

文章编号:1003-8701(2009)05-0041-04

鸡脂肪组织总 RNA 提取方法的优化和 RT-PCR 检测

邢晋祎¹, 姜运良^{2*}

(1. 临沂师范学院生命科学学院, 山东 临沂 276005; 2. 山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018)

摘 要: 提取完整的 RNA 是基因表达分析中的基础, 但由于脂肪组织含有大量的油脂, 所以从脂肪组织中提取高质量的 RNA 有一定的困难。在本研究中, 报道了经过优化 TRIzol 试剂操作程序成功地从肉鸡脂肪中分离出了完整、高质量、纯度好的总 RNA。用该方法提取的 RNA 显示清晰的 28S、18S 和 5S 三条带, OD_{260}/OD_{280} 均值为 1.893, 浓度均值为 $263 \mu\text{g/mL}$ 。保温试验与 RT-PCR 扩增鸡 LPL 和 GAPDH 基因的分析结果也证明了所提取的总 RNA 质量较高。

关键词: 鸡; 脂肪; RNA; 优化

中图分类号: S831

文献标识码: A

Optimization of Methods for Total RNA Extraction from Chicken Adipose and RT-PCR Detection

XING Jin-yi¹, JIANG Yun-liang^{2*}

(1. School of Life Science, Linyi Normal University, Linyi 276005; 2. School of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: Extraction of intact RNA is essential for gene expression analysis. The isolation of high-quality RNA from adipose tissue is difficult due to numerous lipids. In this paper, we reported a protocol which we have optimized based on the Invitrogen TRIzol procedures to produce high yields of purified fully intact RNA from broilers abdominal adipose. The total RNA isolated using this procedure demonstrated sharp, undegraded 28S, 18S, and 5S ribosomal RNA bands. The average ratio OD_{260}/OD_{280} and concentration of RNA were 1.893 and $263 \mu\text{g/mL}$, respectively. Successful RNA extraction was also observed by heat preservation experiment. RT-PCR analysis of chicken LPL and GAPDH genes was used to verify the quality of the RNA.

Keywords: Chicken; RNA; Adipose; Optimization

从肉鸡脂肪中制备高质量、高纯度和完整性好的总 RNA 是进行肉鸡脂肪代谢等许多下游分子生物学试验的关键步骤, 比如 RT-PCR 基因表达分析、核酶保护检测、构建 cDNA 文库、Northern 杂交、RACE 以及 cDNA-AFLP 差异分析等分子

生物学研究的成效在很大程度上取决于 RNA 的质量。目前从动植物组织中提取总 RNA 的方法已有很多报道^[1-4], 但从肉鸡脂肪组织中提取总 RNA 的高效简便方法鲜有报道。因为脂肪细胞体积大, 数量少, 且含有大量脂质, RNA 丰度极低, 所以从脂肪组织中提取总 RNA 有一定的难度。因此, 寻求一种高效简便的鸡脂肪组织总 RNA 提取方法, 对于研究肉鸡脂肪的合成与分解, 转运与沉积的分子机理, 从而为保证肉鸡优良性状和提高生长速度, 控制优质肉鸡脂肪大量沉积, 为人类提供高质量的肉质食品, 减少脂肪在人类体内沉积

收稿日期: 2009-03-25

基金项目: 临沂师范学院博士启动基金(BS08026)

作者简介: 邢晋祎(1968-), 男, 博士, 副教授, 从事动物分子遗传学研究。

通讯作者: 姜运良, 男, 教授, E-mail: yljjiang723@yahoo.com.cn

导致的肥胖和心血管病的发生具有非常重要的意义。本研究在 TRIzol 试剂说明书的基础上,通过优化操作规程、改进操作步骤,摸索找到了一套从脂肪组织提取高质量、高纯度总 RNA 的方法,并成功地对鸡管家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)和特异表达基因脂蛋白脂酶(LPL)进行了 RT-PCR 扩增,为后续研究鸡脂肪代谢相关基因 mRNA 表达水平和脂肪细胞代谢的分子遗传机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 鸡脂肪组织采集

56 日龄 AA 肉鸡,颈静脉放血处死,立即手术取腹部脂肪组织,剪成小块后投入液氮速冻,然后转至 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2 试剂

TRIzol (Invitrogen)、M-MLV Reverse Transcriptase (Pomega),以下试剂均购自 TaKaRa 公司:Oligo(dT)₁₈、RNasin、DNase (RNase Free)、Taq DNA polymerase、dNTP Mixture、DNA Marker 2000、DEPC,常规试剂无水乙醇、氯仿、异丙醇均为国产 AR 级以上。

1.3 方法

1.3.1 脂肪组织总 RNA 提取

针对脂肪组织的特点,经过预试验,对 TRIzol 试剂说明书部分步骤进行了优化。具体操作如下:

(1)取脂肪组织 150~180 mg,放入用液氮预冷的研钵中迅速研磨,直到研成粉末状为止,待液氮基本挥发完时,在研钵中加 1.5 mL TRIzol 试剂收集样品,转入 Eppendoff 管中,在漩涡器上剧烈震荡 3~5 min,直至液体呈现无颗粒透明状态。室温(15~30℃,下同)放置 25~30 min,以使核蛋白复合物彻底解离以提高 RNA 得率。(2)4℃,12 000 r/10 min 离心,除去上层油层,将上清液转到另一个 Eppendoff,重复离心 1 次,完全除去脂类。(3)加入氯仿 0.3 mL,用力振荡 15 s,室温放置 2~3 min,4℃,12 000 r/15 min 离心,将上清液转移到另一个 Eppendoff (注意:勿将下层蛋白吸入,宁缺毋滥)。重复 1 次。(4)加入等体积新开瓶的预冷异丙醇,颠倒混匀,室温放 10 min。(5)4℃,12 000 r/10 min 离心,弃上清。(6)加入 1.5 mL 预冷 75%乙醇(RNase-free 水配制)震荡混匀,使 RNA 悬浮,达到残留的盐被洗去的目的,7 500 r/5 min 离心,弃乙醇后,稍离心 1~2 s,用枪头吸取液体,注意不要把 RNA 吸走。重复 1 次。(7)超净台风干 5~10 min,加

适量 RNase-free 水溶解 RNA,放 4℃,30 min。

1.3.2 总 RNA 的纯化

(1)1.5 mL 的 Eppendoff 中加入以下组分:总 RNA 25 μL、RNase Inhibitor 0.2 μL (40 U/μL)、DNase 2 μL (5 U/μL)、10×DNase Buffer 5 μL、双蒸水(RNase-free 水配制)加至 50 μL。(2)混匀,37℃温育 30 min 后,加入等体积酚/氯仿,剧烈混合后置冰上 10 min。(3)4℃ 12 000 r/10 min 离心。(4)移上清入一新 Eppendoff,加 8 μL 3M 乙酸钠(pH5.2)、200 μL 预冷无水乙醇混匀,-70℃放置 30 min 沉淀 RNA。(5)4℃ 12 000 r/20 min 离心,弃上清,加 500 μL 70%的乙醇(RNase-free 水配制)洗涤沉淀 1 次。(6)4℃小于 7 500 r/8 min 离心,弃乙醇,用枪头尽量吸净残留液体,超净台干燥 5~10 min 后,加适量 RNase-free 水溶解 RNA(20 μL 左右)。

1.3.3 总 RNA 质量的检测

1.3.3.1 测定吸光度

分别测定样品在 260 和 280 nm 处的吸光值,并计算各样品 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值,估算 RNA 的纯度和浓度^[5]。

1.3.3.2 琼脂糖凝胶电泳

取 2 μL 总 RNA 在 1%的琼脂糖凝胶电泳上观察 RNA 的质量和产量。

1.3.3.3 保温试验

吸取约 1 000 ng 的 RNA 样品加入到 0.5 mL Eppendoff 中,并且用 pH7.0 的 Tris 缓冲液补充到 10 μL 的总体积,然后密闭管盖。把其中一份放入 70℃的恒温水浴中,保温 1 h。另一份放置在 -20℃冰箱中保存 1 h。然后取 2 μL 总 RNA 在 1%的琼脂糖凝胶电泳上再次观察 RNA 的质量。

1.3.3.4 RT-PCR 检测

表 1 RT-PCR 引物

基因	引物序列	产物大小(bp)
LPL	F: 5' - GGATTGCTGGAAGTTTAACCAAG-3'	327
	R: 5' - AGAGATGGATGGATCGTTCATGA-3'	
GAPDH	F: 5'- CTACACACGGACACTTCAAG-3'	244
	R: 5'- ACAACATGGGGGCATCAG-3'	

以总 RNA 为模板,合成 cDNA 第一链,方法按照 M-MLV Reverse Transcriptase 说明书进行。以 NCBI 数据库登录的鸡 GAPDH (登录号:NM_204290) 和 LPL (登录号:X14670) 基因的 mRNA 序列设计跨内含子引物(见表 1),扩增鸡 GAPDH 和 LPL 基因进一步检测 RNA 的质量。PCR 反应条件为:94℃ 3 min→(94℃ 30 s;59℃ 30 s;72℃ 1 min)×30;72℃ 7 min。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的吸光度分析

用上述方法提取的总 RNA 的光密度值和浓

度如表 2 所示,可见 OD_{260}/OD_{280} 在 1.816~1.949 之间,平均为 1.893, RNA 浓度在 237~286 $\mu\text{g/mL}$ 之间,平均为 263 $\mu\text{g/mL}$,表明提取的总 RNA 纯度较好。

表 2 脂肪总 RNA 的纯度和浓度

样本号	1	2	3	4	5	6	7	8	均值
OD_{260}	0.083	0.073	0.078	0.069	0.073	0.075	0.077	0.076	0.076
OD_{280}	0.043	0.039	0.041	0.038	0.039	0.04	0.040	0.039	0.039
OD_{260}/OD_{280}	1.930	1.872	1.902	1.816	1.872	1.875	1.925	1.949	1.893
浓度($\mu\text{g/mL}$)	273	260	286	237	252	258	275	261	263

2.2 琼脂糖凝胶电泳结果

提取的总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,结果见图 1。从图 1 中可见,总 RNA 在凝胶上显示出 3 条清晰的条带,分别为 28S、18S 和 5S,并且 28S 的亮度在 18S 条带的两倍以上,说明所提取的 RNA 完整性较好,无拖尾降解现象。

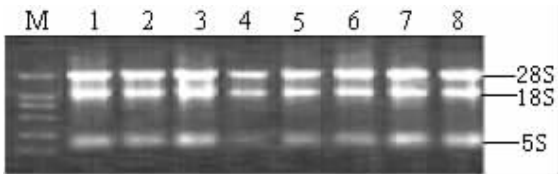


图 1 RNA 凝胶电泳图

2.3 保温结果

保温时间结束后取两份样本在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,结果如图 2 所示。可知在 70℃ 和 -20℃ 保温的 RNA 电泳条带基本一致,没有明显差别,说明 RNA 溶液中没有残留的 RNA 酶污染, RNA 的质量良好。

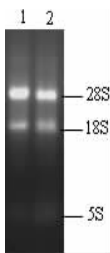


图 2 RNA 保温试验结果

1 为保温 70℃ 的 RNA, 2 为 -20℃ 保温的 RNA

2.4 RT-PCR 结果

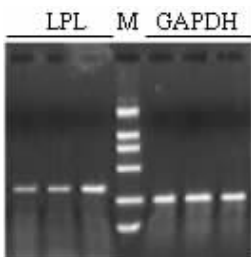


图 3 LPL 和 GAPDH 基因 RT-PCR 结果

为进一步验证所提取鸡脂肪总 RNA 能否用

于 RT-PCR 等实验,以提取的总 RNA 反转录合成的 cDNA 为模板,扩增鸡 GAPDH 和 LPL 基因。RT-PCR 产物电泳结果表明,可扩增出预定片段长度的基因序列,未见非特异性条带。这进一步说明所提取的 RNA 样品质量好、纯度高,可用于脂肪代谢相关基因表达分析等分子生物学实验。

3 讨论

目前,TRIzol 试剂具有操作简单,耗时短,已成为 RNA 提取中应用最广泛的方法。尽管如此,在实际进行 RNA 提取时不能千篇一律地按 TRIzol 试剂操作说明书进行,而应该针对不同动植物组织的特点有选择地、灵活地运用。因每种组织的成分、RNA 含量不同,脂肪组织与同等重量的其他组织相比,所含有的细胞数量少, RNA 丰度低 ($<0.05\text{ }\mu\text{g/mg}$),且有大量的油脂,对提取产生干扰,按照 Trizol 试剂说明书提取脂肪组织总 RNA 的效果并不理想。针对这种情况,本实验通过加大脂肪组织的用量,相应地 Trizol、氯仿、异丙醇等试剂也成比例增加,并且保证组织研磨彻底,延长裂解时间,增加离心和氯仿抽提的次数,尽量完全除去油脂。另外,提取脂肪组织总 RNA 时常伴有高分子量基因组 DNA 的污染,这对于后续的 RT-PCR 分析基因表达差异时,容易造成 PCR 假阳性结果,引起错误判断。为此,对提取的总 RNA 用 DNase 进行了纯化,以求获得高质量无 DNA 污染的 RNA。

除了上述优化步骤以外,在实验过程中还应注意以下几点:

①在提取 RNA 之前,一定打扫好周围环境,彻底用 3% 的双氧水把桌面、各种仪器和器材擦拭干净。②实验前穿戴工作服、口罩和帽子,操作过程中应自始至终佩戴抛弃式橡胶或乳胶手套,并经常更换,以避免将手、臂上的细菌和真菌以及人体自身分泌的 RNA 酶带入试管或污染工具。尽量避免使用抛弃式塑料手套。塑料手套不贴身,常

常造成操作不便,而且多出部分还容易在器具上遭 RNA 酶污染并向未污染处传递,扩大污染。③所有用于 RNA 提取的耗材和器具都必须进行严格的去 RNase 处理。④所有用于 RNA 提取的试剂都必须用去离子水进行配制,之后再进行去 RNase 处理。⑤尽量用高纯度的原料配制相关试剂,而且必须是专用的,在实验中只使用一次性的塑料制品或者是高温处理过的金属制品保存试剂;试剂和耗材的处理过程中也应该注意对 RNase 的防护,试剂应该在配制好之后尽量分装成一次性使用的包装,这样可以保证每次实验都使用新鲜的试剂。⑥样品在研钵中研磨过一次后,再次加入液氮时一定从一边轻轻加入,因脂肪密度小,如加入液氮过猛很容易使样品粉末溅出,从而降低了 RNA 的得率。⑦加入异丙醇后不要放 -20℃ 或 4℃ 静置,因低温容易有盐类析出。

长期以来人们认为脂肪组织仅是一个被动储存脂质的仓库,直到 1994 年发现瘦素(Leptin)^[6]后才进一步确定了脂肪组织不仅是一个储存能量的场所,而且也是一个重要的内分泌器官^[7]。现在已知脂肪组织能表达和分泌一些生物活性肽物质(脂肪因子),这些物质可以起自分泌、旁分泌和内分泌的作用^[8]。这些脂肪因子能对改变生理和代谢需求做出反应,这些因子涉及到维持能量平衡和改变能量底物的利用动态。前脂肪细胞在分化早期一些基因就开始表达,比如 LPL 基因就是脂肪细胞分化早期首先表达的基因^[9]。因 LPL 是肌肉组织和脂蛋白代谢的关键限速酶,由脂肪组织和骨骼肌细胞合成分泌,主要作用是促进脂肪酸代谢,将乳糜微粒(CM)和极低密度脂蛋白(VLDL)中的三酰甘油分解成脂肪酸和甘油,并贮存在脂肪组织中,所以 LPL 控制着脂肪和肌肉中甘油三酯(TG)的分配。LPL mRNA 在脂肪组织和心脏中表达最高。鉴于 LPL 在脂类代谢过程中的生物学功能,可将 LPL 基因作为脂肪沉积的候选基因。近年来,人们在追求肉鸡生产性能的同时也带来

一系列问题,其中最明显的就是肉质下降,脂肪(尤其是腹脂)含量越来越高,而肌肉脂肪含量越来越低。因而,通过分子生物学的方法研究 LPL 在肉鸡脂肪中表达水平变化的规律,对于揭示脂肪沉积的分子遗传机理具有重要的理论意义和应用价值。这就需要从脂肪组织中获得高质量的总 RNA。本实验针对肉鸡脂肪组织的特点,通过优化提取步骤,建立了一套适用于富含脂类的总 RNA 提取方法,为后续研究肉鸡脂肪代谢的分子遗传机理创造了条件。

参考文献:

- [1] Schultz D. J., Craig R., Cox-Foster D. L., et al. RNA isolation from recalcitrant plant tissue [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1994, 12(4): 310-316.
- [2] Coombs N. J., Gough A. C. and Primrose J. N. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue [J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27 (16): 12-17.
- [3] McKenna L. A., Gehrsitz A., Söder S., et al. Effective isolation of high-quality total RNA from human adult articular cartilage [J]. *Analytical Biochemistry*, 2000, 286 (1): 80-85.
- [4] Sharkey F. H., Banat I. M., Marchant R. A rapid and effective method of extracting fully intact RNA from thermophilic *Geobacilli* that is suitable for gene expression analysis [J]. *Extremophiles*, 2004, 8 (1): 73-77.
- [5] 萨姆布鲁克·J, 拉塞尔·D W, 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 分子克隆实验指南 [M]. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002, 518-525.
- [6] Zhang Y., Proenca R., Maffei M., et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [J]. *Nature*, 1994, 372: 425-432.
- [7] Trayhurn P., Beattie J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ [J]. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2001, 60: 329-339.
- [8] Kershaw E. E., Flier J. S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2004, 89(6): 2548-2556.
- [9] Kokta T. A., Dodson M. V., Gertler A., et al. Intercellular signaling between adipose tissue and muscle tissue [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2004, 27: 303-331.