

# 用 RNase 保护法定量检测鲤鱼组织 IGF-I mRNA 的表达\*

华益民 林浩然 钟翎

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

**摘要** 建立了定量分析 mRNA 表达的 RNase 保护法, 并用于鲤鱼 IGF-I 的研究. 结果表明鲤鱼 IGF-I mRNA 在肝组织的丰度为每微克 DNA 含  $50.45 \times 10^{-17}$  mol, 在其他组织有少量 IGF-I mRNA 表达.

**关键词** RNase 保护法, 胰岛素样生长因子 -I, 杂交, 鲤鱼

**分类号** Q 45

胰岛素样生长因子 -I (IGF-I) 是 1 种含有 70 个氨基酸的单链蛋白, 生长激素 (GH) 的促生长作用主要就是通过 IGF-I 得以实现的. IGF-I 能促进细胞的生长, 分裂和分化, 抑制细胞的自然死亡, 调节多种细胞的生理功能. 因此 IGF-I 在鱼类的生长和生殖生理中具有重要意义. IGF-I 主要由动物肝组织合成, 但近几年来研究表明肝外组织也能合成少量 IGF-I<sup>[1]</sup>. 利用普通的 Northern 印迹技术有时检测不到肝外组织表达的 IGF-I mRNA. 为此本实验室建立国际上较新的检测 mRNA 表达的液相杂交技术, RNase 保护法 (RNase protection assay, RPA)<sup>[2]</sup>. 该方法由于其灵敏度高实际上已成为定量检测 mRNA 表达的标准方法. 根据实验室的条件, 对经典的 RPA 进行部分修改. 现通过检测鲤鱼肝, 脑和肌肉组织中 IGF-I mRNA 的表达水平对 RNase 保护法作一简要介绍.

## 1 材料和方法

1.1 动物 6~7 月龄鲤鱼, 约 80~100 g, 不分雌雄, 购于广州市郊区渔场, 在室外流动水的水泥池喂养适应 1 周, 水温 20℃ 左右.

1.2 药品和试剂 实验所用 EcoRI 为 Promega 公司产品, RNase A 和 XhoI 为华美生物工程有限公司产品. 体外转录试剂盒和 RNase T1 为 Sigma 公司产品. 玻璃纤维滤纸为 Whatman 公司产品. Tris, EDTA, SDS 等为 Serva 公司产品.  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP 购于北京亚辉生物工程公司. 鲤鱼 IGF-I cDNA 由香港中文大学陈竟明博士提供. 10× SET 提取缓冲液: d = 10% 的 SDS, 200 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5), 100 mmol/L EDTA. 杂交缓冲液: h = 80% 的去离子甲酰胺, 40 mmol/L PIPES (pH 6.4), 400 mmol/L NaAc (pH 6.4), 1 mmol/L EDTA. RNase 酶解缓冲液: 10 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5), 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA. RNase 混合液: 1 mg/mL RNase A,  $3.334 \times 10^{-4}$  mol / (s. mL) RNase T1.

\* 中山大学基础学科前沿课题基金资助项目

收稿日期: 1997-10-20 华益民, 男, 31 岁, 博士

1.3 总核酸 (TNA) 的提取 TNA 用蛋白酶 K 法提取. 取鲤鱼组织 200~ 300 mg 置于已加入 2 mL  $\times$  SET 缓冲液的 12 mL 无菌试管, 组织匀浆器快速匀浆约 1 min, 加入蛋白酶 K, 45 $^{\circ}$ C 恒浴 1 h, 酚 氯仿抽提 1 次, 氯仿再抽提 1 次.  $d=0.8\%$  琼脂糖凝胶电泳检测到 28s RNA 和 18s RNA 2 条带, 表明 TNA 提取效果较好. Pharmacia LKB Ultrospec III 紫外分光光度计测定 TNA 浓度. 样品中 DNA 的含量用改良的二苯胺比色法测定.

1.4 反义 IGF-I RNA 探针和正义 IGF-I RNA 的制备 鲤鱼 IGF-I cDNA 片段 (5' 端非翻译区至 A 区域 *Xhd* 酶切位点共 475 bp) 重新构建于质粒载体 pBSsk (M13-) 上. 用 *Eco*RI 内切酶将质粒线性化作为模板, 用 T7 RNA 聚合酶体外转录合成  $\alpha$ - $^{32}$ P-UTP 标记的反义 RNA 探针. 用 *Xho*I 内切酶线性化质粒制得另一模板, 用 T3 RNA 聚合酶体外转录合成正义 IGF-I RNA 标准品. 合成的反义 RNA 探针和正义 RNA 标准品直接用 Sephadex G25 离心柱层析纯化. 取 1  $\mu$ L 纯化的 RNA 探针在液闪仪测定其放射活性, 其余部分 - 20 $^{\circ}$ C 保存, 于 1 周内使用. 正义 RNA 标准品用酚 氯仿抽提除蛋白后取 5  $\mu$ L 在 DNA/RNA 定量仪 (Genequant) 上检测其含量.

1.5 液相杂交反应 将正义 IGF-I RNA 稀释成不同浓度, 每管分别加入 20 pg~ 1.2 ng 范围内不同梯度量 IGF-I RNA, 再加入 20  $\mu$ g 酵母 tRNA; 另外取适量已制备好的肝, 脑和肌 TNA 样品 (约含 DNA 20~ 50  $\mu$ g), 均经 speed-vac 抽干后分别加入 20  $\mu$ L 杂交缓冲液和过量探针 ( $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$  c/min, 约 1  $\mu$ L), 90 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 使 RNA 变性后置于杂交炉 50 $^{\circ}$ C 保温过夜.

1.6 RNase 酶解反应 用 RNase 酶解缓冲液配制 RNase 工作液 (RNase 混合液稀释 80 倍). 向杂交反应管中加入 80  $\mu$ L RNase 工作液, 35 $^{\circ}$ C 水浴 2 h. 游离的 RNA (包括 RNA 探针) 和双链未配对的 RNA 片段被充分酶解. 配对的 RNA-RNA 杂交分子受到保护.

1.7 杂交信号的检测 ① 三氯乙酸 (TCA) 沉淀和液闪仪检测杂交信号: 取适当大小的 Whatman GF/C 滤纸, 做上标记. 取 50  $\mu$ L 待测反应样品点在滤纸上, 室温晾干. 用 5% TCA (含 20  $\mu$ mol/L 焦磷酸钠) 洗 3 min, 重换 TCA 再洗 3 次. 滤纸在  $b=70\%$  的乙醇中短暂浸泡后, 室温晾干. 滤纸分别装入闪烁瓶在液闪仪上进行 cerenkov 计数; ② 聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影检测杂交信号: 取余下的 50  $\mu$ L 反应样品用 3 倍体积乙醇沉淀 RNA-RNA 杂交分子, 晾干, 溶于 10  $\mu$ L 上样缓冲液. 取 4~ 5  $\mu$ L, 在 85 $^{\circ}$ C 变性 3~ 5 min, 在  $d=5\%$  的聚丙烯酰胺: 8 mol/L 尿素凝胶电泳. 泳毕, - 20 $^{\circ}$ C 放射自显影, 过夜.

## 2 结果和讨论

2.1 结果 过量反义 RNA 探针分别与呈梯度的 IGF-I RNA 标准品杂交, 经 RNase 工作液酶解和 TCA 沉淀处理后, 用液闪仪检测出杂交探针的放射性强度并绘制成标准曲线 (图 1). 组织 TNA 样品杂交后用液闪仪检测出的杂交信号通过标准曲线求得样品中 IGF-I mRNA 的 pg 数, 进一步换算后得出肝, 脑和肌肉组织中的 IGF-I mRNA 的丰度分别相当于每微克 DNA 含  $54.45 \times 10^{-17}$ ,  $4.14 \times 10^{-17}$  和  $2.2 \times 10^{-17}$  mol. 图 2 为放射自显影检测的实验结果.

2.2 讨论 本文建立的检测鲤鱼 IGF-I mRNA 的 RNase 保护法灵敏度较高, 比 Northern 印迹技术高出数十倍, 可检测到每个样品中相当于 20~ 30 pg 鲤鱼正义 RNA 的靶 mRNA 量; 同时实验周期短, 从标记探针到出结果仅需 2 d. 由于在本文中使用 TCA 沉淀法检测杂交信号, 因此可同时操作上百个样品.

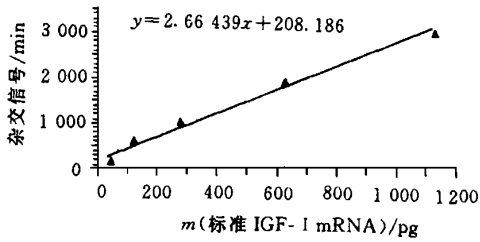


图 1 液相杂交实验的标准曲线

Fig. 1 Standard curve for the solution hybridization experiment



图 2 放射自显影显示杂交信号

Fig. 2 Autoradiogram showing the results of RPA  
M 标准; 1 肌肉组织 TNA 样品; 2 脑组织 TNA 样品; 3 肝组织 TNA 样品; 4 1.12 ng 正义 IGF-I RNA

IGF-I 主要由肝组织合成, 释放进入血液. 肝外组织也能合成少量 IGF-I, 并以自分泌或旁分泌的形式作用于自身组织. 近年来, 鱼类 IGF-I 的内分泌学和分子生物学开始引起人们的重视. 国外至今在鲑鳟鱼类发现 IGF-I 基因有 4 种转录产物, 分别称为 sEa-1, sEa-2, sEa-3 和 sEa-4<sup>[3]</sup>. 在银大马哈鱼发现有 3 种转录产物, 在大鳞大马哈鱼也检测到了 3 种 IGF-I mRNA. 这些转录产物的差异是由于 E 区域的大小不同造成的. 最近, 香港学者在鲤鱼只检测到 1 种类型的 IGF-I 基因转录产物, Ea-2 型 mRNA<sup>[4]</sup>. 本研究使用的反义 IGF-I RNA 探针, 由于不包含 E 区域, 可检测出任何类型的 IGF-I mRNA. 本文首次对鲤鱼肝, 脑和肌肉组织中的 IGF-I mRNA 水平进行定量检测, 结果表明鲤鱼肝组织中 IGF-I mRNA 含量最高, 脑组织中次之, 而肌肉中最少. 这一结果与国外对银大马哈鱼的研究结果基本一致<sup>[1]</sup>. 结果提示鲤鱼可能和鲑鳟鱼类以及哺乳类一样, IGF-I 主要由肝组织合成并分泌进入血液 (内分泌功能); 其他组织也能合成少量的 IGF-I 作用于自身组织细胞 (自分泌或旁分泌功能).

### 参 考 文 献

- 1 Duan C, Duguay S J, Plisetskaya E M. Insulin-like growth factor I (IGF-I) mRNA expression in coho salmon *Oncorhynchus kisutch*: tissue distribution and effects of growth hormone/prolactin family proteins. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1993, 11: 371~ 379
- 2 Durnam D M, Palmiter R D. A practical approach for quantitating specific mRNAs by solution hybridization. *Analytical Biochemistry*, 1983, 131: 385~ 393
- 3 Chen T T, Marsh A, Shambloott M, et al. Structure and evolution of fish growth hormone and insulin-like growth factor genes. In: Sherwood N M, Hew C L. eds. *Molecular Endocrinology of Fish*, *Fish Physiology (Vol VIII)*. New York: Academic Press, 1994. 179~ 209
- 4 Liang Y H, Cheng C H K, Chan K M, et al. Insulin-like growth factor I Ea2 is the predominantly expressed form of IGF in common carp *Cyprinus carpio*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1996, 5 (2): 145~ 152

## Quantitative Detection of Common Carp IGF-I mRNA Expression by RNase Protection Assay

Hua Yimin\* Lin Haoran Zhong Ling

**Abstract** Insulin-like growth factor-I interests many investigators because of its importance in mediating most growth effects of growth hormone. To study carp IGF-I expression, we established the quantitative method for detecting mRNA, RNase Protection Assay (RPA). This technique is rapid and requires minimal sample manipulation, allowing the analysis of hundreds of samples simultaneously. From the study on common carp, the hepatic IGF-I mRNA expression was shown highest,  $54.45 \times 10^{-17}$  mol  $\mu$ g DNA. In other tissues, low amount of IGF-I mRNA was also expressed.

**Keywords** RNase Protection Assay, insulin-like growth factor-I, hybridization, common carp

· 简 讯 ·

### 中科院综考会文献馆近 20 个数据库正在运行

中国科学院自然资源综合考察委员会 (简称综考会) 文献馆现在有近 20 个数据库正在随时等待为读者服务。这些数据库中最具规模的是《资料咨询系统》, 库内馆藏了全部资料的书目等信息, 现有数据 2.3 万条; 图书书目数据库的纪录目前有 4 500 条, 大多是近段时间所进图书的信息; 文摘库有 7 000 多条纪录, 其时间为 1992~1995 年期间所出版的《中国国土资源文摘》; 专题库的纪录有 3 000 余条, 便于科研人员查找一些热门信息; 《自然资源》与《自然资源学报》全部论文名录库库内纪录 1 700 条左右; 还有综考会早期综合考察资料目录库、地址库、图名库、报纸专题信息总目录库等; 另有区划库、农业库等 9 个派生库。这些数据库正在为科研人员寻找信息发挥作用。

(本刊通讯员)

\* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China