稀释50倍后用紫外分光光度计测量其浓度、 A_{260}/A_{280} 值、 A_{260}/A_{230} 值。

RNA完整性和提取效果鉴定: 取2 μg的RNA进行电泳, 由已测得的RNA浓度计算所需体积, 用体积分数1.2%的甲醛变性胶进行电泳, 主要观察电泳后RNA的28 S、18 S带是否清晰, 大体观两条带的比例是否能大致达到1:1。

主要观察指标: 提取RNA的浓度、纯度及产率; 电泳后RNA的28 S、18 S条带的清晰度及大致比例。

统计学分析: 应用SAS 6.12统计软件进行统计学处理, 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同组别比较采用完全随机设计的多样本均数比较的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验共纳入10只白兔均进入结果分析。

2.1 RNA纯度和浓度 用紫外分光光度法测得实验组兔股骨头中提取出的总RNA浓度在0.80~0.90 g/L, A_{260}/A_{280} 在1.90~2.00之间, A_{260}/A_{230} 在1.4~1.6之间, 对照组各个数值则明显偏低, 说明实验方法提取的RNA纯度高, 没有DNA、蛋白质污染, 见表1。

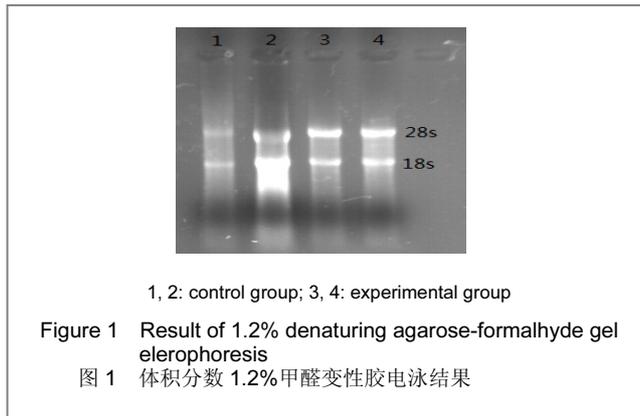
Item	Experimental group	Control group
RNA concentration (g/L)	0.86±0.02 ^a	0.35±0.02
A_{260}/A_{230}	1.45±0.33 ^a	0.56±0.26
A_{260}/A_{280}	1.95±0.13 ^a	1.68±0.23
The total RNA yield (mg/g)	1.53±0.28 ^a	0.37±0.30

^a $P < 0.05$, vs. control group

2.2 总RNA产率 根据测得的RNA浓度、体积, 以及骨组织的质量, 利用公式: 浓度×体积/质量, 可得出所提RNA的总产率, 每毫克骨组织能提取1.5~1.7 μg RNA, 见表1。

2.3 RNA完整性 经甲醛变性胶电泳后, 实验组可见清晰的28 S、18 S条带, 带型较粗, 大体观两条带的比例为1:1左右, 说明提取的RNA量足够, 且很少降解。对照组总RNA降解

情况严重, 提取量也较少, 见图1。



3 讨论

兔作为研究股骨头坏死的常用动物, 其股骨头中总RNA提取是各项研究的基础。目前国内外多以离体培养的骨细胞为原材料提取总RNA来进行相关研究, 很少直接从骨组织中提取RNA^[6]。体外培养所得骨细胞其生长环境很难同体内完全一致, 提取出的RNA或多或少受到外部条件影响, 不能准确反映股骨头坏死过程中的相关变化, 而直接从活体骨中提取RNA, 能有效消除这些影响, 客观地反映骨细胞的变化情况^[7], 得出更为真实的实验数据。

RNA提取成功的关键是控制RNA酶活性^[8]。RNA酶极度活跃, 按来源可分为内源性和外源性。存在于组织细胞内的为内源性RNA酶, 一旦细胞死亡, 其内所含RNA酶立即被激活, 分解RNA。外源性的RNA酶存在于操作人员的手汗、唾液中等, 操作不谨慎很容易污染总RNA。一般从体外培养的活细胞中提RNA时, 重点是控制外源性RNA酶的污染, 此时采取一些简单措施就可有效控制其污染, 例如在实验中穿防护服, 戴无菌手套、口罩等。但直接从兔股骨中提取RNA不同于活细胞提取, 它有一个极为关键的取材过程。取材时, 需从活体动物中取骨, 因为动物死亡后其机体细胞内的RNA酶会不同程度的被激活而导致RNA降解^[9], 同时当实验者从活体兔上剥离出股骨头后, 骨中的RNA酶也将被激活, 由于骨组织中总RNA含量少, 如果不能在短时间内抑制内源性RNA酶, 将很难提出RNA, 所以成功的取材是从骨中提取RNA的一个关键点。在控制骨中RNA的丢失后, 如何从其中较少的骨细胞内得到足量的RNA就是实验的另一个关键点了。骨组织中细胞含量少, 细胞外基质相对较多, 导致骨中所含RNA的绝对量很少, 这样即便是在提取过程中控制住了RNA的降解, 如果不能提取到足量的RNA, 最后所得结果也不足以支持后续实验, 所以如何让骨组织中细胞充分裂解释放RNA, 也是实验中必需考虑的。

实验所用方法较好地解决了这两个难题。首先股骨头取自动物存活时, 其次在麻醉动物的同时, 准备好用液氮预冷过的研钵, 研钵内始终保持有足量的液氮, 取骨时, 每次用咬骨钳咬取部分骨组织后, 迅速将其放置于充满液氮的研钵内, 反复咬取, 直至取出整个股骨头, 保证了骨组织的充分冷冻, 然后用镊子将冷冻好的骨碎片转入冻存管中, 放入液氮罐中保存(整个过程要迅速, 尽量缩短骨组织在空气中的暴露时间)。这种取材方法有效地防止了骨中RNA的丢失, 使活体骨在离体瞬间就被冷冻从而抑制了内源性RNA酶活性, 极大地减少了RNA的降解^[10]。

为了尽可能多的裂解骨细胞, 实验中使用了简易匀浆器。利用研钵研磨只能初步将骨细胞与细胞外基质分离, 此时加入Trizol, 并不能充分裂解骨细胞, 而实验将股骨头充分研末后, 立即倒入预冷后的匀浆器中, 再加入足量的Trizol, 于冰上匀浆, 直至匀浆器内液体变为澄清, 让Trizol与骨细胞得到充分反应, 提高了细胞裂解量, 为下一步提取足量的RNA建立了坚实的基础。

骨中RNA的提取近年来国内外探讨的比较多, Chomczynski等^[11]首先应用硫氰酸胍-酚-氯仿法从大鼠的乳腺组织中成功的提出RNA, 后被应用于骨性组织RNA提取^[12-13]。李茂欣等^[14]参照一步法, 采用GITC液冷冻包埋小块骨组织抑制RNA酶, 并将骨组织低温切片后匀浆来提取RNA, 但提取效果不好。郭若霖等^[15]在酚抽提蛋白前先离心去除大部分黏蛋白, 同时在异丙醇沉淀时加入乙酸钠和氯化钠等溶液, 使黏蛋白留于上清而不与RNA混杂沉淀。郑纺等^[16]则在异丙醇沉淀RNA时加入更多、高浓度盐溶液来降低污染。Kuliwaba等^[17]用Trizol法提出RNA沉淀后将沉淀重悬于含有乙酸钠的Tri-HCl和EDTA混合液中, 按这种步骤重复提取。赵宏斌等^[18]则采用液氮冷冻骨组织, 利用Trizol法直接提取RNA。

相较于实验所用方法, 以上这些都没有考虑到取材和匀浆对整个实验的影响, 而且有些方法过于繁琐, 操作时间较长, 增加了RNA降解和污染的可能性, 有些则是过于简便, 没有有效的保护好RNA。实验中所用均为常见实验试剂和仪器, 对RNA的特性及提取原理作了深入理解分析, 改进了传统方法, 充分保护了总RNA, 使整个提取过程更加快速、合理、有效, 具有广泛的应用前景。

4 参考文献

- [1] Zhao HY, Li L, Yu PL, et al. Zhongguo Zuzhi Huaxue yu Xibao Huaxue Zazhi. 2010;19(5):515-518.
赵焕英, 李莉, 于培兰, 等. 骨组织总RNA的提取技术[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志. 2010, 19(5):515-518.

- [2] Liu D, Li B, Wang GB, et al. Jieyou Xue Jinzhan. 2010;16(6): 523-526.
柳达,李彬,王广斌,等.脊髓损伤大鼠骨组织微环境中RANKL/OPG 表达的改变[J].解剖科学进展,2010,16(6):523-526.
- [3] Song CW. Zhongguo Yiyao Daokan. 2010;12(11):1959,1962.
宋成伟.三种常用麻醉药物动物实验中麻醉效果观察[J].中国医药导刊,2010,12(11):1959,1962.
- [4] Cui XL, Li ZH, Dai SW, et al. Wuhan Daxue Xuebao: Yixue Ban. 2010;31(1):61-64, 110.
崔西龙,李章华,戴双武,等.改良型非创伤性股骨头缺血坏死动物模型的建立[J].武汉大学学报:医学版,2010,31(1):61-64, 110.
- [5] Chen ZG, Xie Y, Tao SX, et al. Zhonghua Shiyian Waikexue. 2004;21(10):1217-1218.
陈振光,谢昀,陶圣祥,等.深低温冷藏骨组织存活时限的研究[J].中华实验外科杂志,2004,21(10):1217-1218.
- [6] Guan J, Kan N, Liu FL. Zhongguo Kouqiang Hemian Waikexue. 2007;5(6):451-455.
关键,阙娜,刘凤玲.大鼠成骨细胞体外培养、特性鉴定及低氧时 VEGF表达的变化[J].中国口腔颌面外科杂志,2007,5(6):451-455.
- [7] Wang W, Li S, Niu D. Study on relationship between osteoporosis and mRNA expressions of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein 2 in nontraumatic avascular necrosis of femoral head. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2010;24(9):1072-1077.
- [8] Li DM, Ren WC, Wang X, et al. Xi'an Jiaotong Daxue Xuebao: Yixue Ban. 2009;30(5):639-642.
李冬民,任吴超,王璇,等.利用TRIZol试剂和液氮提取大鼠胰腺高质量总RNA[J].西安交通大学学报:医学版,2009,30(5):639-642.
- [9] Wang KJ, Shang WB, Zhang L, et al. Redai Yixue Zazhi. 2010; 10(9):1031-1033, 1038.
王克杰,尚万兵,张林,等.小白鼠死后脾组织RNA降解程度与死亡时间关系的研究[J].热带医学杂志,2010,10(9):1031-1033, 1038.
- [10] Barbaric D, Dalla-Pozza L, Byrne JA. A reliable method for total RNA extraction from frozen human bone marrow samples taken at diagnosis of acute leukaemia. J Clin Pathol. 2002;55:865-867.
- [11] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987;162(1):156-159.
- [12] Shen Z, Gantaeva S, Månsson B, et al. Chondroaderin expression changes in skeletal development. Biochem J. 1998; 330(Pt1):549-557
- [13] Huang FQ, Jin MJ, Tan YB, et al. Zhonghua Guke Zazhi. 1999; 19(8):498-499.
黄凤岐,金孟球,谭郁彬,等.实验性骨质疏松大鼠骨组织内 I 型胶原 mRNA 的表达水平[J].中华骨科杂志,1999,19(8):498-499.
- [14] Li MX, Quan JX, Zhu RZ. Lanzhou Daxue Xuebao: Ziran Kexue Ban. 2000;36(5):134-135.
李茂欣,权金星,朱任之.一种从骨组织提取RNA的新方法的研究[J].兰州大学学报:自然科学版,2000,36(5):134-135.
- [15] Guo RL, Guo SY, Zuo AJ, et al. Shengwu Huaxue yu Shengwu Wuli Jinzhan. 2001;28(4):584-586.
郭若霖,郭善一,左爱军,等.从矿化的骨组织中提取骨细胞的总RNA [J].生物化学与生物物理进展,2001,28(4):584-586.
- [16] Zheng F, Wang BL, Zhang JY, et al. Tianjin Yiyao. 2007;35(10): 753-754, 801.
郑纺,王宝利,张镜宇,等.改良TRIZOL法从矿化骨组织中提取总RNA [J].天津医药,2007,35(10):753-754, 801.
- [17] Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Findlay DM. Stability of RNA isolated from human trabecular bone at post-mortem and surgery. Biochim Biophys Acta. 2005;1740(1):1-11.
- [18] Zhao HB, Liang HS. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2007;11(10):1957-1959.
赵宏斌,梁红锁.从兔股骨头中提取总RNA的方法特点[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(10):1957-1959.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 国家自然科学基金(30700854, 81071463), 课题名称: cbfa1 基因促进低氧状态下间充质干细胞生物学特性的实验研究。湖北省自然科学基金(2009CDB414)。

作者贡献: 柳铭、李章华进行实验设计, 实验实施为柳铭, 实验评估为柳铭、李章华, 资料收集为柳铭、陈颖、王芳、夏伟、陈友浩、潘峰, 柳铭成文, 李章华审核, 李章华、柳铭对文章负责。

致谢: 感谢解放军军事医学科学院生物化学与分子生物学研究所邵宁生教授和李杰老师对实验的技术支持。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关要求。

本文创新性:

提供证据: 检索 Pubmed 数据库及中国期刊全文数据库 2001/2010 的相关文献, 关键词为: “股骨头、RNA、Trizol”, 未见与文章密切相关研究。

创新点说明: 实验注意到了传统提取骨组织中总 RNA 所没有注意到的取材等问题, 通过改进取材方法和提取步骤, 有效地提高了总 RNA 的提取效率。

《中国组织工程研究与临床康复》杂志介绍

更多信息: cn.zglckf.com

《中国组织工程研究与临床康复》杂志

中国科技论文统计源期刊
2008 中国科技精品期刊

中国科学引文数据库来源期刊
中国核心期刊要目总览入编期刊
CA, SCOPUS, EM, CSA, IC, VINITI 收录期刊, 美国 OVID 期刊全文数据库收录期刊, 全球 2000 余家机构可在线检索和阅读。

关于组织工程

- 生物材料
- 干细胞培养
- 组织构建
- 骨关节植入物
- 器官移植

CRTER 杂志特色--

- 高质量出版:
篇篇经小同行专家精审 1 个月。
- 短周期发表:
优秀稿件可 3、4 个月,
一般稿件 6 个月。
- 多元化服务:
为向 SCI 收录杂志投稿者
提供语言等相关服务。

本刊宗旨: 面向国际, 立足本土,
发表中国组织工程研究领域一流水平的学术、技术创新成果。

内容重点: 干细胞培养与移植
软组织及硬组织构建
材料生物相容性评价(天然或合成材料与纳米粒子、
人工材料植入体、植入器官及外源性细胞)
计算机辅助技术的应用

CRTER 杂志 出版信息