

三种匀浆方式对线纹海马育儿袋总RNA提取质量的影响

王苏丹, 涂东宇, 杨子涵, 孙金辉, 崔培, 杨燕菁

天津农学院水产学院, 天津

收稿日期: 2024年5月31日; 录用日期: 2024年6月20日; 发布日期: 2024年6月29日

摘要

质量合格的RNA是RNA相关分子生物学实验的基础保障。线纹海马的育儿袋具有大量结缔组织, RNA提取过程中组织较难裂解。本研究探究了玻璃匀浆器研磨、磁珠震荡研磨和研钵液氮研磨三种不同的匀浆方式对总RNA提取质量的影响, 结果显示, 研钵液氮研磨法获得的RNA完整性、纯度及浓度较高, 而玻璃匀浆器研磨、磁珠震荡研磨所提取的RNA浓度低、质量差。通过反转录PCR检测, 通过研钵液氮研磨法得到的模版中可扩增出明亮、单一的目的基因条带。该研究为海马育儿袋总RNA的提取方法提供了参考。

关键词

RNA, 分子生物, 育儿袋, 研磨

Effects of Three Homogenizing Methods on the Extraction Quality of Total RNA for Brood Pouch in *Hippocampus erectus*

Sudan Wang, Dongyu Tu, Zihan Yang, Jinhui Sun, Pei Cui, Yanjing Yang

College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin

Received: May 31st, 2024; accepted: Jun. 20th, 2024; published: Jun. 29th, 2024

Abstract

High-quality RNA is the foundation of molecular biology experiments related to RNA. The brood pouch of *Hippocampus erectus* contains a large amount of connective tissue, which is difficult to be

文章引用: 王苏丹, 涂东宇, 杨子涵, 孙金辉, 崔培, 杨燕菁. 三种匀浆方式对线纹海马育儿袋总 RNA 提取质量的影响[J]. 水产研究, 2024, 11(2): 113-118. DOI: 10.12677/ojfr.2024.112014

cleaved during RNA extraction. In this study, the effects of three different homogenizing methods, namely grind with glass homogenizer, beads shock and liquid nitrogen, on the quality of total RNA extraction were investigated. The results showed that RNA acquired by liquid nitrogen grinding method provided higher integrity, quality and concentration than that acquired by glass homogenizer and beads shocking. RT-PCR showed a single bright band of the target gene in the template acquired by liquid nitrogen grinding method. This study provides a reference for the total RNA extraction of brood pouch in *Hippocampus erectus*.

Keywords

RNA, Molecular Biology, Pouch, Grind

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

线纹海马(*Hippocampus erectus*)又名灰海马, 隶属海龙科(*Syngnathidae*), 是一种原产于美洲地区加勒比海等海域的小型海洋鱼类[1] [2]。线纹海马具备特殊的雄性育儿方式, 因其具有生长速度快、繁殖和抗病能力强等优点于 2009 年由我国学者引入并成功进行了人工养殖[3]。目前关于线纹海马育儿袋的研究较少, 大多集中于形态学及转录组测序分析。分子生物学层面的研究是解析育儿袋发育的基础。

RNA 是细胞生物遗传信息传递的中间载体, 在分子生物学领域具有突出地位[4]。RNA 提取是分子生物学中 RNA 相关实验的基础[5], 获得高质量、纯净、完整的 RNA 是构建 cDNA 文库、RT-PCR、Northern 杂交等后续实验的关键起点[6] [7]。常见的 RNA 提取方法包括传统的 Trizol 法、柱式试剂盒法、异硫氰酸胍法和 SDS 法等[8], 而获取高质量 RNA 的关键环节在于组织样本的裂解。目前常用的组织匀浆方法包括手动玻璃匀浆器法、研钵液氮研磨法、磁珠法、超声波破碎法等[9], 由于不同组织结构的差异, 寻找高效适合的组织匀浆方法极为重要。本实验以探究适用于线纹海马育儿袋 RNA 提取的组织匀浆方法, 分别采用了玻璃匀浆器研磨、磁珠震荡研磨和研钵液氮研磨三种匀浆方式结合柱式试剂盒的方法提取其总 RNA, 并对获取的总 RNA 质量进行了评估, 为后续进行线纹海马育儿袋 RNA 相关实验奠定了基础。

2. 材料与方法

2.1. 实验鱼

实验所用的线纹海马购买于福建英特森公司。所购的线纹海马放置于循环水箱中暂养, 饲养水温 24℃~26℃左右, 盐度维持在 35‰, 并保持 12 小时的光照和 12 小时的黑暗环境; 每日定时投喂两次, 早晚各一次, 主要投喂以鲜活糠虾为主; 暂养结束后对其进行解剖, 取雄性线纹海马的育儿袋组织于干净的无酶管中经液氮速冻后置于-80℃超低温冰箱储存用于后续总 RNA 的提取。

2.2. 育儿袋匀浆及总 RNA 提取

实验所用的玻璃匀浆器、研钵、研磨棒、磁珠子、镊子等器皿用前均经烘箱 240℃烘烤 4 小时以上以防 RNase 污染, 枪头、离心管等塑料制品均采用无 RNase 污染的耗材。

取 50 mg 左右的育儿袋组织, 分别采用三种不同的匀浆方式进行匀浆。(1) 玻璃匀浆器研磨: 将组织

剪碎置入遇冷的玻璃匀浆器中，加入 600 μl 的 buffer 裂解液，在冰上迅速转动匀浆棒研磨组织，使组织尽可能裂解；(2) 磁珠震荡研磨：将组织剪碎置入放入 1.5 ml 无酶管中，加入 6 颗小磁珠($d = 1 \text{ mm}$)、1 颗大磁珠($d = 5 \text{ mm}$)和 600 μl 的 buffer 裂解液，使用 FastPrep-24 5G 匀浆仪(MP, 美国)进行震荡匀浆，参数设置为 4 M/s，每次震荡 20 s，共计 3 次；(3) 研钵液氮研磨：将组织置入预冷 3 min 后的研钵、研杵，用研杵反复碾压研磨组织至粉末状，加入 600 μl 的 buffer 裂解液，研磨至糊状后置于常温，溶解后转移 1.5 ml 无酶管中。

匀浆后的组织使用 TaKaRaMiniBEST Universal RNA Extraction Kit 试剂盒(Takara, 日本)完成后续 RNA 提取，具体步骤参考试剂盒的说明书，最终溶解洗脱 RNA 采用 50 μl 无水进行回收。

2.3. 总 RNA 样品质量的检测

获得的 RNA 样品取 1 μl 采用核酸蛋白测定仪测定其浓度及纯度(NanoPhotometer-N50, 德国 Implen 公司)，并记录 OD260/OD280 以及 OD260/OD230 的比值；取 3 μl 的样品加入 1 μl 的 loading buffer 混匀，于 180 v、300 mA 的设置下进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，检测其 28 S 和 18 S rRNA 条带的亮弱程度。

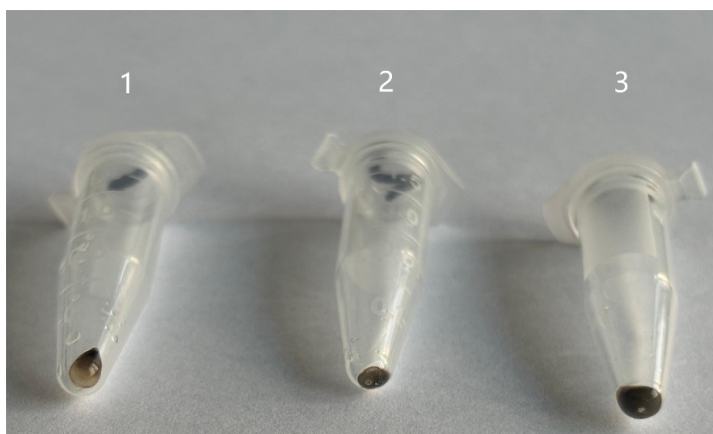
2.4. cDNA 的合成

分别将上述三种匀浆方法所获取的总 RNA 使用 Scientific Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (赛默飞, 美国)进行反转录。合成 20 μl 的总反应体系：RNA 溶液 12 μl 、RNase Inhibitor 1 μl 、RevertAid M-MuL RT 1 μl 、5x PrimerScript Buffer 2.4 μl 、10mM dNTP mix 2 μl ，65 $^{\circ}\text{C}$ 5 min，立即冰上冷却 2 min，42 $^{\circ}\text{C}$ 1 h 20 min，70 $^{\circ}\text{C}$ 5 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。所得产物用内参基因 *actin* 进行 PCR 扩增，引物序列为 *actin-F*: AGCTTCACTACTACTGCTGAGC, *actin-R*: CATGATGCTGTTGAAGGTGGTC。

3. 结果与分析

3.1. 不同匀浆方式对组织的研磨程度分析

将经三种不同的匀浆方式研磨的组织 - 裂解液混合物进行离心后观察沉淀组织的情况，结果显示经玻璃匀浆器研磨和磁珠震荡研磨的组织残渣中可观察到明显的透明的筋膜及块状结构，而经研钵液氮研磨的组织残渣呈均一粉末状沉淀(见图 1)。



1. grind with glass homogenizer; 2. grind with beads shock; 3. grind with liquid nitrogen
1. 玻璃匀浆器研磨法; 2. 磁珠震荡研磨法; 3. 研钵液氮研磨法

Figure 1. Tissue residues of different homogenizing methods
图 1. 不同匀浆方式的组织残渣

3.2. 不同匀浆方式获取的总 RNA 的浓度及纯度检测

采取核酸测定仪 NanoPhotometer-N50 (Implen 公司, 德国)测定三种不同匀浆方式获得的 RNA 的浓度及纯度, 结果显示, 经玻璃匀浆器研磨和磁珠震荡研磨获取的总 RNA 浓度分别为 18.9 ng/ μ l 和 7.8 ng/ μ l, 而经研钵液氮研磨获取的总 RNA 浓度为 76.5 ng/ μ l; 通过测定的 A280 nm、A260 nm 和 A230 nm 的相对吸收值可以看出, 研钵液氮研磨法的 A260/A280 比值为 2.125, 介于 2.0~2.2 之间, 表明 RNA 的纯度较高, 基因组 DNA 残留较少; 三种匀浆方式 A260/A230 的比值均小于 2.0, 说明样品中可能存在有机化合物、盐(胍盐)等污染物增加了 A230 的数值, 研钵液氮研磨法的 A260/A230 的比值均大于玻璃匀浆器研磨法及磁珠震荡研磨法, 污染程度最低(见表 1)。

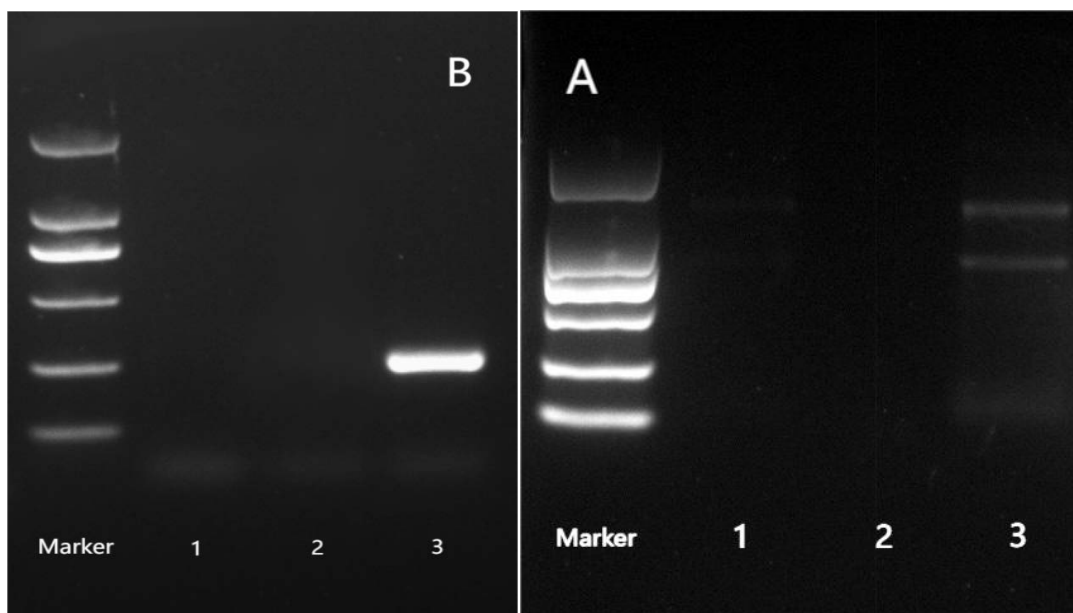
Table 1. RNA concentration and purity extracted by different homogenizing methods

表 1. 不同匀浆方式提取的 RNA 浓度及纯度

| 匀浆方式 | 浓度 | A260/A280 | A260/A230 |
|----------|------------------|-----------|-----------|
| 玻璃匀浆器研磨法 | 18.9 ng/ μ l | 2.003 | 1.022 |
| 磁珠震荡研磨法 | 7.8 ng/ μ l | 1.624 | 0.936 |
| 研钵液氮研磨法 | 76.5 ng/ μ l | 2.125 | 1.410 |

3.3. 总 RNA 完整性的分析

采用凝胶电泳通过 28 S 和 18 S rRNA 条带的亮弱程度判断 RNA 的降解程度。结果显示, 玻璃匀浆器研磨法和磁珠震荡研磨法提取的 RNA 未见明显条带, 而研钵液氮研磨法可以看到清晰的 28 S 和 18 S rRNA 两条带, 其亮度约等, 表示 RNA 未出现大规模降解, 完整性较好(见图 2A)。将上述 RNA 逆转录后的 cDNA 作为内参基因 *actin* 的扩增模板, 结果显示在研钵液氮研磨法获得的 RNA 反转录模板中扩增到了一条明亮的目的条带(见图 2B), 而另外两种匀浆方式所获模板中未扩增出目的条带。



1. grind with glass homogenizer; 2. grind with beads shock; 3. grind with liquid nitrogen

1. 玻璃匀浆器研磨法; 2. 磁珠震荡研磨法; 3. 研钵液氮研磨法

Figure 2. Electrophoretic images of RNA and PCR amplification products of target gene in different homogenizing methods

图 2. 不同匀浆方式的 RNA 及目的基因 PCR 扩增产物的电泳图

4. 讨论

RNA 提取的原理是通过破碎动植物组织细胞, 利用物理及化学方法将 RNA 和 DNA、蛋白质、有机质等分离开来, 不同物种和组织间所采取的 RNA 提取方式各有不同[10]。RNA 的提取质量受多种因素的影响, 不同组织的样本处理、不同成份的裂解液及 RNA 的制备方法、环境中的 RNase 均会影响 RNA 的提取质量, 因此选择适当的提取方法是确保获取高质量 RNA 的关键[11] [12] [13] [14]。

组织样本的研磨是 RNA 制备能否成功的关键基础[15]。组织结构的不同所选取的相应匀浆方式亦有差异。动物组织中的胸腺、肾脏、胰脏等组织核酸及核酸酶含量较高, 组织匀浆简单, 采取手动匀浆的方式就可使组织轻易研磨破碎; 而对于一些纤维含量丰富且较难处理特殊组织的结构, 如心脏、骨骼肌、皮肤、筋膜等组织细胞密度低, 单位重量的组织 RNA 含量较少且匀浆难度大, 可采取全自动样本处理器、电动匀浆或液氮研磨等方式来裂解组织。戴先成[16]等在对大鼠心肌组织的研究中发现, 采取玻璃匀浆器的匀浆方式能使心肌组织完全裂解获取质量较好的 RNA; 刘江丽等[17]在对小鼠心脏、肾脏和肝脏的研究中表明采取全自动样本处理器、磁珠法及手动匀浆器的匀浆方式均能获得较高质量的 RNA, 其中采用全自动样本处理器所获得的 RNA 浓度最高; 海洋无脊椎动物栉孔扇贝和凡纳滨对虾的肝胰腺采取电动匀浆器处理的方式可获得完整性较好的 RNA 条带, 而刺参基于体壁较厚的结缔组织和丰富的胶原蛋白等, 组织匀浆难度大, 其采用缩短电动匀浆时间, 增加匀浆次数的方法获取了质量较好的 RNA [18] [19]; 此外, 液氮碾磨常应用于一些植物组织如毛竹[20]、樱桃[21]、红苹果[22]等以获取较高质量的 RNA。

目前, 关于鲜有育儿袋 RNA 提取方法的报道。本实验基于获取高质量育儿袋 RNA 的目的, 采用三种不同的匀浆方式搭配柱式试剂盒的方法来提取线纹海马育儿袋组织中的总 RNA, 发现采用研钵液氮研磨法能提取到纯度较高、质量较好的 RNA, 基于主要原因是育儿袋中含有大量结缔组织和胶原蛋白, 液氮速冻是组织变脆更易碎化组织成粉末状, 进一步便于裂解液充分裂解细胞, 而采用玻璃匀浆器和磁珠震荡研磨方式很难研磨育儿袋组织, 无法使裂解液充分和细胞接触, 匀浆时间过长亦会导致 RNA 降解, 提取质量不佳。

5. 结论

本文采用三种不同的匀浆方式搭配柱式试剂盒方法提取线纹海马育儿袋中的总 RNA, 结果表明研钵液氮研磨法所提取的 RNA 效果最佳, 质量较好, 可用于后续分子相关实验; 而匀浆器研磨法和磁珠电动研磨法所获得的 RNA 纯度不高, 质量较差。本研究可为组织结构类似的其它动物组织中 RNA 的提取及优化提供参考意见。

参考文献

- [1] 杨华, 付志茹, 贾文平, 王娜, 喻旭东. 线纹海马在天津地区的引进与养殖试验[J]. 河北渔业, 2018(3): 25-27.
- [2] Foster, S.J. and Vincent, A.C.J. (2004) Life History and Ecology of Seahorses: Implications for Conservation and Management. *Journal of Fish Biology*, **65**, 1-61. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2004.00429.x>
- [3] Lin, Q., Lin, J. and Zhang, D. (2008) Breeding and Juvenile Culture of the Lined Seahorse, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture*, **277**, 287-292. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.030>
- [4] Fleige, S. and Pfaffl, M.W. (2006) RNA Integrity and the Effect on the Real-Time qRT-PCR Performance. *Molecular Aspects of Medicine*, **27**, 126-139. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>
- [5] 王杰, 王全, 田娜, 等. 不同植物组织 RNA 提取方法的比较分析[J]. 北京农学院学报, 2015, 30(1): 76-80.
- [6] Tan, S.C. and Yiap, B.C. (2009) DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and the Present. *BioMed Research International*, **2009**, Article 574398. <https://doi.org/10.1155/2009/574398>
- [7] 刘清兰, 陈香丽, 郭爱莲, 等. 日本沼虾血淋巴 RNA 提取方法的改进[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2012, 40(6): 134-136.

- [8] Chang, S., Puryear, J. and Cairney, J. (1993) A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, **11**, 113-116. <https://doi.org/10.1007/bf02670468>
- [9] Liu, N., Luo, Y., Zhu, Y., Peng, H., Zou, C., Zhou, Z., *et al.* (2021) Effects of Warm Ischemia Time, Cryopreservation, and Grinding Methods on RNA Quality of Mouse Kidney Tissues. *Biopreservation and Biobanking*, **19**, 306-311. <https://doi.org/10.1089/bio.2020.0129>
- [10] Asif, M.H., Dhawan, P. and Nath, P. (2000) A Simple Procedure for the Isolation of High Quality RNA from Ripening Banana Fruit. *Plant Molecular Biology Reporter*, **18**, 109-115. <https://doi.org/10.1007/bf02824018>
- [11] Liu, J., Goh, C., Loh, C., Liu, P. and Pua, E. (1998) A Method for Isolation of Total RNA from Fruit Tissues of Banana. *Plant Molecular Biology Reporter*, **16**, 87-87. <https://doi.org/10.1023/a:1007492421119>
- [12] 李银聚, 张春杰. 适宜于实验教学的动物组织总 RNA 提取的操作方法[J]. 河南农业科学, 2010(8): 140-142.
- [13] 于敏, 曲娟娟, 王征, 等. BALB/C 小鼠不同组织 RNA 提取方法的比较[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(12): 64-67.
- [14] 李宏, 王新力. 植物组织 RNA 提取的难点及对策[J]. 生物技术通报, 1999(1): 38-41.
- [15] 徐凡, 张艳美. 不同组织匀浆法对心肌组织线粒体提取质量的影响[J]. 汕头大学医学院学报, 2021, 34(2): 100-103.
- [16] 戴先成, 柴智锋, 徐永城, 等. Trizol 法大鼠心肌总 RNA 提取方法探讨[J]. 刑事技术, 2014(3):15-16.
- [17] 刘江丽, 易旭, 吴雪莉, 等. 小鼠组织总 RNA 制备方法及样本储存时间对 qRT-PCR 影响的探讨[J]. 重庆医学, 2023, 52(11): 1614-1619.
- [18] 郑珂, 陈秋实, 李霞. 仿刺参体壁总 RNA 提取方法的建立[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(1): 84-87.
- [19] 冯政夫, 王琳, 李文侠, 等. 海洋无脊椎动物组织总 RNA 提取方法的探讨[J]. 海洋科学, 2014, 38(11): 24-28.
- [20] 方婷, 徐倩, 金爱武, 等. 毛竹不同组织总 RNA 提取质量的比较[J]. 中南林业科技大学学报, 2021, 41(9): 157-165.
- [21] 刘杰, 于成明, 陈芳龙, 等. 提取樱桃中植物病毒 RNA 方法的建立与优化[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2021, 52(6): 922-925.
- [22] 汤蕾, 童盼盼, 张亚若, 等. 不同方法提取新疆红肉苹果 RNA 差异研究[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(3): 144-146, 153.