

不同方法提取SD大鼠膝关节软骨组织的总RNA

孙志涛¹, 牛 维², 何升华¹, 林定坤² (¹深圳市中医院, 广东省深圳市 518000; ²广东省中医院骨三科, 广东省广州市 510120)

文章亮点:

- 1 目前文献报道的软骨 RNA 提取有多种方法, 常见的有 RNeasy Lipid Tissue Kit、RNAout 试剂盒和经典 Trizol 法, 国内文献报道多为经典 Trizol 法。作者在实验中发现该方法提取的 RNA 并不能满足后续实验的需要, 为了解决这个瓶颈, 作者尝试了各种方法。
- 2 比较目前文献报道的常见 3 种不同方法提取的软骨组织 RNA, 结果显示 RNeasy Lipid Tissue Kit 法获得的总 RNA 纯度高、完整性和稳定性好, 并能成功反转录合成双链 cDNA。

关键词:

组织构建; 软骨组织构建; 软骨; RNA 提取; 大鼠; 国家自然科学基金

主题词:

软骨; RNA; 大鼠

基金资助:

国家自然科学基金项目(81173285)

摘要

背景: 目前文献报道的软骨 RNA 提取有多种方法, 国内文献报道多为经典 Trizol 法, 在实验中发现该方法提取的 RNA 并不能满足后续实验的需要。

目的: 探索不同方法提取 SD 大鼠软骨组织总 RNA 的区别。

方法: 选取 3 月龄 SD 大鼠 9 只, 分别采用 RNeasy Lipid Tissue Kit、RNAout 试剂盒和经典 Trizol 法对软骨组织进行总 RNA 提取, 并通过 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 以探寻软骨总 RNA 最佳提取方案。

结果与结论: Trizol 法提取的 RNA A_{260}/A_{280} 值为 1.58, 说明纯度不高; RNAout 法提取的 RNA, 由于软骨含有大量的蛋白多糖和胶原, 也不能满足后续实验的需要; RNeasy[®] Mini Kit 法和肝(Trizol)法提取 RNA 的 A_{260}/A_{280} 值分别为 2.00 和 1.98, 说明提取的总 RNA 或核酸的纯度高。RNA 的完整性电泳结果显示, RNeasy[®] Mini Kit 法、RNAout 法和肝(Trizol)法可见 28 s、18 s 及 5 s 条带, 而 Trizol 法未见任何条带, RNAout 法 28 s 和 18 s 条带不清楚。结果提示 RNeasy Lipid Tissue Kit 法获得的总 RNA 纯度高、完整性和稳定性好, 并能成功反转录合成双链 cDNA, 而 RNAout 试剂盒和经典 Trizol 法获得的总 RNA 不能满足后续实验需要。

孙志涛, 牛维, 何升华, 林定坤. 不同方法提取 SD 大鼠膝关节软骨组织的总 RNA [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(51): 8201-8205.

Different methods to extract total RNA from the knee cartilage tissue of Sprague-Dawley rats

Sun Zhi-tao¹, Niu Wei², He Sheng-hua¹, Lin Ding-kun² (¹Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China; ²Third Department of Orthopedics, Guangdong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Currently, there are many methods to extract cartilage RNA reported in the literature, and classic Trizol method has been mostly reported in China. However, it is discovered that RNA extracted by the Trizol method cannot meet the needs of the follow-up experiments.

OBJECTIVE: To explore the difference of different methods to extract total RNA from the cartilage tissues of Sprague-Dawley rats.

METHODS: Nine Sprague-Dawley rats of 3 months old were selected to extract total RNA respectively by RNeasy Lipid Tissue Kit, RNAout kit and classic Trizol method. Agarose gel electrophoresis was used to detect RNA integrity in order to explore the best extraction scheme of total RNA.

RESULTS AND CONCLUSION: When Trizol method was used to extract RNA, the A_{260}/A_{280} value was 1.58, indicating that the purity was not high. Due to a large number of proteoglycan and collagen in the cartilage, RNA extracted using RNAout method cannot meet the needs of the follow-up study. When RNeasy[®] Mini Kit and liver method (Trizol) were used to extract RNA, the A_{260}/A_{280} values were 2.00 and 1.98, respectively, indicating that the extracted total RNA or nucleic acid had high purity. The RNA electrophoresis results showed that using RNeasy[®] Mini Kit, RNAout and liver method (Trizol), 18 s, 28 s and 5 s stripes were visible; but there was no stripe using Trizol method. For RNAout method, 28 s and 18 s stripes were unclear. These results show that the

孙志涛, 男, 1978 年生, 安徽省淮南市人, 汉族, 2013 年广州中医药大学毕业, 博士, 主要从事脊柱、髌膝关节炎退行性变研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.51.001
[http://www.cjter.org]

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2014)51-08201-05
稿件接受: 2014-10-29

Sun Zhi-tao, M.D., Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

Accepted: 2014-10-29

total RNA obtained by the RNeasy Lipid Tissue Kit has the high purity, integrity and stability, and can successfully synthesize double-stranded cDNA by reverse transcriptase, but RNAout kit and classic Trizol methods cannot meet the need of subsequent experiments.

Subject headings: cartilage; RNA; rats

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81173285

Sun ZT, Niu W, He SH, Lin DK. Different methods to extract total RNA from the knee cartilage tissue of Sprague-Dawley rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(51):8201-8205.

0 引言 Introduction

聚合酶链反应(PCR)技术是体外快速扩增特定基因或DNA序列最常用的方法,自从20世纪80年代, Kary Mullis发明了该技术,便广泛应用于分子生物学研究中,以便在分子水平上阐明细胞活动的规律,揭示生命的本质。高质量总RNA的提取是该技术有效开展的必要前提。总RNA的抽提方法有多种,目前实验室常用的方法是异硫氰酸胍-苯酚抽提法,Trizol是使用最广泛的RNA抽提专用试剂,它可以迅速破坏细胞结构,使存在于细胞质和细胞核内的RNA释放出来,并使核糖体蛋白与RNA分子分离,还能保证RNA的完整^[1]。随着实验要求的提高,为了从某些特殊组织中获取高质量总RNA, RNA抽提试剂盒应运而生,为实验研究提供了更大的方便。

软骨作为研究关节相关疾病的重要组织之一,其总RNA的有效提取对后续实验的进行起到关键性的作用,由于软骨的细胞含量低,且其细胞基质中含有大量的蛋白聚糖,提取RNA时,这种多糖的凝胶状沉淀与RNA相混^[2],使得RNA很容易随着多糖一起被去除,降低RNA的提取率^[3]。作者查阅了相关文献,发现以往文献中并未详细报道软骨的取材及RNA的抽提过程,也没有任何一种软骨RNA抽提的标准方法^[4-5]。作者在预实验过程中发现,软骨RNA极易发生降解,且经典的Trizol法提取RNA并未像以往报道的那样,能够保证RNA的纯度和完整性,所以,设计此研究方案,通过采用不同的取材和提取方法,来摸索软骨总RNA的最佳提取方案。

1 材料和方法 Materials and methods

设计:单一样本观察。

时间及地点:实验于2012年10月至2013年1月在广州中医药大学国家重点中医骨伤科学实验室完成。

材料:

实验动物:选取3月龄SD大鼠共9只,雌性,体质量(200±20) g,由广州中医药大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(粤)2006-0015。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

实验方法:

制作膝骨性关节炎模型:采用经典Hulth方法制作膝骨性关节炎模型^[6]。

将SD大鼠左侧膝关节内侧副韧带切断,切除前后交叉

提取SD大鼠膝关节软骨组织总RNA实验的试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
Trizol(Invitrogen), RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit	QIAGEN公司
软骨RNAout	北京天恩泽
T100型梯度PCR仪、ChemiDoc™MP System凝胶成像仪	Bio-Rad, 美国
转化生长因子β1引物	Invitrogen Trading
5804R型低温超速离心机	eppendorf, 德国

韧带和内侧半月板。术后常规肌肉注射青霉素, 20×10^4 U/只,连续3 d。造模后4周,断颈处死大鼠,取关节软骨组织, -80℃ 保存。

软骨总RNA提取:

第1种方法:将软骨组织放于研钵中,在液氮下研磨成粉状,加入Trizol研磨(50 mg的组织加1 mL的Trizol液),将研磨液倒入1.5 mL EP管中,振荡混匀,置于冰上10 min,加入氯仿(Trizol液的1/5体积量),盖紧离心管盖,振荡混匀,室温静置5 min, 12 000 r/min, 4℃ 离心15 min,用移液枪吸取上清液转移至另一新的离心管中,加入等体积的异丙醇,充分混匀后在冰上放置15 min。12 000 r/min, 4℃ 离心10 min,小心弃去上清,缓慢沿离心管壁加入体积分数75%的乙醇1 mL洗涤1次,室温干燥沉淀,待乙醇挥发完时,加入RNase-free水溶解沉淀,待沉淀完全溶解后于-80℃ 保存,并通过琼脂糖凝胶电泳来检测总RNA的完整性。

第2种方法:采用软骨RNAout柱式提取试剂盒提取软骨总RNA。先将冷冻的软骨组织液氮研磨成粉,加入1 mL溶液A(使用前必须放在65℃ 水浴使沉淀彻底溶解)溶解,然后将研磨物转移到新的1.5 mL离心管中,振荡混合30 s。

在装有研磨物/匀浆物的离心管中加入0.3 mL的溶液B,振荡器振荡30 s混匀(振荡器振荡时必须使管底溶液振荡起来)。加入0.2 mL氯仿,振荡器振荡30 s混匀。室温12 000-15 000 ×g离心2-5 min。

将上清液(约0.8 mL)转移到另一干净的1.5 mL塑料离心管中,下层有机相和中间层含有DNA、蛋白质和其他杂质,避免触及或吸取。最好留下100 μL上清液不取。在上清液中加入0.5 mL的溶液C,振荡器振荡30 s混匀。加入0.2 mL的氯仿,振荡器振荡30 s混匀。室温12 000-15 000 ×g离心3 min,两相间将有白色膜状物(蛋白质)形成。

将上清液(约1 mL)转移到另一干净的1.5 mL塑料离心

管中,避免触及或吸取有机相及其上面的白色膜状物。在上清液中加入0.5倍体积的溶液D,振荡器振荡30 s混匀,此时溶液呈白色浑浊状。室温12 000-15 000×g离心5-10 min, RNA将在管底形成白色沉淀(约黄豆大小)。

如果组织样品量少或需要提高RNA回收率,也可以延长离心时间到20-30 min。在离心管中加入1 mL体积分数75%的乙醇,振荡器上振荡混匀30 s。室温12 000-15 000×g离心5 min, RNA将在管底形成细小沉淀(约芝麻大小)。重复上步体积分数75%的乙醇洗涤1次, RNA将在管底形成细小沉淀。

小心吸弃上清液,注意不要吸弃RNA沉淀。再短暂快速离心,用移液枪小心吸弃残留液。加入适量(一般为20-50 μL) RNase-free水使RNA沉淀溶解,并通过琼脂糖凝胶电泳来检测总RNA的完整性。

第3种方法:采用RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit试剂盒提取软骨总RNA。

第4种方法:采用传统Trizol法提取大鼠肝细胞组织RNA,具体步骤同第一种方法。

RNA样品纯度、浓度及完整性检测:分别取各组样品总RNA 1 μL,用核酸蛋白分析仪测定RNA样品核酸的吸光度值 A_{260} 、蛋白质的吸光值 A_{280} (以无RNase水为空白调零),每样品重复3次,取其平均值,并计算 A_{260}/A_{280} 值;另取总RNA约10 μL,加入Loading buffer, 65 °C加热3 min,冰浴后,在1%琼脂糖凝胶上电泳,凝胶成像仪拍照,观察28 s、18 s条带及5 s条带是否存在及各条带亮度来检测样品RNA的完整性。

cDNA合成与转化生长因子β1 mRNA RT-PCR扩增:按照 TaKaRa 公司的 PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser说明书进行,以合成的单链cDNA为模板,选择β-actin作为内参照,对转化生长因子β1 mRNA进行PCR扩增。

引物序列:

转化生长因子β1 mRNA	上游引物5'-GGA CTC TCC ACC TGC AAG AC-3'; 下游引物5'-GAC TGG CGA GCC TTA GTT TG-3', 片段长度为100 bp
β-actin	上游引物5'-CCG CAT CCT CTT CCT CCC T-3'(19 bp); 下游引物5'-GCC ACA GGA TTC CAT ACC CAG-3'(21 bp), 片段长度为131 bp

按以下条件进行PCR扩增:94 °C预变性3 min, 94 °C预变性45 s, 56 °C复性60 s, 72 °C延伸1.5 min, 扩增35个循环, 72 °C延伸1 min, 4 °C保存。

主要观察指标:测定各组总RNA A值,琼脂糖凝胶电泳检测各组总RNA的完整性,并通过RT-PCR检测转化生长因子β1 mRNA的表达。

表1 RNA吸光度值及产量

Table 1 Absorbance value and yield of RNA

总RNA提取	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	RNA(g/L)
Trizol(第1种方法)	9.670	6.119	1.58	0.386 8
RNAout(第2种方法)	7.740	3.940	1.96	0.309 6
RNeasy® Mini Kit(第3种方法)	12.882	6.415	2.00	0.546 1
肝(Trizol)(第4种方法)	136.648	68.813	1.98	5.625 9

2 结果 Results

2.1 总RNA纯度、浓度及完整性检测 3种方法提取的总RNA经过核酸蛋白分析仪检测,准确计算RNA的产率和纯度,吸光度值和产量见表1。

高质量RNA的 A_{260}/A_{280} 值应介于1.8-2.0之间,越接近2.0,说明RNA的纯度越高。从表1中可以看出Trizol法提取的RNA的 A_{260}/A_{280} 值为1.58,说明其方法提取RNA的纯度不高;RNAout法提取的RNA,虽然 A_{260}/A_{280} 值为1.96,理论上应该为较纯的RNA,但由于软骨含有大量的蛋白多糖和胶原,其提取的RNA也不能满足后续实验的需要;RNeasy® Mini Kit法和肝(Trizol)法提取RNA的 A_{260}/A_{280} 值分别为2.00和1.98,说明提取的总RNA或核酸(包括总RNA和DNA)的纯度高。

2.2 总RNA的完整性的琼脂糖凝胶电泳检测 图1为4种提取方法总RNA经1%琼脂糖凝胶电泳,检测RNA完整性电泳图,结果显示,RNeasy® Mini Kit法、RNAout法和肝(Trizol)法电泳结果可见28 s、18 s及5 s条带,而Trizol法提取的RNA基本上全部降解,未见任何条带,其中RNeasy® Mini Kit法和肝(Trizol)法的28 s、18 s为2-1左右,而RNAout法28 s和18 s条带不清楚,其比值约为1-1。

2.3 转化生长因子β1 mRNA RT-PCR检测 取5 μL PCR产物及5 μL DNA Marker,在1%的琼脂糖凝胶上样电泳,凝胶成像系统分析电泳结果(图2)。由图2可以看出RNeasy® Mini Kit法提取的RNA,扩增出所需要的目的基因条带,且未见其他特异性扩增产物,而Trizol法提取的RNA,完全不能扩增出目的条带。

3 讨论 Discussion

通过本次实验,作者觉得研究者在对软骨进行RNA提取时,应该注意以下几点: 软骨的取材和保存:在取材过程中,应对所有与软骨接触的物件进行去RNA酶处理,手术器械必须经高温消毒,180 °C,4 h的高温消毒是可靠的,而且,对所取下的软骨应立即用液氮保存来运输或立即放入-80 °C保存。正确的匀浆方法:本实验表明,为了分离到高质量的RNA,软骨一定要在液氮中研磨成粉,在加入裂解液后,要细细匀浆,直至2 mL的注射器能够完全吸取匀浆液,匀浆的是否彻底也是保证RNA提取成功的关键步骤之一。试剂的选择:本实验发现传统的Trizol法并不能有效的提取软骨中的RNA,这可能是由于软骨中本身细胞含量少,并且含有大量的糖类和胶原类物质,影

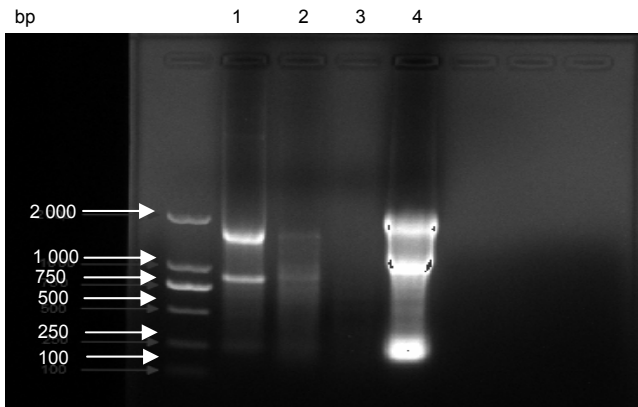


图1 SD大鼠膝关节软骨组织总RNA琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis pattern of total RNA

extracted from the cartilage tissue of Sprague-Dawley rats

图注:1:RNeasy® Mini Kit法;2:RNAout法;3:Trizol法;4:肝(Trizol法)。Trizol法提取的RNA未见任何条带,RNeasy® Mini Kit法和肝(Trizol)法的28 s 18 s为2:1左右,而RNAout法28 s和18 s条带不清楚,其比值约为1:1。

响了RNA的释放,而基于无苯酚/氯仿柱式提取法的RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit提取的总RNA质量较高,能够满足后续试验需要。

在对文献的研究中作者发现,国内外一些学者对动物各组织总RNA的提取已做过一些相关研究。张磊等^[7]使用QIAamp Viral RNA Mini Kit(Q法),NucliSens miniMag系统(M法)和匹基(PG)丙型肝炎病毒定量试剂盒自带RNA提取方法(P法)进行血清HCV RNA提取研究,结果发现,从提取效率和收获RNA质量上看,M和Q法远远优于P法,进一步方法性能表明,M法为HCV RNA定量最佳提取方法,而P法因其提取效率低、收获RNA质量差以及重复性不好,不适合临床HCV RNA定量试验。郭俊良等^[8]利用改良的异硫氰酸胍法、改良的SDS法和改良的TRIpure试剂盒法对昆明小鼠心脏、肝脏以及肾脏进行组织总RNA的提取进行了研究,结果发现,试剂盒提取效果普遍明显优于其他方法,且适用于肝脏总RNA的提取,传统方法的改良适用于肾脏总RNA的提取,心脏总RNA的提取效果均不理想。进一步采用剪刀剪碎法、研钵加液氮研磨法、离心柱法对心肌组织总RNA的提取研究发现,研磨法提取出的总RNA量大,质量可靠,而剪碎法对于一些实验条件较差的地区仍然是一种可取的方法,其中过柱法对于少量心肌组织的提取较为适合^[9]。以上这些研究均表明,在提取各组织总RNA时,一定要考虑到每种组织的差异性,选择合适的方法才能提取到所需要的总RNA,以期后续实验提供基础。

在软骨组织总RNA提取方面,国内报道的文献多见于使用Trizol方法提取^[10-14],只有几篇涉及到软骨组织提取方法的比较研究,其中刘玉刚等^[15]通过采用一步法、Trizol法、plantRNAout法和一步法结合plantRNAout法4种方法,对兔膝关节软骨组织总RNA的提取进行了相关比较研究,

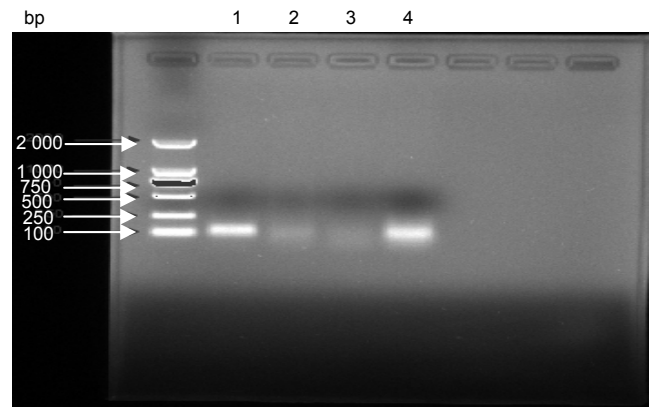


图2 转化生长因子β1 PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Figure 2 Agarose gel electrophoresis pattern of PCR products of transforming growth factor β1

图注:1:RNeasy® Mini Kit法;2:RNAout法;3:Trizol法;4:肝(Trizol法)。RNeasy® Mini Kit法提取的RNA,扩增出所需要的目的基因条带,且未见其他特异性扩增产物。

他们得出了与传统文献报道的提取软骨组织总RNA方法不同的观点:一步法、Trizol法、plantRNAout法获得的总RNA均含有蛋白多糖污染或DNA污染,不能满足实验需要,用一步法结合plantRNAout法提取的总RNA纯度高、完整性和稳定性好,能成功反转录合成双链cDNA。在国外报道中,有学者曾使用非Trizol法和试剂来提取软骨RNA^[15-18],虽然均报道提取成功,但这些研究未能提供足够的证据来说明所提取RNA的完整性和质量,另外,Smale等^[19]运用三氟醋酸铯溶液梯度离心法先分离蛋白多糖与RNA,逐步沉淀RNA,也成功从软骨组织提取总RNA。Geyer等^[20]报道的采用无苯酚/氯仿的方法也成功的从软骨中提取到了质量高的总RNA。而Mallein-Gerin等^[21]在提取关节软骨总RNA时,把蛋白酶K加入到裂解液中,先使蛋白多糖分解,再除去蛋白酶,其获取的总RNA完成了后续的RT-PCR。McKenna等^[22]在实验中发现,应用植物RNA提取试剂能够防止蛋白多糖污染,然后再用DNA酶消除DNA污染,其所获得的总RNA能够满足后续实验需要。上述这些方法在裂解软骨时均加入其他试剂,且步骤繁琐,提取时间较长,无疑都增加了总RNA被RNA酶污染的机会,也增加了RNA降解的机会。因此,如何寻求一种快速、简便的关节软骨总RNA提取方法至关重要。

所以,从目前研究结果来看,作者认为,以往国内文献报道的采用传统Trizol法来提取大鼠软骨RNA的方法欠妥,其法所提取的RNA的纯度和完整性满足不了后续实验的要求,这可能由于软骨组织中只含有少量的细胞和大量的细胞外基质分子所造成,而且大鼠本身膝关节软骨组织量比较少,其组织特殊性要求在提取RNA时一定要采用合适的方法,方能得到满意的结果,虽然刘玉刚等报道的一步法结合plantRNAout法提取的总RNA效果好,但是,其操作相对复杂,而本次实验采用RNeasy® Lipid Tissue Mini

Kit法提取的软骨RNA,不仅操作简单,整个操作过程只需15 min左右,而且其纯度和完整性较好,为后续实验的成功奠定了基础。

作者贡献:设计、评估为第一作者,实施为全体作者,均受过专业培训,第一作者成文并对文章负责。

利益冲突:文章及内容不相关利益冲突。

伦理要求:没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语:RNase 酶-非常稳定,是导致RNA降解最主要的物质。它在一些极端的条件可以暂时失活,但限制因素去除后有迅速复性。用常规的高温高压蒸气灭菌方法和蛋白抑制剂都不能是RNase完全失活。它广泛存在于人的皮肤上,因此,在与RNA制备有关的分子生物学实验时,必须戴手套。RNase的又一污染源是取液器,根据取液器制造商的要求对取液器进行处理。

作者声明:文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 朱玉贤,李毅,郑晓峰.现代分子生物学[M].北京:高等教育出版社,2007,11.
- [2] 杜中军,徐兵强,黄俊生,等.一种改进的富含多糖的芒果组织中完整总RNA提取方法[J].植物生理学通讯,2005,41(2):202-204.
- [3] Vincourt JB, Lionneton F, Kratassiouk G, et al. Establishment of a reliable method for direct proteome characterization of human articular cartilage. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5(10):1984-1995.
- [4] Chockalingam PS, Varadarajan U, Sheldon R, et al. Involvement of protein kinase C ζ in interleukin-1 β induction of ADAMTS-4 and type 2 nitric oxide synthase via NF- κ B signaling in primary human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2007;56(12):4074-4083.
- [5] Ruettger A, Schueler S, Mollenhauer JA, et al. Cathepsins B, K, and L are regulated by a defined collagen type II peptide via activation of classical protein kinase C and p38 MAP kinase in articular chondrocytes. *J Biol Chem*. 2008;283(2):1043-1051.
- [6] 翟吉良,翁习生,邱贵兴.骨关节炎动物模型的建立及选择[J].中国矫形外科杂志,2007,15(11):843-845.
- [7] 张磊,陆小军,应斌武.昆明小鼠不同组织RNA提取方法的比较[J].中华医院感染学杂志,2009,19(22):3027-3029.
- [8] 郭俊良,胡靖扬,高顺玉.昆明小鼠不同组织RNA提取方法的比较[J].楚雄师范学院学报,2011,26(3):84-88.
- [9] 张宏山,许明,张阳,等.小鼠心肌组织3种总RNA提取方法比较[J].临床心血管病杂志,2010,26(2):149-150.
- [10] 陈亮.外源性核心蛋白聚糖对关节软骨细胞外基质影响的实验研究[D].重庆:第三军医大学:外科学,2012.
- [11] 张鹏.抑瘤素M在膝关节骨关节炎中的表达[J].济南:山东大学:外科学,2012.
- [12] 闵自信,杜小云,宁启兰,等.两种实时定量RT-PCR方法检测miRNAs表达的技术分析[J].西安交通大学学报:医学版,2013,34(2):258-262.
- [13] 张荣凯,李国威,方航,等.一种提取大鼠膝关节软骨下骨总RNA的方法[J].中华实验外科杂志,2012,29(4):767-768.
- [14] 王健.TGF- β 1在大鼠半月板发育过程中表达研究[D].沈阳:中国医科大学:运动医学,2011.
- [15] 刘玉刚,胡旭,付建军,等.一种富含多糖的关节软骨组织总RNA提取方法初探[J].第三军医大学学报,2009,31(24):2495-2497.
- [16] McKenna LA, Gehrsitz A, Soder S, et al. Effective isolation of high-quality total RNA from human adult articular cartilage. *Anal Biochem*. 2000;286(1):80-85.
- [17] Smale G, Sasse J. RNA isolation from cartilage using density gradient centrifugation in cesium trifluoroacetate: an RNA preparation technique effective in the presence of high proteoglycan content. *Anal Biochem*. 1992;203(2):352-356.
- [18] Thorp BH, Armstrong DG, Hogg CO, et al. Type II collagen expression in small, biopsy-sized samples of cartilage using a new method of RNA extraction. *Clin Exp Rheumatol*. 1994;12(2):169-173.
- [19] Smale G, Sasse J. RNA isolation from cartilage using density gradient centrifugation in cesium trifluoroacetate: an RNA preparation technique effective in the presence of high proteoglycan content. *Anal Biochem*. 1992;203(2):352-356.
- [20] Geyer M, Grassel S, Straub RH, et al. Differential transcriptome analysis of intraarticular lesional vs intact cartilage reveals new candidate genes in osteoarthritis pathophysiology. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(3):328-335.
- [21] Mallein-Gerin F, Gouttenoire J. RNA extraction from cartilage. *Methods Mol Med*. 2004;100:101-104.
- [22] McKenna LA, Gehrsitz A, Soder S, et al. Effective isolation of high-quality total RNA from human adult articular cartilage. *Anal Biochem*. 2000;286(1):80-85.