

锦鲤保护性组织 RNA 提取及引物扩增研究

王亚军, 刘必谦, 吴立山, 洪松柏

(“应用海洋生物技术”教育部重点实验室, 宁波大学海洋生物工程省重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 从养殖锦鲤各种组织中提取完整的 RNA, 是分子生物学研究锦鲤应激表达、体色变异、生长发育等功能基因表达的关键实验。在不伤害养殖锦鲤个体健康的情况下, 取用鱼体的鳍条、鳞片、鳃丝、血液 4 种保护性组织, 可以最大程度地减少对珍贵锦鲤个体的损伤, 并达到研究相关基因表达的目的。本研究利用 TR izol 法提取 RNA, 获得的各样品 RNA 条带完整、纯度高。结果表明, 4 种保护性组织提取的 RNA 经过逆转录反应, 得到了高质量的 cDNA。内标基因 (β -actin)、热激蛋白基因 (hsp70)、金属硫蛋白基因 (MT) 扩增得到清晰的条带, 通过 NCB 数据上的 BLAST 比对证明, 各序列的同源性在 95% 以上。利用本研究的方法, 可以充分保护养殖锦鲤个体的完好性, 用于进一步的分子生物学研究。

关键词: 锦鲤; 保护性组织; RNA 提取; 引物扩增

中图分类号: S917 文献标志码: A 文章编号: 1674-3075(2008)02-0116-04

锦鲤是淡水养殖观赏鱼中的精品, 被称为水中宝石, 经过长时间的人工筛选, 已经形成了众多花色和品系。随着观赏、养殖的不断发展, 国内外对锦鲤的研究项目曾上升趋势; 特别是结合形态学、生理学, 在锦鲤体形、体色及生长等各方面的研究中, 基于分子生物学的相关研究必须用到 DNA、RNA 样品, 相关报道中养殖个体的取样是以鱼体的肌肉、肝脏、脑等组织为主, 这些组织的取样会对养殖锦鲤造成致命性的伤害, 极易造成个体的感染死亡, 相对于珍贵的养殖个体, 在保证获得良好实验目的情况下, 取用对个体相对危害性较小组织成为了开展研究的出发点。本研究重点比较了鳍条、鳞片、鳃丝、血液 4 种保护性组织, 用于提取高质量总 RNA 技术要点, 并且利用获得的 RNA 进行反转录反应及相关基因的引物扩增。RNA 提取最大的困难是其容易降解, 外源性和内源性的 RNA 酶污染很难控制。在整个提取分离的过程中, 有很多方法可以运用, 如异硫氰酸胍/氯化铯法、硫氰酸胍/热酚法、氯化胍法、氯化锂/异硫氰酸胍法等, 以及现在使用较多的 TR izol 法, 各种方法都有一定的特点、优势 (王桂玲等, 2003; 杨受保等, 2007; 邓莉等, 2005; Bart Verheyden et al 2003; S Nuyts et al 2001; P Chm czynski & N Sacchi 1987)。

本研究采取 TR izol 法提取了养殖锦鲤的鳍条、鳞片、鳃丝、血液 4 种组织, 得到了较高质量的 RNA, 并用相关基因的引物进行了 RT-PCR 扩增, 得到了较为满意的结果, 取样的个体活力及健康性不受影响, 为从分子生物学上进一步研究锦鲤打下了最为基础和关键的一步。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用的养殖观赏锦鲤取自浙江宁波大学海洋生物工程重点实验室养殖基地, 为红白双色个体, 体长 40 cm, 体重 2.5 kg。用撒网从池中捕出, 2.5 mL 无菌注射器尾静脉取血, 组织样品经过 PBS 清洗后放入 1.5 mL 离心管中, 液氮冻存运输回实验室, -80℃超低温冰箱保存。

1.2 实验器皿的处理

玻璃器皿、剪刀、镊子等清洗干净后在 200℃烘烤 8 h。离心管、移液枪头用 0.1% 的 DEPC (焦碳酸二乙酯) 溶液浸泡过夜, 并在 121℃高压灭菌 30 min 以除去 DEPC, 100℃烘干备用。

1.3 试剂

①磷酸盐缓冲溶液 (PBS): 1.15 g 磷酸氢二钠、0.12 g 磷酸二氢钾、8 g 氯化钠、0.12 g 氯化钾、pH 值 7。

②TR izol (Invitrogen 产品)、氯仿、异丙醇、75% 乙醇、DEPC 处理水。

③M-MLV 逆转录酶、Oligo dT₁₈ 反转录扩增体

系。

收稿日期: 2007-08-03

通讯作者: 刘必谦

作者简介: 王亚军, 1976 年生, 男, 浙江仙居人, 硕士, 实验师, 研究方向为海洋生物健康养殖与遗传育种。

④ β -actin引物、热激蛋白 hsp90引物、PCR扩增体系。

⑤琼脂糖、10×凝胶加样缓冲液。

以上溶液均用 0.1% DEPC 水配置, 灭菌处理。

1.4 方法

①取样: 用 2.5 mL 注射器, 从锦鲤的尾静脉取血, 10 000 r/min 离心取血细胞。用处理过的剪刀、镊子从鳃、鳍、鳞取 30 mg 左右组织, 迅速将各组织剪碎。

②在 1.5 mL 离心管中加入 300 μ L TRIzol 再加入各组织, 旋涡振荡 30 s。

③再补加 700 μ L trizol 旋涡振荡 1 min, 冰上静置 5 min。

④加入 0.2 mL 氯仿, 振荡 15 s 静置 2 min, 4℃ 离心, 12 000 r/min 离心 15 min 取上清。

⑤加入 0.5 mL 异丙醇, 将管中液体轻轻混匀, 室温静置 10 min。

⑥4℃、12 000 r/min 离心 10 min 弃上清。

⑦加入 1 mL 75% 乙醇, 轻轻洗涤沉淀; 于 4℃、7 500 r/min 离心 5 min 弃上清。

⑧倒置晾干, 加入适量的 DEPC H₂O 溶解 (65℃ 促溶 3~5 min)。

⑨琼脂糖电泳检测, -80℃超低温冰箱保存。

1.5 浓度和纯度检测

分离的总 RNA 用经 DEPC 处理水稀释后, 利用分光光度计测定 260 nm 的吸光值, 计算 RNA 浓度。在紫外分光光度计上检测 230 nm、260 nm 和 280 nm 的吸光值, 以计算 A_{260}/A_{230} 、 A_{260}/A_{280} 比值检测 RNA 质量; 并且在琼脂糖凝胶上检测提取样品的完整性。

1.6 RT-PCR 特异性引物扩增

利用从 NCBI 上获得的锦鲤的相关序列, 设计了肌动蛋白 β -actin, 热激蛋白 hsp70 金属硫蛋白 MT 各基因的引物, 扩增 mRNA 反转录产物。

2 结果与分析

采用 Invitrogen 公司的 TRIzol 试剂提取的 RNA 质量高、纯度好, 相比较其它公司的产品具有一定的优势。本研究用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 以不出现拖带、降解 smear 为标准, 在普通 DNA 电泳仪上, 在较高的电压下, 跑胶时间缩短至 3~5 min, 这种方法可以有效地防止缓冲液中降

解总 RNA 的作用, 提供真实的 RNA 提取实验效果, 此方法简单、快捷、有效。

从电泳凝胶图 1 中可以看到, 28S、18S 和 5S 的 rRNA、mRNA 分散在 3 条亮带之间。可以看出各样品提取的 RNA 完整性较高, 28S 和 18S rRNA 没有出现降解现象。图 2 的反转录产物电泳可以看到, 样品呈 smear 状分布, 所获得的 cDNA 可以用于进一步的特异性引物扩增。图 3~图 5 中用所设计的引物扩增反转录 cDNA, 经过克隆和测序, 获得了 406 bp 的肌动蛋白基因片段, 163bp 热激蛋白及 225 bp 的金属硫蛋白基因片段, 通过 NCBI 数据上的 BLAST 比对证明, 各序列的同源性在 95% 以上, 其中 MT 为 99%。

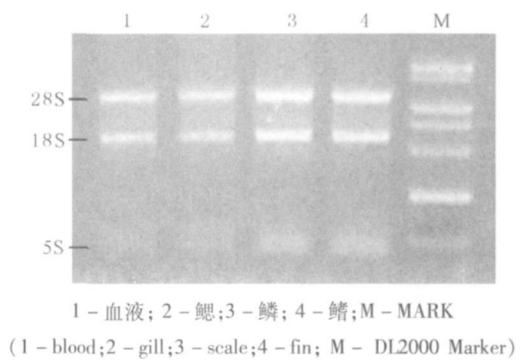


图 1 RNA 电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis of RNA extraction

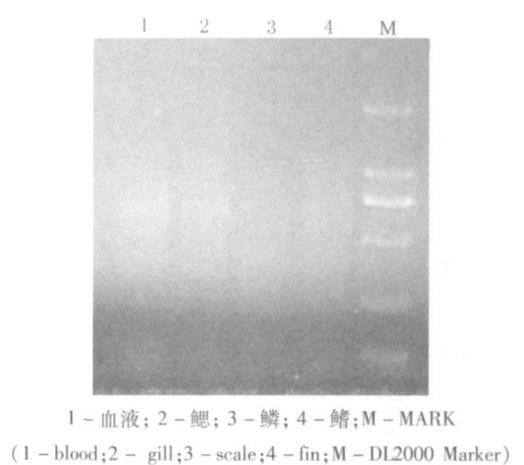
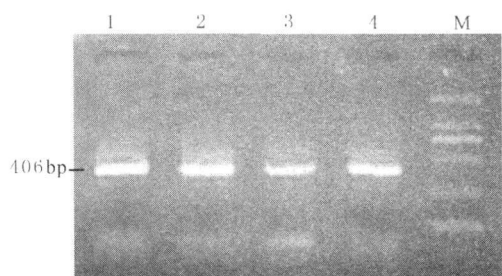


图 2 反转录产物电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis of RT-PCR

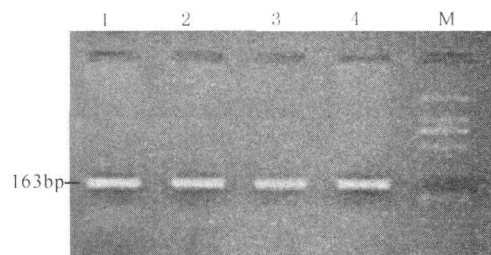
通过获得鳍、鳞、鳃、血 4 个组织的 RNA, 经过逆转录实验, 能够得到高质量的 cDNA。根据鲤鱼 mRNA 序列设计获得的热激蛋白 hsp70 肌动蛋白 (β -actin)、金属硫蛋白 (MT) 引物扩增, 电泳分析可以获得较清晰的条带, 经过克隆测序, 用于这些基因的进一步研究。



1 - 血液; 2 - 鳃; 3 - 鳞; 4 - 鳍; M - MARK
(1 - blood; 2 - gill; 3 - scale; 4 - fin; M - DL2000 Marker)

图 3 肌动蛋白 (β -actin) 引物扩增电泳图谱

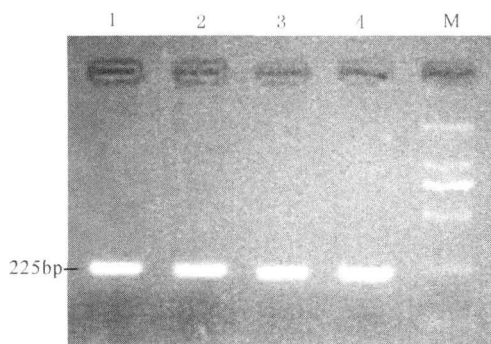
Fig. 3 Electrophoresis of product amplified by β -actin primer



1 - 血液; 2 - 鳃; 3 - 鳞; 4 - 鳍; M - MARK
(1 - blood; 2 - gill; 3 - scale; 4 - fin; M - DL2000 Marker)

图 4 热激蛋白 (*hsp70*) 引物扩增电泳图谱

Fig. 4 Electrophoresis of product amplified by *hsp70* primer



1 - 血液; 2 - 鳃; 3 - 鳞; 4 - 鳍; M - MARK
(1 - blood; 2 - gill; 3 - scale; 4 - fin; M - DL2000 Marker)

图 5 金属硫蛋白 (MT) 引物扩增电泳图谱

Fig. 5 Electrophoresis of product amplified by MT primer

3 讨论

锦鲤作为大型观赏性淡水珍品鱼类, 在检测个体的生长、发育、疾病控制和特定的体色控制、生长调控的研究中, 如何能有效地保护珍贵个体的完整

性, 又可以顺利地开展科学研究, 是摆在科研人员面前的一个大问题。利用养殖锦鲤的鳍、鳞、鳃、血液等保护性组织来提取总 RNA, 样品的完整性好、质量高, 可以用于基于总 RNA 的所有分子实验, 包括 RT-PCR、特异性引物扩增目的基因片段、克隆测序、功能基因的表达等研究。

各保护性组织中, 鳞、鳍的再生能力较强, 取样后的个体在一段时间后会自动长出组织。相比较, 鳞对鱼体的影响最小, 取鳃组织对鱼体可能会有影响, 但取样的量相对较少, 锦鲤的个体生长没有影响。从侧线处尾静脉取血液组织, 仅 5 μ L 左右的量就能提取大量的总 RNA, 养殖个体经过挤压止血、消毒, 能够很好地保护鱼体不受影响。在 RNA 质量方面, 4 个组织都能提取出高质量的总 RNA, 没有基因组 DNA 的残留。血液组织在提取 RNA 的量方面要高于其它 3 种组织, 鳞、鳃、鳍各组织样品都可以用处理过的剪刀迅速剪切来完成对样品的预处理, 相比较液氮研磨, 更加简单、快速、有效。利用本研究方法获得的总 RNA, 经过后续的实验证明具有较高的纯度和完整性, 可以用于基于 RNA 的一切分子操作和研究。

参考文献:

- 邓莉, 马春明, 袁琼兰, 等. 2005 用 TRIzol 试剂抽提新生鼠脑组织总 RNA [J]. 泸州医学院学报, 28: 505-506
- 王桂玲, 刘戈飞, 黄东阳. 2003 从动物组织提取高质量总 RNA 方法的改进 [J]. 生物技术通讯, 14: 512-514
- 杨受保, 王建明, 徐胜威. 2007 淡水育珠蚌的 RNA 提取与 RT-PCR 分析 [J]. 水利渔业, 27(3): 10-99
- Bart Verheyden, Anne Thielmans et al. 2003 RNA extraction for quantitative enterovirus RT-PCR: comparison of three methods [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 33: 819-823
- P Chomczynski & N Sacchi. 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Anal Biochem, 162: 156-159
- S Nuyts, L Van Mellaert, P Lambin et al. 2001. Efficient isolation of total RNA from Clostridium without DNA contamination [J]. Journal of Microbiological Methods, 44: 235-238

(责任编辑 万月华)

The Research of RNA Extraction and Primer Amplification from Protective Tissues of the Koi (*Cyprinus carpio*)

WANG Ya-jun, LIU Bi-qian, WU Li-shan, HONG Song-bai

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education,
Ningbo University Marine Biotechnology Key Lab, Ningbo 315211, China)

Abstract The integrity of RNA extracted and purified from various organizations is a key step for molecular biology research to genes of koi in growth and development, stress-express and variation of body color. With reducing harm to precious individual in the maximal degree, The protective tissues of fins, scales, gills and blood can be researched for the expression of genes at the same time. Total RNA was extracted by means of TRIzol, these RNA have complete fragment and high purity. The results showed that the CDNA reversed from RNA of these organizations have high quality. The PCR obtained distinct bands amplified by the primers of β -actin, hsp70 and MT, the highest comparability 95% is show when these sequences are compared using BLAST aligning on NCBI. In summary, this method can fully protect the individual integrity of Koi, which would be beneficial for the further research of molecular biology.

Key words ornamental carp, protective tissues, RNA extraction, primer amplification