

mRNA 的分离纯化

【实验原理】

真核生物的 mRNA 分子是单顺反子，是编码蛋白质的基因转录产物。真核生物的所有蛋白质归根到底都是 mRNA 的翻译产物，因此，高质量 mRNA 的分离纯化是克隆基因、提高 cDNA 文库构建效率的决定性因素。哺乳动物平均每个细胞含有约 1×10^{-5} g RNA，理论上认为每克细胞可分离出 5 ~ 10mg RNA。其中 rRNA 为 75% ~ 85%，tRNA 占 10% ~ 16%，而 mRNA 仅占 1% ~ 5%，并且 mRNA 分子种类繁多，分子量大小不均一，表达丰度也不一样。

真核生物 mRNA 有特征性的结构，即具有 5' 端帽子结构 (m7G) 和 3' 端的 poly(A)尾巴——绝大多数哺乳动物细胞的 3' 端存在 20~300 个腺苷酸组成的 poly (A) 尾，通常用 poly (A+) 表示，这种结构为真核 mRNA 分子的提取、纯化，提供了极为方便的选择性标志，寡聚 (dT) 纤维素或寡聚 (U) 琼脂糖亲和层析分离纯化 mRNA 的理论基础就在于此。

一般 mRNA 分离纯化的原理就是根据 mRNA 3' 末端含有多 poly(A)尾巴结构特性设计的。当总 RNA 流经寡聚 (dT) (即 oligo(dT)) 纤维素柱时，在高盐缓冲液作用下，mRNA 被特异地吸附在 oligo(dT)纤维素柱上，在低盐浓度或蒸馏水中，mRNA 可被洗下，经过两次 oligo(dT)纤维素柱，即可得到较纯的 mRNA。

目前常用的 mRNA 的纯化方法有：

- (1) 寡聚 (dT) - 纤维素柱层析法，即分离 mRNA 的标准方法；
- (2) 寡聚 (dT) - 纤维素液相离心法，即用寡聚 (dT) - 纤维素直接加入到总的 RNA 溶液中并使 mRNA 与寡聚 (dT) - 纤维素结合，离心收集寡聚 (dT) - 纤维素 / mRNA 复合物，再用洗脱液分离 mRNA，然后离心除去寡聚 (dT) - 纤维素；

(3) 其它一些方法：如寡聚 (dT) - 磁性球珠法等。

本实验应用方法 (1) 进行 mRNA 的分离纯化。

【试剂与器材】

(一) 试剂

1. 0.1mol/L NaOH , 每组 200mL
2. 寡聚 Oligo (dT) -纤维素
3. 加样/洗涤缓冲液 1: 0.5 mol/L NaCl, 20 m mol/L Tris-HCl(pH 7.6), 每组 250mL
或 0.5mol/L NaCl, 20mmol/L Tris-HCl(pH7.6), 1mmol/L EDTA(pH8.0), 0.1% SDS。
4. 洗涤缓冲液 2: 0.1 mol/L NaCl, 20 m mol/L Tris-HCl(pH 7.6), 每组 250mL 或
10mmol/L Tris-HCl (pH7.6), 1mmol/L EDTA (pH8.0), 0.05% SDS。

配制时可先配制 Tris-HCl(pH 7.6)、NaCl、EDTA (pH 8.0) 的母液, 经高压消毒后按各成分确切含量, 经混合后再高压消毒, 冷却至 65°C时, 加入经 65°C温育 (30min) 的 10%SDS 至终浓度。

5. 5 mol/L NaCl, 每组 10mL
6. 3 mol/L NaAc pH5.2, 每组 10mL
7. 无 RNase 双蒸水(DEPC 水), 每组 100mL
8. 70%乙醇, 每组 10mL

注意: 溶液 5, 6 的配制都应该加 0.1% DEPC 处理过夜, 溶液 1, 3, 4, 8 则用经 0.1% DEPC 处理过的无 RNase 双蒸水配制, Tris 应选用无 RNase 的级别。溶液配制后, 最好能够按一次实验所需的分量分装成多瓶 (如 10ml 或 50ml/瓶) 保存, 每次实验只用一份, 避免多次

操作造成对溶液的污染。

(二) 器材

1. 恒温水浴箱
2. 冷冻高速离心机
3. 紫外分光光度计
4. 巴斯德吸管
5. 玻璃棉
6. 5ml 一次性注射器

【操作方法】

(一) oligo(dT)纤维素的预处理

1. 用 0.1mol/L NaOH 悬浮 0.5-1.0g oligo(dT)纤维素。
2. 将悬浮液装入填有经 DEPC 水处理并经高压灭菌的玻璃棉的巴斯德吸管中，柱床体积为 0.5-1.0mL，用 3 倍柱床体积的无 RNase 的灭菌双蒸水冲洗 oligo(dT)纤维素。
3. 用 3-5 倍柱床洗涤缓冲液 I 冲洗 oligo(dT)纤维素，直到流出液的 pH 值小于 8.0。
4. 将处理好的 oligo(dT)纤维素从巴斯德吸管倒出，用适当的柱床洗涤缓冲液 I 悬浮，浓度约为 0.1g/mL，保存在 4℃待用。

(二) 总 RNA 浓度的调整

1. 把实验一所提的总 RNA 转到适合的离心管中，如果总 RNA 的浓度大于 0.55mg/mL，则用无 RNase 的双蒸水稀释至 0.55mg/mL，总 RNA 的浓度对除去 rRNA 是很重要的。把

RNA 溶液置于 65°C 水浴加热 5 分钟，然后迅速插在冰上冷却。

2. 加入 1/10 体积 5 mol/L NaCl 使 RNA 溶液中盐的浓度调至 0.5 mol/L。

(三) mRNA 的分离

1. mRNA 与 Oligo(dT)-纤维素结合：用移液器重新悬浮 oligo(dT)-纤维素，按下表取适量的 oligo(dT)-纤维素到 RNA 样品中，盖上盖子，颠倒数次将 oligo(dT)-纤维素与 RNA 混匀。于 37°C 水浴保温并温和摇荡 15 分钟。

总 RNA (mg)	寡聚 Oligo(dT)-纤维素 (mL)	洗涤缓冲液 1, 2 (mL)	洗脱体积 (mL)
<0.2	0.2	1.0	1.0
0.2-0.5	0.5	1.5	1.5
0.5-1.0	1.0	3.0	3.0
1.0-2.0	2.0	5.0	5.0

2. 转移：取 1 个 5ml 的一次性注射器，取适量经过高温灭菌的玻璃棉塞紧前端，并把它固定在不含 RNase 的支架上，再把 oligo(dT)-纤维素/RNA 悬浮液转移到注射器，推进塞子直至底部，把含有未结合上的 RNA 液体排到不含 RNase 的离心管中（保留至确定获得足够的 mRNA）。

3. 洗涤：根据上表直接用注射器慢慢吸取适量的洗涤缓冲液 1，温和振荡，充分重新悬浮 mRNA-oligo(dT)-纤维素，推进塞子，用不含 RNase 的离心管收集洗出液。测定每一管的 OD₂₆₀，当洗出液中 OD 为 0 时准备洗脱。

4. 洗脱：根据上表直接用注射器慢慢吸取适量（2-3 倍柱床体积）的洗脱缓冲液 2 或无

RNase 双蒸水到注射器内充分重悬 mRNA-oligo(dT)-纤维素,推进塞子以 1/3 至 1/2 柱床体积分管收集洗脱液。

5. 测定每一管的 OD₂₆₀, 合并含有 RNA 的洗脱液组分于 4°C, 2500g, 离心 2-3 分钟, 上清转移至新的离心管中, 去掉残余的 oligo(dT)-纤维素。

6. 沉淀: 洗脱液中加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc (pH5.2), 再加入 2.5 倍体积的冰冷乙醇, 混匀后, -20°C 30 分钟或放置过夜。

7. 离心收集: 12000g, 4°C 离心 15 分钟, 小心弃去上清, mRNA 沉淀此时往往看不见, 用 70%乙醇漂洗沉淀, 12000g, 4°C 离心 5 分钟, 小心弃去上清液, 沉淀空气干燥 10 分钟, 或真空干燥 10 分钟。将 mRNA 沉淀溶于适当体积的无 RNase 的双蒸水, 立即用于 cDNA 合成 (或保存在 70%乙醇中并贮存于 -70°C)。

8. 定量: 测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀, 计算产率以及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比率 (同上一实验)。

【注意事项与提示】

1. 整个操作过程必须严格遵守无 RNase 操作环境规则。
2. 提取的总 RNA 必须完整, 不能被降解, 这是 mRNA 质量的先决条件。
3. 总 RNA 与 Oligo(dT)-纤维素的比例要适当, 过量的总 RNA, 容易造成 mRNA 不纯。
4. RNA 溶液与 Oligo(dT)-纤维素结合前必须置于 65°C 加热 5 分钟, 这一步很重要, 其作用 (1) 破坏 mRNA 的二级结构, 特别是 poly(A⁺)尾处的二级结构, 使 poly(A⁺)尾充分暴露, 提高 poly(A⁺)RNA 回收率; (2) 解离 mRNA 与 rRNA 的结合。加热后应立即插入冰上, 以免由于温度的缓慢下降使 mRNA 又恢复其二级结构。
5. 应注意 mRNA 不能被 DNA 污染, 即使是 1 ppm DNA 污染, 也可严重影响实验结果。
6. mRNA 制备后, 可用变性琼脂糖凝胶电泳检测其完整性和有无 DNA 污染。提取的

mRNA 应该在 0.5~8.0kb 之间呈现弥散状, 无明显区带, 但大部分的 mRNA 应在 1-2.0kb 范围内 (如下图)。一般来说, 经过一次纯化分离的 mRNA 还会有微量的 rRNA 残留, 但一般来说不会对后续实验造成很大的影响, 如果样品充足, 可将经过一次纯化分离的 mRNA 再纯化一次, 进一步提高其纯度。

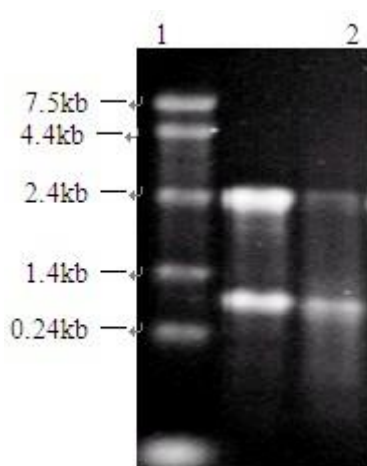


图 3.1 mRNA 变性琼脂糖凝胶电泳示意图

Lane 1, 0.24–7.5kb RNA 分子量 Maker;

Lane 2, 老鼠肝脏总 RNA;

Lane 3, 老鼠肝脏 mRNA

7. 为防止 mRNA 降解, 应避免多次冻融, 可将 mRNA 少量分装后保存。另外, 如果有低温冰箱, 最好在 $-70^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$ 保存。也可将 mRNA 在 70%乙醇中 -70°C 保存一年以上。

8. 寡聚(dT)纤维素柱用后可用 0.3mol/l NaOH 洗净, 然后用层析柱加样缓冲液平衡, 并加入 0.02%叠氮钠 (NaN_3)冰箱保存, 重复使用。每次用前需用 NaOH、灭菌 ddH₂O、层析柱加样缓冲液依次淋洗柱床。

9. 一般而言, 10⁷ 哺乳动物培养细胞能提取 1-5 μg Poly(A⁺)RNA, 约相当于上柱总 RNA 量的 1%-2%。

【实验安排】

1. 第一天：试剂的配制和所用一次性塑料制品和玻璃器皿的去 RNase 处理 (0.1%DEPC 浸泡或高温干烤)。
2. 第二天：进行 (一)、(二) 和 (三) 1-6。
3. 第三天：进行 (三) 7 和变性琼脂糖凝胶电泳检测 mRNA。
4. 为了避免由于保存时间过长造成的 RNA 降解，最好能将总 RNA 提取、mRNA 的分离纯化、RT-PCR 和 cDNA 文库构建实验安排在连续的时间内进行。

其他：

引物的设计一般遵循的原则：

- 1) 典型的引物 20-24 个核苷长。引物需要足够长，保证序列独特性，并降低序列存在于非目的序列位点的可能性。但是太长的引物可能会与错误配对序列杂交降低了特异性，同时因为比短序列杂交慢，从而降低了产量。
- 2) 设计 5'端和中间区为 G 或 C，且 GC 含量为 50%~60%的引物，以增加引物的稳定性及其与目的序列杂交的稳定性。
- 3) 3'末端尽量不要富含 GC。设计引物时保证在最后 5 个核苷中含有 3 个 A 或 T。但因为 3'端核苷需要同模板退火以供聚合酶催化延伸，为了避免 3'末端的错误配对，所以末端尽量避免为核苷 A。
- 4) 在引物对 3'末端尽量避免互补序列以免形成引物二聚体，抑制扩增。如果引物序列可能产生内部二级结构会破坏引物退火稳定性，也要尽量避免。

此外，目的序列上并不存在的附加序列，如限制位点和启动子序列，可以加入到引物 5'端而不影响特异性。

有时候，仅有有限的序列信息可供用于引物设计。比如，如果仅知道氨基酸序列，可以设计简并引物，同时使用较高的引物浓度（1 μ M 到 3 μ M），因为许多简并混合物中的引物不是特异性针对目的模板。

为了增加特异性，可以参考密码子使用表，根据不同生物的碱基使用偏好，减少简并性。次黄嘌呤可以同所有的碱基配对，降低引物的退火温度。不要在引物的 3'端使用简并碱基，因为 3'端最后 3 个碱基的退火足以在错误位点起始 PCR。