

大鼠造血组织 RNA 与 DNA 显色定量的方法*

冉新泽

(第三军医大学 防原医学教研室)

摘要 本实验在石井畅方法的基础上进行改进,用改进的二羟基甲苯法测定 RNA,二苯胺法测定 DNA 重复性好,回收率高(DNA 达 $99.5 \pm 0.3\%$),当待测样品浓度 RNA 在 $10-60 \mu\text{g/ml}$ 、DNA 在 $10-100 \mu\text{g/ml}$ 范围内可明显提高测量灵敏度。同时探讨了正常大鼠脾脏、肠系膜淋巴结、骨髓和外周血液的 RNA 与 DNA 含量参考值,为机体造血组织核酸代谢障碍时 RNA 与 DNA 的显色、定量分析提供了较好的检测方法。

核酸是机体的基本成份之一,在生长发育和繁殖过程中起着重要作用。随着生化技术的高速发展,有关核酸提取、分离和测定的方法也在不断革新和完善。本实验在石井畅方法^[2]的基础上进行了改良,并测出 86 只大鼠 (*Rattus norvegicus*) 脾脏、肠系膜淋巴结、骨髓和外周血液 RNA 与 DNA 的含量,效果满意,现报道如下。

材料和方法

动物: Wistar 大鼠 86 只,雌雄各半,体重 150—250 克。

组织样品的提取 大鼠经放血活杀,取出脾脏和肠系膜淋巴结,称重后分别放入匀浆器内匀浆,各加蒸馏水至 5.0ml 混匀;取出双侧股

骨,用冰冷的 TC-199 液 5.0ml 冲洗做成骨髓细胞悬液;外周血 1.0ml 加 0.85% NaCl 液 4.0 ml 混匀;最后将以上四种样品各取 1.0ml 分别倒入不同的离心管中,加 10% 三氯醋酸(TCA) 2.5ml,混匀后离心 4 分钟、8000 转/分 (rpm)。然后将沉淀物依次经过 5% TCA 2.5ml、冰水 1.0ml + 95% 乙醇 4.0ml、95% 乙醇 5.0ml、3:1 乙醇乙醚溶液 1.5ml 等步骤离心沉淀,再加 5% TCA 5.0ml 混合后转至具塞试管中,经 90°C、15 分钟水浴,待冷后倒回离心管中离心 8 分钟、10000rpm,并回收上清液;其沉淀物再用 5% TCA 5.0ml 混合过滤,取滤液与上清液合并即为样品液。为计算方便,可用 5% TCA 稀释

* 参加实验工作的还有宋聚忠、王瑞虎、罗成基同志。

至 10.0ml。

呈色试剂配制 1. 称取二羟基甲苯(英国浦耳试剂厂) 100mg, 溶于 HCl(12.0mol/L) × 离子价数, 加 CuCl₂(0.004mol/L) 5.0ml, 混匀后再加 HCl 至 50.0ml 即为二羟基甲苯溶液。此液不稳定, 应新鲜配制。2. 称取二苯胺(上海试剂总厂, 重新提纯) 750mg, 溶于冰乙酸(17.4mol/L × 离子价数) 40.0ml, 加 H₂SO₄ (36.0mol/L × 离子价数) 0.75ml、混合后加冰乙酸至 50.0ml, 最后加入 2% 乙醛 0.25ml, 即为二苯胺乙醛溶液。此液也应新鲜配制, 或 4°C 保存、7 天内有效。

RNA 的呈色 取待测样品液 3.0ml 加二羟基甲苯液 3.0ml 混匀为待测管, 另取 5% TCA 3.0ml 加二羟基甲苯液 3.0ml 混匀作对照管, 然后 100°C 水浴 40 分钟。反应终止立即冷却, 用 72-1 型分光光度计于 665 毫微米 (nm) 下测光密度值。

DNA 的呈色 取待测样品液 2.0ml 加二苯胺乙醛溶液 4.0ml 混匀为待测管, 另取 5% TCA 2.0ml 加二苯胺乙醛溶液 4.0ml 混匀作对照管, 然后 30°C 恒温培养 20 小时。培养终止立即冷却, 用 72-1 型分光光度计于 600nm 下测光密度值。

标准曲线的制作 用 5% TCA 将标准 RNA (中科院生化研究所) 配成 1、2、4、5、和 6 毫克 (mg)% , 将标准 DNA (日本东京都试剂厂) 配成 1、2、3、4 和 5mg% 五个不同浓度, 按上述方法进行光密度测定。由于样品经过稀释, 在一定条件下符合比耳 (Beer) 定律的适用范围, 结果呈现浓度 (C) 与光密度 (D) 之间良好的线性关系 (图 1 和 2)。而 C 与 D 之比是一个常数 (1/K), 本实验常数 DNA 为 0.221, RNA 为 0.156。

核酸量的计算公式:

$$\text{RNA (DNA)} = \frac{D \times N \times 1/K}{W}$$

(N 为稀释倍数, W 为脏器重量)。单位表示为每 100 克新鲜组织 (湿重) 含多少克, 或每根股骨含多少毫克, 或每毫升外周血液含多少微克。

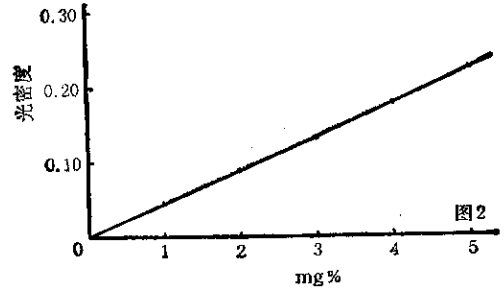
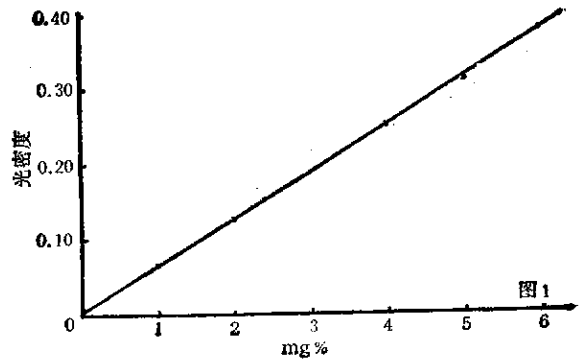


图 1 RNA 反应的标准曲线; 图 2 DNA 反应的标准曲线

结果和讨论

(一) 测定结果 86 只正常 Wistar 大鼠脾脏、肠系膜淋巴结、骨髓和外周血液的 RNA 含量分别为 0.982 ± 0.030 、 1.072 ± 0.021 、 0.117 ± 0.009 和 0.149 ± 0.009 , DNA 含量分别为 1.211 ± 0.070 、 1.622 ± 0.039 、 0.287 ± 0.012 和 0.052 ± 0.004 。可见本法所得结果与施新猷^[1] 和 Ceriotti G^[2] 等报道的动物造血组织的 RNA 与 DNA 含量参考值是相符的, 经统计学处理, 相差不显著 ($P > 0.05$)。

(二) 呈色反应原理 RNA 与 12.0mol/L × 离子价数 HCl 共热酸解后核糖在酸中环化成糖醛, 并与二羟基甲苯作用呈蓝绿色, 在 665 毫微米 (nm) 有最大吸收^[6]; 但其灵敏度不甚高, 尤其是对造血组织受损伤后核酸代谢障碍时不易测出 RNA, 而改用 CuCl₂ 中的 Cu⁺⁺ 替代原法中 FeCl₃ 的 Fe⁺⁺⁺ 进行催化, 则可使反应灵敏度提高一倍以上 (对样品 RNA 浓度在 10—60 微克/毫升范围内效果更佳), 故称改良二羟基甲苯法。

DNA 在强酸环境下加热使其糖苷键断裂、

(下转第 54 页)

(上接第 32 页)

酸解,生成脱氧核糖并脱水生成 ω -羟基- γ -酮基戊醛,与二苯胺作用呈蓝色,在 600nm 有最大吸收^[3];但若样品中 DNA 含量低于 50 微克, (μg)/ml 时测定比较困难,然而加入乙醛溶液后可增加二苯胺溶液的发色量,且适用于样品 DNA 含量在 10—100 μg /ml 之间的测定,故称改良二苯胺法。

(三) 方法学上的特点 造血组织样品经过沉淀蛋白、除去酸性物质、脱色去脂和脱水即可进行呈色测定。在实验操作至最后一次离心沉淀且回收上清液的过程中,8000 转/分 (rpm)、4 分钟因沉淀影响上清液的回收,改为

10000rpm、8 分钟,效果较好。又如在 3:1 乙醇乙醚混合液的离心程序上,由原来反复操作 3 次改为 2 次也取得同样满意的效果。

关于核酸定量测定时间的改变, Burtonk^[4]认为 DNA 需 16—20 小时、25—35 $^{\circ}\text{C}$ 培养、波长 600nm,或 100 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分钟、540nm;本实验经反复摸索,以 30 $^{\circ}\text{C}$ 、20 小时、600nm 为宜。

(四) 回收实验和样品的重复性 衡量实验结果的可靠和测定方法上的准确程度,必须有助于一定的科学依据。本实验对 18 份脾脏样品用内标法对 RNA 和 DNA 进行回收,加入标准品 40 μg ,结果回收为 RNA 39.3 ± 0.7 ,