

网络出版时间:2012-06-08 15:59

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120608.1559.013.html>

一种自制的 RNA 分离试剂及其在鱼组织 总 RNA 提取中的应用

徐 坤,李 铎,张优优,李陇平,麻丽霞,张智英

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】尝试自制一种价格低廉的 RNA 分离试剂,并检验其应用效果。**【方法】**以商业化的 TRizol Reagent 为对照,使用自制 RNA 分离试剂提取草鱼皮肤组织总 RNA,采用分光光度计法、变性琼脂糖凝胶电泳法和 RT-PCR 检测其品质,并用提取的总 RNA 合成草鱼皮肤 cDNA。同时使用自制 RNA 分离试剂提取斑马鱼总 RNA,通过 RT-PCR 进行 *E2F5* 基因全长(1 092 bp)的克隆,构建其真核和酵母表达载体并测序。**【结果】**使用自制 RNA 分离试剂提取草鱼皮肤组织总 RNA 的品质与用 TRizol Reagent 提取的总 RNA 品质相当,用之成功地合成了草鱼皮肤 cDNA。使用自制 RNA 分离试剂提取得到了更高品质的斑马鱼总 RNA,用之成功地克隆了斑马鱼 *E2F5* 基因,构建了其真核表达载体 pcDNA3.1-flag-Zf *E2F5* 和酵母表达载体 pGAD GH-Zf *E2F5*。**【结论】**自制 RNA 分离试剂能够用于鱼类组织总 RNA 的提取,提取的总 RNA 能满足后续 cDNA 合成及 RT-PCR 克隆特定基因的需要。

【关键词】 RNA 分离试剂;总 RNA;草鱼皮肤 cDNA;斑马鱼 *E2F5* 基因

【中图分类号】 Q503

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)07-0064-06

A homemade RNA isolation reagent and its application in the extraction of fish tissue total RNA

XU Kun, LI Duo, ZHANG You-you, LI Long-ping,

MA Li-xia, ZHANG Zhi-ying

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study was done to test a homemade RNA isolation reagent, which is convenient and economical. **【Method】** With TRizol Reagent as a comparison, the homemade RNA isolation reagent was used to extract total RNA of grass carp derma. The quality of the total RNA was checked with a spectrophotometer, denaturing agarose gel electrophoresis and also RT-PCR analysis. Finally, the total RNA was used to synthesize grass carp derma cDNA. Subsequently, we applied the homemade reagent to extract total RNA of zebra fish, which was used for RT-PCR to clone the full length zebra fish *E2F5* gene (1 092 bp). Then an eukaryotic expression vector pcDNA3.1-flag-Zf *E2F5* and a yeast expression vector pGAD GH-Zf *E2F5* were constructed, and the cloned *E2F5* gene was sequenced. **【Result】** The total RNA of grass carp derma extracted with the homemade RNA isolation reagent was highly qualified as that with TRizol Reagent to synthesize grass carp cDNA. The total RNA of zebra fish extracted with the reagent got a even higher quality, with which the full length *E2F5* gene was successfully cloned to construct

* [收稿日期] 2011-12-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目“鲈鱼反转录病毒(WDSV)辅助基因诱导肿瘤萎缩分子机理研究”(30870119)

[作者简介] 徐 坤(1985—),男,河南淮阳人,在读博士,主要从事鲈鱼反转录病毒辅助基因诱导肿瘤萎缩研究。

E-mail: 564737724@qq.com

[通信作者] 张智英(1958—),男,陕西兴平人,教授,博士生导师,主要从事动物基因组学研究。E-mail: zhangzhy@nwsuaf.edu.cn

pcDNA3.1-flag-Zf E2F5 and pGAD GH-Zf E2F5.【Conclusion】The homemade RNA isolation reagent is suitable for the extraction of fish tissue total RNA, which will satisfy the needs of cDNA synthesis and gene cloning by RT-PCR. With the total RNA extracted using the homemade reagent, we successfully conducted the grass carp cDNA synthesis and zebra fish *E2F5* cloning. These will be essential materials for our future studies.

Key word: RNA isolation reagent; total RNA; grass carp derma cDNA; zebra fish *E2F5* gene

RNA 的分离提取是分子生物学研究的基本内容,也是进行基因表达分析的基础。典型的哺乳动物细胞中含有的 RNA 约为 10^{-5} $\mu\text{g}/\text{个}$,其中 80%~85% 是核糖体 RNA (主要是 28S、18S、5.8S 和 5S 4 种),剩余的 15%~20% 大部分是由不同的低分子质量 RNA (转运 RNA 和小核 RNA) 组成,另外还有 1%~5% 的信使 RNA (mRNA)。在细胞内,虽然 mRNA 含量少,碱基组成及长度各异,但是这些 mRNA 分子实际上编码了细胞内所有的多肽分子^[1]。高质量的总 RNA 及纯化得到的 mRNA,主要用于如 RT-PCR、Northern 印迹分析、cDNA 文库构建、mRNA 末端快速扩增 (RACE)、差异表达 (DDRT-PCR)、引物延伸反应 (Primer Extension) 及 RNA 标记 (RNA labeling) 等研究。对于动物 RNA 的提取,最常用的方法是强变性剂法,所用的强变性剂主要是硫氰酸胍和盐酸胍。硫氰酸胍和盐酸胍在使细胞裂解的同时,可溶解和变性 RNA 酶,从而保护 RNA 不被迅速降解。1977 年, Ullrich 等^[2]首次提出用硫氰酸胍提取 RNA 的方法,之后由 Chirgwin 等^[3]正式发表文章详细介绍了该方法。Chirgwin 的方法是将组织或细胞的胍盐匀浆液铺在氯化铯溶液上,利用 RNA 的浮密度大于细胞其他组分的特点,通过超速离心将 RNA 沉降到管底,从而分离获得 RNA。该方法能够成功分离提取得到收率和品质都较高的 RNA,但是操作复杂、繁琐。1987 年, Chomczynski 等^[4]提出了快速提取 RNA 的硫氰酸胍一步法,该方法用异硫氰酸胍和酚单相溶液裂解细胞后,加入氯仿产生第二相 (有机相),DNA 与蛋白质被抽提进入有机相, RNA 则被保留在上层水相中,经异丙醇或乙醇沉淀后即可得到 RNA。这种提取方法因具有速度快、不需要超速离心、操作简单、RNA 产率高等优点,成为许多研究人员在提取培养细胞和多数动物组 RNA 时的首选方法。

TRizol 是利用硫氰酸胍一步法提取细胞和组织 RNA 的常用试剂,其主要成分是异硫氰酸胍和苯酚。对少量的组织 (50~100 mg) 和细胞 (5×10^6) 以及大量的组织 (≥ 1 g) 和细胞 ($\geq 10^7$) 均有较好的

分离效果。TRizol 试剂使用简单方便,允许同时处理多个样品,所有操作可以在 1 h 内完成,抽提得到的总 RNA 能够避免 DNA 和蛋白的污染。TRizol 作为提取 RNA 的常用试剂,已经商品化,但是价格较昂贵。另外,许多公司根据科研需要,研制出了一些提取 RNA 的专用试剂或试剂盒,可根据需要进行选择。使用试剂盒进行总 RNA 提取的优点一是速度快,二是在提取试剂中一般含有抑制 RNA 酶活性的成分,能较好地防止 RNA 降解,得到的 RNA 纯度较高;但往往存在价格昂贵、一次处理的材料量相对较少、产量低等缺点。

因此,笔者根据实验室课题研究的需要,自制了一种配制简单方便且价格低廉的 RNA 分离试剂用以提取草鱼皮肤和斑马鱼的总 RNA,并成功进行了草鱼皮肤 cDNA 的合成及斑马鱼 *E2F5* 基因的克隆,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材 料

健康成年雌性草鱼和红色条纹斑马鱼,市购所得;大肠杆菌 JM109 菌株、pcDNA3.1-flag、pGAD GH-Hu E2F5 载体,由西北农林科技大学动物基因组学实验室保存;RNA 分离试剂 TRizol Reagent,购自 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒,购自 Fermentas 公司;胶回收试剂盒,购自 威格拉斯生物技术 (北京) 有限公司;质粒小提试剂盒,购自 Omega 公司;Trans 2KPlus DNA Marker、*Taq* DNA 聚合酶,购自北京全式金生物技术有限公司;DL2000 DNA Marker、 λ -Hind III digest DNA Marker、RNase H、T4 DNA 聚合酶 I,购自 TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶和限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Sac* II 和 *Xho* I,购自 NEB 公司;其他试剂均为分析纯或更高纯度的试剂;试验用水为由 MilliPore 纯水系统制备的 MilliQ 超纯水。

1.2 自制 RNA 分离试剂的配制

取 200 mL 灭菌的 MilliQ 超纯水,加入 6.8 g 乙酸钠,溶解混匀后调 pH 至 5.0,加入 47.26 g 异硫氰

酸胍和 15.224 g 硫氰酸铵,溶解混匀后加入 25 mL 甘油,再加入 190 mL 水饱和酚,定容至 500 mL。

1.3 草鱼皮肤组织总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

1.3.1 总 RNA 的提取 以 Invitrogen 公司的 TRizol Reagent 为对照,参考其操作手册进行试验。取健康的活草鱼,迅速剔除鳞片,剪取草鱼皮肤(表皮)组织,每份 0.20 g,剪碎放入 DEPC 水处理过的 15 mL 玻璃匀浆器中;向匀浆器中加 2 mL 自制 RNA 分离试剂,对照组则加入 2 mL 的 TRizol Reagent,充分匀浆,室温放置 5 min;收集匀浆液于 DEPC 水处理过的 1.5 mL EP 管中,每管 1 mL,离心去除组织碎片后加入 200 μ L 氯仿,涡旋混匀 15 s,室温放置 5 min;4 $^{\circ}$ C 下 12 000 g 离心 15 min,溶液分层,将上层水相(约 450 μ L)小心地转移到新的 1.5 mL EP 管中,加入 500 μ L 异丙醇,上下颠倒 5~10 次混匀,室温放置 10 min,4 $^{\circ}$ C 下 12 000 g 离心 10 min,收集总 RNA,并用预冷的体积分数 75%乙醇(DEPC 水配制)洗涤 2 次;最后用 30 μ L 的 DEPC 处理水溶解总 RNA。

采用分光光度计法和变性琼脂糖凝胶电泳法,对提取的总 RNA 品质进行检测。利用 Nano Drop ND-1000 核酸蛋白检测仪,以 DEPC 处理水为参比调零,分别取 2 种 RNA 分离试剂提取的 RNA(各 3 个样品)2 μ L,测吸光度,记录 OD_{260}/OD_{280} 、 OD_{260}/OD_{230} 、核酸含量(ng/ μ L)等参数,重复测量 1 次,求平均值。根据 Judelson lab 的 RNA BLOTS:Formaldehyde method 操作手册处理总 RNA 样品,进行变性琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.2 cDNA 的合成 以自制 RNA 分离试剂提取的总 RNA 为模板,用 Fermentas 公司的逆转录试剂盒,按说明书操作进行 cDNA 第 1 条链的合成。为了检测 cDNA 第 1 条链合成的效果,根据草鱼的 β actin 基因序列(GenBank 登录号:M25013.1),利用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物(由上海博尚生物技术有限公司合成),用于扩增草鱼 β actin 基因的部分序列,长度为 268 bp。上游引物 Gc. β actin. F 序列为:5'-GCCATCCAGGCTGTGCTGTC-3';下游引物 Gc. β actin. R 序列为:5'-CGAAGTCAAGAGCCACATAG-3'。以合成的 cDNA 第 1 链为模板进行降落式 PCR^[5],反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,10 个循环,每个循环退火温度降低 1 $^{\circ}$ C;然后再 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,25 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

cDNA 第 2 条链的合成:取第 1 链 cDNA 合成液加入灭菌的 1.5 mL EP 管中,依次加入超纯水、10 $\times$ DNA polymerase I buffer、dNTP、RNase H、DNA polymerase I 等反应试剂后,16 $^{\circ}$ C 反应 3 h,70 $^{\circ}$ C 加热 10 min,室温放置 5 min;加 T4 DNA 聚合酶 I,37 $^{\circ}$ C 反应 10 min,苯酚/氯仿抽提纯化 2 次。用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测 cDNA 片段大小的分布。

1.4 斑马鱼总 RNA 的提取与 E2F5 基因的扩增及其表达载体构建

1.4.1 总 RNA 的提取 取体长约 3 cm 的健康红色条纹斑马鱼,称体质量后,剪碎放入 DEPC 水处理过的 15 mL 玻璃匀浆器中,按 0.1 g 加入 1 mL 的比例加入自制 RNA 分离试剂后充分匀浆,进行斑马鱼总 RNA 的提取。取 2 μ L 总 RNA 溶液,在 RNase free 电泳槽中用 10 g/L 非变性琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.2 E2F5 基因的扩增与表达载体的构建 使用 Fermentas 公司的逆转录试剂盒,按说明书操作进行 cDNA 第 1 条链的合成。根据斑马鱼 E2F5 基因的转录本 1 序列(GenBank 登录号:NM_001197300.1),利用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物(由上海博尚生物技术有限公司合成),用于扩增斑马鱼 E2F5 基因的全长序列,预期扩增片段长度为 1 092 bp。上游引物 Zf. E2F5. F 序列为:5'-CGCGGATCCATGGCCGAGTCGAACAGC-3',下划线部分为 BamH I 酶切位点;下游引物 Zf. E2F5. R 序列为:5'-CCG GAATTCTGACACGAATCATGTTCTAGTAGTT-3',下划线部分为 EcoR I 酶切位点。采用降落式 PCR^[5],反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,68 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,16 个循环,每个循环退火温度降低 1 $^{\circ}$ C;然后再 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,25 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后,用 BamH I /EcoR I 双酶切并用胶回收试剂盒纯化目的片段,将其定向克隆到真核表达载体 pcDNA3.1-flag 的相同位点,转化 JM109 大肠杆菌感受态细胞,涂 LB/Amp 平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,挑取 4 个 pcDNA3.1-flag-Zf E2F5 阳性克隆,摇菌提质粒并进行 BamH I /EcoR I 双酶切鉴定和测序分析,测序由华大基因公司完成。取测序正确的 pcDNA3.1-flag-Zf E2F5 重组质粒,用 Sac II/Xho I 将 Zf E2F5

基因片段切出,插入 pGAD GH-Hu E2F5 载体的相同位点,取代其中的人 E2F5 基因片段,构建斑马鱼 E2F5 基因的酵母表达载体 pGAD GH-Zf E2F5,转化 JM109 大肠杆菌感受态细胞,挑取 3 个阳性克隆,摇菌提质粒后进行 *Sac* II/*Xho* I 双酶切鉴定。

2 结果与分析

2.1 草鱼皮肤组织总 RNA 品质的检测

2.1.1 分光光度计检测 利用 Nano Drop ND-

表 1 草鱼皮肤组织总 RNA 的分光光度计检测结果
Table 1 Total RNA detected with the spectrophotometer

样品 Sample	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	核酸含量/(ng·μL ⁻¹) Concentration
TRizol Reagent 提取的总 RNA Total RNA of isolated with TRizol Reagent	2.02±0.12	2.17±0.05	1 471.7±39.7
自制 RNA 分离试剂提取的总 RNA Total RNA of isolated with homemade RNA isolation reagent	1.96±0.08	2.22±0.09	1 618.3±56.1

2.1.2 变性琼脂糖凝胶电泳检测 变性琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)表明,2 种试剂提取的总 RNA 都略有降解,这可能与鱼皮肤样品较薄、取样时 RNA 容易降解有关。对比 2 种试剂提取的 28S rRNA 条带亮度发现,自制 RNA 分离试剂提取的总 RNA 品质稍好,这可能与 TRizol Reagent 储存时间有关,

1000 核酸蛋白检测仪分别检测用 TRizol Reagent 和自制 RNA 分离试剂提取的总 RNA,结果(表 1)表明,2 种 RNA 分离试剂提取的总 RNA 品质相近, OD_{260}/OD_{280} 值都在 2.0 左右, OD_{260}/OD_{230} 都在 2.2 左右,核酸含量都在 1 500 ng/μL 左右,可见 RNA 含杂质较少,略有降解,产量较高,表明由自制 RNA 分离试剂提取的总 RNA 能够满足后续试验的需要。

在本试验开展时,TRizol Reagent 自采购后于 4℃、避光条件下已保存约半年。

2.2 草鱼 *βactin* 基因片段的 RT-PCR 扩增
RT-PCR 扩增出了 268 bp 的草鱼 *βactin* 目的基因片段(图 2),说明自制 RNA 分离试剂提取的总 RNA 能够用于 RT-PCR 扩增 cDNA。

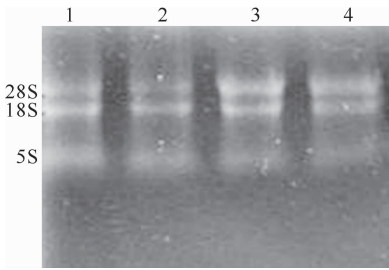


图 1 草鱼皮肤组织总 RNA 的变性
琼脂糖凝胶电泳检测
1~2. TRizol Reagent 提取的总 RNA 样品;
3~4. 自制 RNA 分离试剂提取的总 RNA 样品
Fig. 1 Denaturing agarose gel electrophoresis
of the total RNA
1—2. RNA samples isolated with TRizol Reagent;
3—4. RNA samples isolated with homemade
RNA isolation reagent

2.3 草鱼皮肤组织 cDNA 的电泳检测

cDNA 双链合成后,再经 2 次苯酚/氯仿抽提纯化,然后用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测可知,片段主要集中在 100~2 000 bp(图 3),说明自制 RNA 分离试剂提取的草鱼皮肤组织总 RNA 能够用于 cDNA 的合成。

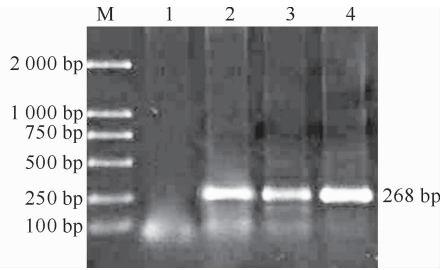


图 2 草鱼 *βactin* 基因的 RT-PCR 扩增
M. DNA Marker DL2000;1. 无模板对照;
2~4. PCR 扩增产物
Fig. 2 *βactin* gene fragments amplified by RT-PCR
M. DNA Marker DL2000;1. The control;2—4. PCR products

2.4 斑马鱼总 RNA 的非变性琼脂糖凝胶电泳检测

由于斑马鱼体型较小,组织内脏比较难取,故将整条斑马鱼匀浆,用于总 RNA 的提取。斑马鱼总 RNA 中的 28S 和 18S rRNA 均无降解迹象(图 4),说明自制 RNA 分离试剂完全能够用于斑马鱼总 RNA 的提取。

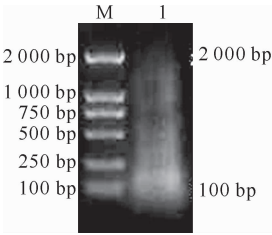


图 3 草鱼皮肤组织 cDNA 的电泳检测

M, DNA Marker DL2000;1. cDNA 样品

Fig. 3 Grass carp derma cDNA synthesized

M, DNA Marker DL2000;1. cDNA sample

2.5 斑马鱼 *E2F5* 基因的 RT-PCR 扩增

RT-PCR 成功扩增出了约 1.1 kb 的斑马鱼 *E2F5* 基因,但电泳检测条带较弱(未照相),这可能与 *E2F5* 基因的表达量相对 $\beta actin$ 基因较低有关。以 RT-PCR 产物为模板进行第 2 轮扩增,电泳检测结果显示,得到了足够的 *E2F5* 基因(图 5),可用于表达载体的构建。

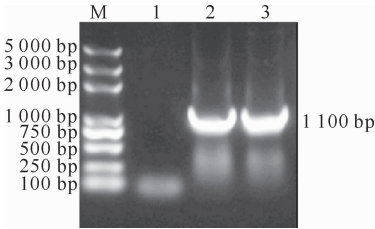


图 5 斑马鱼 *E2F5* 基因的 RT-PCR 扩增

M, Trans 2KPlus DNA Marker;1. 无模板对照;2~3. PCR 扩增产物

Fig. 5 Amplification of zebra fish *E2F5* gene

M, Trans 2KPlus DNA Marker;1. The control;2-3. PCR products

2.6 斑马鱼 *E2F5* 基因表达载体的双酶切鉴定及测序分析

斑马鱼 *E2F5* 基因的真核表达载体 pcDNA3.1-

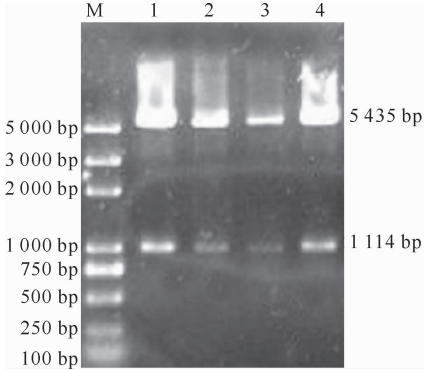


图 6 斑马鱼 *E2F5* 基因真核表达载体 pcDNA3.1-flag-Zf *E2F5* 的 *BamH I* /*EcoR I* 双酶切鉴定

M, Trans 2K Plus DNA Marker;1~4. 酶切后的阳性克隆质粒

Fig. 6 Digestion of pcDNA3.1-flag-Zf *E2F5*

with *BamH I* /*EcoR I*

M, Trans 2K Plus DNA Marker;1-4. Positive plasmids digested

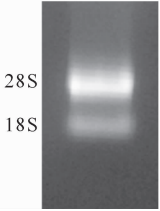


图 4 斑马鱼总 RNA 的电泳检测

Fig. 4 Electrophoresis of zebra fish total RNA

flag-Zf *E2F5* 经 *BamH I* /*EcoR I* 双酶切鉴定,获得了 5 435 和 1 114 bp 的片段(图 6),与预期结果一致。酵母表达载体 pGAD GH-Zf *E2F5* 阳性克隆质粒用 *Sac II* /*Xho I* 双酶切鉴定,获得了 8 025 和 1 153 bp 的片段(图 7),与预期结果一致。将研究得到的 4 个 pcDNA3.1-flag-Zf *E2F5* 阳性克隆测序结果与 GenBank 中斑马鱼 *E2F5* 基因转录本 1 序列进行比对,发现均有 2 个同义突变,这可能是由于斑马鱼来源的地域差异所致。除了这 2 个同义突变外,2 个样品与全长 *E2F5* 基因编码序列(GenBank 登录号 NM_001197300.1)完全一致。此外,一个样品还有 1 个错义突变和多个同义突变,另外一个样品有多个错义突变,分析其原因,在 RT-PCR 扩增约 1.1 kb 的 *E2F5* 基因时本研究使用的是 *Taq* DNA 聚合酶,并且进行了 2 轮扩增,这可能导致了在 PCR 扩增 *E2F5* 基因的过程中使其容易发生突变。总之,自制 RNA 分离试剂提取的 RNA 能够用于特定基因全长 cDNA 的克隆。

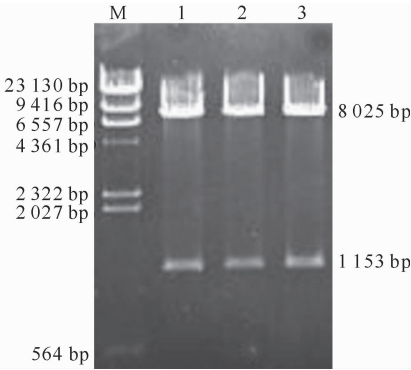


图 7 斑马鱼 *E2F5* 基因酵母表达载体 pGAD GH-Zf *E2F5* 的 *Sac II* /*Xho I* 双酶切鉴定

M, λ -Hind III digest DNA Marker;

1~3. 酶切后的阳性克隆质粒

Fig. 7 Digestion of pGAD GH-Zf *E2F5* with *Sac II* /*Xho I*

M, λ -Hind III digest DNA Marker;1-3. Positive plasmids digested

3 讨 论

本试验自制 RNA 分离试剂的主要成分是异硫氰酸胍、硫氰酸铵和水饱和酚,该试剂配制简单且价格低廉,在使用过程中操作方便,并不需要特殊的处理步骤。通过与商业化 TRIzol Reagent 的比较,笔者发现,使用这种自制 RNA 分离试剂提取的草鱼皮肤组织总 RNA 完全能够满足后续试验的需要。皮肤组织取样相对麻烦,取样时组织暴露在空气中,容易受到外界 RNase 的污染,并且匀浆相对困难。因此,用自制 RNA 分离试剂提取的草鱼皮肤组织总 RNA 的品质明显比斑马鱼总 RNA 的品质差,试验最终合成的草鱼皮肤 cDNA 片段大小主要分布在 100~2 000 bp。如果要合成高品质的草鱼皮肤 cDNA 文库,关于总 RNA 提取过程中的样品处理、操作规范、使用试剂等方面还需要进一步优化。另外,本试验成功地通过 RT-PCR 扩增得到了斑马鱼全长的 *E2F5* 基因,并构建了其真核和酵母表达载体。说明使用这种自制 RNA 分离试剂提取得到的总 RNA,能够满足常规的基因(1 000 bp 左右)克隆的需要。本研究测序结果中的 2 个同义突变应该是物种地域性差异所致,与 RNA 的提取过程无关。

笔者在相关研究中发现,大眼狮鲈鱼皮肤肿瘤病毒(WDSV)辅助基因 *orfA* 所表达的逆转录病毒周期蛋白 OrfA(Rv-cyclin)能够与人的 E2F5 相互作用^[6]。WDSV 是引起大眼狮鲈鱼皮肤肿瘤(WDS)的病原体^[7-9]。WDS 具有秋季发生春季自然萎缩的季节性生长特点^[7,10-11],该特点与 WDSV 辅助基因 *orfA* 的表达密切相关^[11-12],这为肿瘤自然萎缩机理的研究提供了一个独特模型。最新研究发现,表达了 OrfA 的转基因斑马鱼不仅没有发生组织增生,而且能够抵抗致癌物质引起的肝癌发生^[13-14]。E2F5 转录因子是 E2F 家族中的一员,E2F 家族成员在调控细胞周期和肿瘤抑制因子功能方面起着重要的作用,同时又是 DNA 肿瘤病毒转化蛋白的作用靶标,其中 E2F5 和 E2F4 具有较高的同源性,二者均能与肿瘤抑制蛋白因子 p130 和 p107 相互作用^[15-17]。另有研究表明,斑马鱼的 *E2F5* 的表达也与肿瘤的发生和发展有关^[18]。本试验使用自制 RNA 分离试剂成功提取了草鱼皮肤组织总 RNA 和斑马鱼总 RNA,合成了草鱼皮肤 cDNA,克隆得到了斑马鱼 *E2F5* 基因,并构建了其真核和酵母表达载体,为鱼皮肤 cDNA 文库的构建和 OrfA/E2F5 互作对肿瘤发生和萎缩影响的研究提供了必

要的材料。

[参考文献]

- [1] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂,译. 北京:科学出版社,2002:518-531.
Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 3rd edition. Translated by Huang P T. Beijing: Science Press,2002:518-531. (in Chinese)
- [2] Ullrich A, Shine J, Chirgwin J, et al. Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences [J]. Science,1977,196(4296):1313-1319.
- [3] Chirgwin J M, Przybyla A E, MacDonald R J, et al. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease [J]. Biochemistry,1979,18(24):5294-5299.
- [4] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Anal Biochem,1987,162(1):156-159.
- [5] Barbro S, Wilfried K, Uwe T. A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces [J]. Journal of Virological Methods,1995,55(3):427-433.
- [6] 徐 坤,王亮亮,张婷婷,等. 大眼狮鲈鱼皮肤肿瘤病毒(WDSV)逆转录病毒周期蛋白(OrfA)相互作用蛋白的酵母双杂交筛选 [J]. 中国生物化学与分子生物学报,2012,28(3):267-275.
Xu K, Wang L L, Zhang T T, et al. Screening of proteins interacting with the retroviral-cyclin (OrfA) of walleye dermal sarcoma virus (WDSV) with yeast two hybrid system [J]. Chin J Biochem Mol Biol,2012,28(3):267-275. (in Chinese)
- [7] Bowser P R, Wolfe M J, Forney J L, et al. Seasonal prevalence of skin tumors from walleye (*Stizostedion vitreum*) from Oneida Lake, New York [J]. J Wildl Dis,1988,24(2):292-298.
- [8] Martineau D, Renshaw R, Williams J R, et al. A large unintegrated retrovirus DNA species present in a dermal tumor present in a dermal tumor of walleye *Stizostedion vitreum* [J]. Diseases of Aquatic organisms,1991,10(1):153-158.
- [9] Martineau D, Bowser P R, Renshaw R R, et al. Molecular characterization of a unique retrovirus associated with a fish tumor [J]. J Virol,1992,66(1):596-599.
- [10] Bowser P R, Wooster G A. Regression of dermal sarcoma in adult walleyes [J]. Journal of Aquatic Animal Health,1991,3(2):147-150.
- [11] Bowser P R, Gregory A W, Sandra L Q, et al. Comparison of fall and spring tumors as inocula for experimental transmission of walleye dermal sarcoma [J]. Journal of Aquatic Animal Health,1996,8(1):78-81.
- [12] Quackenbush S L, Holzschu D L, Bowser P R, et al. Transcriptional analysis of walleye dermal sarcoma virus (WDSV) [J]. Virology,1997,237(1):107-112.

(下转第 76 页)