

中华绒螯蟹眼柄视上神经节和肌肉总 RNA 提取的比较

孙 婧 赵晓瑜 穆淑梅 康现江

(河北大学生命科学学院,河北 保定 071002)

摘 要 用 Trizol 法抽提出中华绒螯蟹眼柄视上神经节的总 RNA 和肌肉的总 RNA,紫外分光光度计检测 2 种总 RNA 的纯度,1.0 %琼脂糖凝胶电泳检测分析 RNA 的质量。实验结果表明,眼柄视上神经节和肌肉的总 RNA 纯度均较高,完整性较好,RNA 基本无降解,总 RNA 的含量和纯度均可以用于后续的抑制消减杂交实验,为构建中华绒螯蟹眼柄视上神经节特异性表达的 cDNA 文库打下了良好的基础。

关键词 中华绒螯蟹 眼柄视上神经节 肌肉 总 RNA

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 俗称河蟹、毛蟹,属高等甲壳动物,在动物分类地位上隶属于节肢动物门,甲壳纲,十足目,爬行亚目,方蟹科,绒螯蟹属。由于原产我国,且两只大螯上密生绒毛,故把它命名为中华绒螯蟹^[1]。

十足目甲壳动物眼柄的 X 器官窦腺复合体(X-organ sinus gland, XO-SG)是甲壳类重要的神经内分泌调节系统之一,其内分泌激素一直是甲壳动物生理学研究的热点之一。眼柄中的神经血窦器即窦腺,具有储存神经分泌产物的作用,用生化技术已确定 XO-SG 系统释放的产物为肽类神经激素,按功能分为五大类:红色素浓缩激素、色素弥散激素、甲壳类高血糖激素、蜕皮抑制激素和性腺抑制激素^[2],这些激素对多种重要的生理活动均有调控作用。其中蜕皮抑制激素和性腺抑制剂激素都是影响河蟹性早熟的因素^[3],目前用生化手段对河蟹性早熟机理的研究,主要是针对其蜕皮抑制激素进行的^[4-6],而性腺抑制激素的分子生物学机制,现在还在研究阶段。

本文以中华绒螯蟹眼柄视上神经节和肌肉为实验材料,比较二者在总 RNA 提取过程上的异同,并分析 RNA 提取液质量。为进一步以两种 RNA 为基础,用抑制消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)的方法来构建眼

柄视上神经节特异性表达的 cDNA 文库做准备工作。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用中华绒螯蟹于 2008 年 9 月购自白洋淀,选取体重在 25~35 g 一龄雌性幼蟹于水族箱(100 cm × 40 cm × 50 cm)中暂养,水位 10 cm 左右,缸底铺细沙,间歇充氧,循环水,饲喂混合食物(小鱼、土豆、水草等)。

1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒(Trizol Reagent, TIAN-GEN),RNAlacker(天泽基因工程有限公司),氯仿(分析纯),异丙醇(分析纯),RNase-free ddH₂O,DEPC,75 %乙醇(0.1 % DEPC 水配制)。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 的提取 Trizol 法抽提总 RNA 的大致步骤为:30~50 mg 组织样品加入 1 mL Trizol,匀浆处理后室温静置 5 min。加入 0.2 mL 氯仿,剧烈震荡 15 s,室温静置 3 min。4 ℃,12 000 r/min 离心 15 min,取上清(约 0.6 mL),加入 0.6 mL 的异丙醇,混匀,-70 ℃静置 30 min。4 ℃,12 000 r/min,离心 10 min,弃上清,加入 1 mL 75 %乙醇洗涤沉淀。4 ℃,5 000 r/min,离

基金项目:河北省自然科学基金“中华绒螯蟹性腺抑制激素基因的克隆与表达(C2008000591)”。

作者简介:孙婧(1983-),女,河北省承德市人,河北大学在读硕士。主要研究方向:动物生殖、发育及其调控。

心 3 min,弃上清,室温放置晾干,加入 0.02 mL RNase - free ddH₂O,4 充分溶解 RNA 3 h。
- 70 保存样品。

在提取总 RNA 过程中,一些操作需要根据具体材料来改变,眼柄视上神经节和肌肉的总 RNA 提取过程中的一些区别,在表 1 列出。

表 1 中华绒螯蟹眼柄视上神经节和肌肉总 RNA 提取过程中的区别

总 RNA 提取过程中的不同	眼柄视上神经节	肌肉
取材	15 只河蟹眼柄视上神经节约 30 mg	肌肉 40 mg
解剖过程	在盛有 0.1 % DEPC 水的冰上的小培养皿中快速剥离眼柄的外壳和色素组织,将视上神经节快速取出,放入冰浴的 RNAlocker(0.5 mL)中保存,解剖后,将组织取出放入匀浆器加 1 mL TR-Izol 匀浆	取出肌肉后直接放入匀浆器中加入 1 mL TRIzol 手动匀浆
匀浆后离心	不需要	4 ,12 000 r/ min 离心 10 min 后取上清

1.3.2 紫外分光光度计检测 RNA 纯度 取两种 RNA 样品各 1 μ L,紫外分光光度计检测。

1.3.3 1.0 %琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量 取两种 RNA 样品各 1 μ L,各自加入 4 μ L RNase - free ddH₂O,1.0 %琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果分析

2.1 RNA 提取结果

眼柄视上神经节总 RNA 的解剖时间比较长,所以取好的组织需要在预冷的 RNAlocker 中进行保存,防止 RNA 降解。肌肉比较粘稠,而且不容易充分匀浆,所以在匀浆后仍然存在少量可见组织,需要离心来去除多余的肌肉组织,但是离心会使 RNA 的含量降低,所以在取肌肉(40 mg)的时候比取眼柄视上神经节(约 30 mg)多了一些。

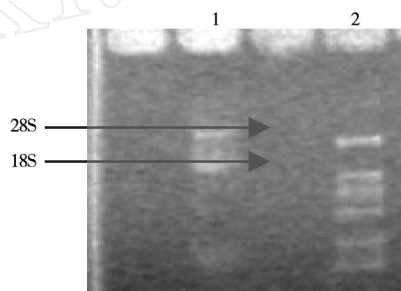
用 RNase - free ddH₂O 溶解 RNA 后,眼柄视上神经节的总 RNA 提取液略微呈现黑紫色,这可能与剥离色素组织不完全有关,但是并未影响后续实验;而肌肉的总 RNA 提取液几乎为透明状。

2.2 紫外分光光度计检测结果

表 2 眼柄视上神经节和肌肉总 RNA 紫外分光光度计检测结果

紫外分光光度计检测数据	眼柄视上神经节	肌肉
RNA 含量/ μ g $\cdot$ μ L ⁻¹	737	742.2
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	1.77	1.78

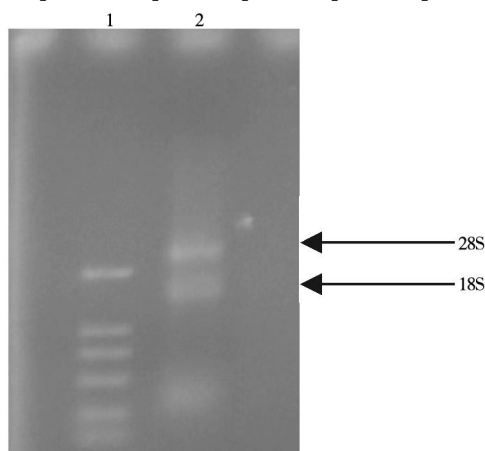
OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值可以反映 RNA 的纯度,如是否有蛋白质的污染等。Wilfinger^[7] 认为纯 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值应在 1.9 ~ 2.1(10 mmol/L Tris - Cl, pH 7.5);但当 pH 小于 7.5 时,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值也相应降低。本实验提取的 RNA 最后溶解于 RNase - free ddH₂O 中,pH 小于 7.5 (pH 约为 7.0),这可能是导致本实验中 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值偏低(1.77 和 1.78)的原因。



1:眼柄视上神经节总 RNA;2:Marker DL 2 000

图 1 眼柄视上神经节总 RNA 的提取电泳图

Marker DL 2 000,自上而下的条带依次为 2 000 bp,1 000 bp,750 bp,500 bp,250 bp,100 bp



1:Marker DL 2 000;2:肌肉总 RNA

图 2 肌肉总 RNA 的提取电泳图

Marker DL 2 000 ,自上而下的条带依次为} ,
1 000 bp ,750 bp ,500 bp ,250 bp ,100 bp

2.3 1.0 %琼脂糖凝胶电泳检测结果

提取到河蟹眼柄视上神经节和肌肉总 RNA ,
各取 1 μ L ,加入 4 μ L RNase - free ddH₂O ,跑
1.0 %的非变性琼脂糖凝胶电泳 ,电泳检验 ,结果
如图 1 和图 2 :

由图 1 和图 2 可以看出 :28 S 和 18 S 两条带
清晰可见 ,28 S 在 2 600 bp ,18 S 在 1 900 bp ,28
S RNA 的亮度约是 18 S RNA 的 2 倍 ,说明总
RNA 的纯度较高 ,完整性较好 ,RNA 基本无降
解 ,电泳无“拖尾” ,没有 DNA 污染。

3 讨论

3.1 总 RNA 提取过程

在提取 RNA 的过程中 ,尽量不要加入一些
没有必要的操作 ,并且操作过程速度要快 ,以保证
RNA 的完整性。

3.2 比较眼柄视上神经节和肌肉总 RNA 提取液的原因

以中华绒螯蟹眼柄视上神经节的总 RNA 作
为 tester 方 ,肌肉的总 RNA 作为 driver 方 ,进行
抑制消减杂交 (SSH) ,可以构建中华绒螯蟹眼柄
视上神经节特异性表达的 cDNA 文库。而利用
消减杂交法构建文库的一个关键性因素 ,就是需
要有足够含量以及纯度的 RNA。SSH 对 RNA

含量的要求为^[8] :0.5 ~ 1 μ g/ μ L ,从上述实验结
果可以看出 ,无论是眼柄视上神经节的 RNA 含
量 ,还是肌肉的 RNA 含量 ,均满足做 SSH 的要
求 ,说明这两个 RNA 提取物 ,可以进行下一步的
消减杂交实验 ,为构建消减文库做准备。

参 考 文 献

- [1] 金刚,李钟杰,方榕乐,等. 早熟河蟹的养殖生态学及渔业价值评估[J]. 水生生物学报, 1998, 22(2): 143 - 147
- [2] 宋霞,周开亚. 甲壳类的眼柄神经激素[J]. 动物学杂志. 2000, 35(4): 39 - 43
- [3] 李云峰,康现江,赵晓瑜,等. 河蟹性早熟发生的相关内在因素研究进展[J]. 水产科学, 2005, 24(2): 34 - 36
- [4] 宋霞,周开亚,马长艳. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素 1 (Ers - MIH1) 基因组 DNA 的分子克隆和序列分析[J]. 动物学报, 2004, 50(1): 85 - 92
- [5] 郭豫杰,周开亚,马长艳. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素 1 (Ers - MIH1) - GST 融合蛋白在大肠杆菌中的表达[J]. 中国水产科学, 2004, 11(1): 10 - 14
- [6] 宋霞,周开亚,马长艳,等. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素 1 (MIH1) 基因的 cDNA 片段克隆和 Northern 印迹分析[J]. 中国水产科学, 2003, 10(5): 353 - 358
- [7] Wilfinger WW, Mackey M, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity [J]. Bio Techniques, 1997, 22: 474 - 481
- [8] 张燕君,陈忠科,张红卫. 青岛文昌鱼神经胚中期 cDNA 文库的构建[J]. 山东大学学报, 2004, 36(1): 101 - 106

Campare and contract the distilling of total RNA in eyestalk and muscle in Eriocheir sinensis

Sun Jing Zhao Xiaoyu Mu Shumei Kang Xianjiang

(The College of Life Science, Hebei University, Baoding, Hebei, 071002)

Abstract In this experimentation, we distilled total RNA in eyestalk and muscle in Eriocheir sinensis, mensurated the pureness of RNA with spectrophotometer, measured and analysed mass of RNA with 1.0 % agarose gel, The experiment result proved that The total RNA in eyestalk and muscle were highly pure and integrity, almost not decomposed, and the both total RNA content can be used in the subsequent supression subtructive hybridization experimentation, providing favourable base for constructing the cDNA library of eyestalk speciality expression.

Key words Eriocheir sinensis eyestalk muscle total RNA

(收稿日期:2008 - 12 - 27)