

对虾组织样品中 RNA 的铵盐常温保存法及其效果

杜迎彬^{1,2} 王志杰^{1,2} 杨冰² 张晓华¹ 黄捷^{2*}

(¹ 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

(² 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘要 本研究以凡纳滨对虾为研究对象, 取其肌肉组织 28℃ 下保存于不同饱和度和不同 pH 的铵盐保存液中, 保存一定时间后, 通过组织总 RNA 提取、RT-PCR 法及荧光定量 RT-PCR 法鉴定比较选择方便有效的保存方法。结果显示, 从含 25mmol/L 柠檬酸钠和 20mmol/L EDTA 的饱和醋酸铵保存液和饱和硫酸铵保存液中保存的组织中提取的 RNA 较完整。通过调节 pH 进行保存液的优化, 提取 RNA 后的凝胶电泳、RT-PCR 及荧光定量 RT-PCR 确定的基因拷贝数显示, 从含 25mmol/L 柠檬酸钠和 20mmol/L EDTA 的饱和醋酸铵保存液 (pH 6.0) 和饱和硫酸铵保存液 (pH 5.2) 保存的组织中能成功地提取出大量的 RNA, 且 RNA 分子完整; 通过荧光定量 RT-PCR 法显示新鲜组织的 18S rRNA 拷贝数为 10⁷ Copies/mg 组织, 保存 28d 后的组织 18S rRNA 拷贝数可达到 10⁵ Copies/mg 组织, 而空白对照组的 18S rRNA 拷贝数只有 10³ Copies/mg 组织。说明保存液对于抑制核酸降解有较好的效果。这种简便有效的保存液为样品的保存、现场采集标本及后续的分 子实验奠定了基础。

关键词 饱和铵盐溶液 样品保存 水生动物 RNA

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)03-0088-09

Ammonium preservation of shrimp tissue RNA at normal temperature and its effects

DU Ying-bin^{1,2} WANG Zhi-jie^{1,2} YANG Bing²
ZHANG Xiao-hua¹ HUANG Jie^{2*}

(¹ College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(² Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT In recent years, more and more nucleic acid based molecular biotechnologies were established and applied in the disease diagnosis, health evaluation, epidemiological surveillance, genetic breeding, environmental analysis, and other aspects of aquaculture. Good quality and high quantity of nucleic acid to be preserved and extracted from the samples are the prerequisites of these technologies. Sample collection and preservation methods are the key elements to ensure the successful application of the technologies. Currently, most studies use fresh material or ultra-low temperature preserved sample for RNA extraction. However, these methods

公益性行业(农业)科研专项经费(201103034)和现代农业产业技术体系建设专项资金(nycytx-46)共同资助

* 通讯作者。E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期:2012-02-29;接受日期:2012-08-20

作者简介:杜迎彬(1985-),女,硕士研究生,主要从事海水养殖动物病原微生物研究。E-mail: yingbindu@126.com, Tel:15866323135

are very difficult to be applied to aquatic animals, especially for field-collected samples. This study aimed to find a convenient and effective preservation solution for field-collection. Muscle tissues were taken from *Litopenaeus vannamei* and preserved in the ammonium solutions at different saturation and different pH at 28 °C for different time periods. Comparison of the RNA extraction showed that preservation solution of saturated ammonium sulfate and saturated ammonium acetate had good effect. The saturated ammonium acetate at pH 6.0 (A3) and the saturated ammonium sulfate at pH 5.2 (S3) with 25mmol/L sodium citrate and 20mmol/L ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA) had a significant effect on tissue preservation, by comparing gene copy number by total RNA extraction, gel electrophoresis, and RT-PCR. We successfully extracted a large amount of genomic RNA, and quantitative results showed that the 18S rRNA copy number reached 10^5 for per milligram tissue after 4 weeks preservation in A3 and S3, while the negative control 18S rRNA copy number was 10^3 per milligram tissue. Preservation solutions can effectively inhibit the degradation of nucleic acid and maintain the tissue structure and cell integrity. This simple and effective preservation solution has a great significance for sample preservation, field specimen collection and subsequent molecular experiments.

KEY WORDS Saturated ammonium solution Sample preservation
Aquatic animal RNA

近年来,分子生物学技术在遗传学、疾病检测中的应用已受到广泛关注,而分子实验研究的深入建立在核酸基础上,得到完整的核酸是分子实验的前提(Savioz *et al.* 1997;刘保忠等 2001;张海琪等 2002;田宗城等 2005;Santos *et al.* 2009),因此样品采集中的采集方法、样品保存是实验成功的关键(蔡振媛等 2006)。以往研究工作多以鲜活材料和超低温冷冻样品作为核酸提取的首选(刘保忠等 2001;徐来祥等 2002;张海琪等 2002;方旅平等 2005;田宗城等 2005;蔡振媛等 2006),但是在野外取样,尤其水生动植物样品采集、保存实现现场检测或超低温保存较困难(蔡振媛等 2006;王明森等 2009),给研究工作的开展带来了诸多不便。因此寻找一种简便易行的有效保存方法对于分子生物学技术在水产研究中应用起着至关重要的作用(徐来祥等 2002;张海琪等 2002;蔡振媛等 2006;Thakuria *et al.* 2009)。高质量 RNA 对于生物样品分子水平的研究至关重要,但是组织脱离生物体后 RNA 易降解且 RNA 提取前后的核酸酶的作用及提取过程中的机械剪切等都会造成 RNA 降解,从而影响提取的 RNA 的完整性(王桂玲等 2003;王玉成等 2006;吴旭东等 2006;高爱保等 2008;吴艳华等 2008)。铵盐具有高溶解度、无毒、稳定等优点,可利用铵盐的盐析作用沉淀蛋白从而达到对核酸酶的抑制实现对核酸的保护作用。柠檬酸钠、EDTA 可络合金属离子,抑制金属离子对核酸酶的辅助作用(蔡振媛等 2006),且缓冲能力好,Lader 于 2001 年发明的 RNAlater 专利公开了一种简单易行的 RNA 保存方法,该专利中采用饱和硫酸铵溶液对哺乳类动物组织 RNA 起到保护作用。由于水生动物的高含水量和易腐烂变质,该方法对水生动物 RNA 的保存效果值得检验和优化。

荧光定量 PCR 操作简便、快速高效、高通量,具有很高的灵敏性、重复性和特异性,而且是在封闭的体系中完成扩增并进行实时测定,大大降低了污染的可能性并且无需在扩增后进行操作(阳成波等 2003;陈英剑 2004),这些优点使其在分子检测中得到广泛应用(阳成波等 2003;陈英剑 2004;王忠发等 2005;马莉等 2007;岳志芹等 2008)。利用荧光定量 PCR 的快速高效的优点来鉴定检测保存液的保存效果更加直观。本研究通过 RT-PCR、荧光定量 RT-PCR 两种高灵敏度方法检验不同保存液保存的样品所提取的 RNA 的浓度、质量、完整性,确定保存样品的组织形态完整情况,探讨不同样品保存方法对核酸保护的效果,本研究为水生动物样品标本的现场采集及分子检测提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

活的凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei*, 体重 7.5 ± 1.0 g, 于 2011 年 5 月购自山东青岛胶州水产公司, 于恒温充氧袋中运输, 室温下暂养于塑料水箱 (80 cm \times 50 cm \times 50 cm) 中, 充氧。每箱 20 尾, 每天投喂两次保证其健康。

1.2 取样与amp;保存处理

取 50 mg 凡纳滨对虾肌肉组织保存于 10 倍体积的保存液中, 于 28℃ 保存, 一定时间后提取 RNA。其中不加任何保存液的组织 and -80°C 低温保存的样品为对照组。

1.3 不同饱和度铵盐对组织中 RNA 保存效果的影响

配制不同饱和度的醋酸铵保存液 (25%、50%、75% 和 100% 饱和度溶液) 和硫酸铵保存液 (25%、50%、75% 和 100% 饱和度溶液), 取凡纳滨对虾肌肉组织于 28℃ 保存于不同饱和度的保存液中, 保存 1、3、5、7 d 后提取组织总 RNA, 用微量分光光度计 (NanoDrop 2000c) 测定 RNA 浓度。

1.4 保存液 pH 对组织中 RNA 保存效果的影响

分别配制含饱和醋酸铵或饱和硫酸铵、25 mmol/L 柠檬酸钠和 20 mmol/L EDTA 的候选保存液, 分别用醋酸和 1 mol/L H_2SO_4 将其 pH 调成 5.2~7.0, 形成 7 种候选保存液 (表 1), 以 RNA later 和 不加保存液作为对照, 取凡纳滨对虾肌肉组织于 28℃ 保存于不同 pH 保存液, 提取组织总 RNA, 通过 RNA 浓度测定、琼脂糖凝胶电泳、RT-PCR 及荧光定量 PCR 进行 RNA 完整性和 18S rRNA 拷贝数的检测。

表 1 不同 pH 的待测 RNA 保存液的分组

Table 1 The testing groups for the preservation solutions at different pH

| 组别 Groups | A1 | A2 | A3 | A4 | S1 | S2 | S3 |
|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 主要组分 Main component | SAA | SAA | SAA | SAA | SAS | SAS | SAS |
| 附加组分 Additional component | C+E | C+E | C+E | C+E | C+E | C+E | C+E |
| pH | 7.0 | 6.5 | 6.0 | 5.5 | 6.8 | 6.0 | 5.2 |

注: SAA: 饱和醋酸铵; SAS: 饱和硫酸铵; C+E: 25 mmol/L 柠檬酸钠 + 20 mmol/L EDTA

Note: SAA: Saturated ammonium acetate solution; SAS: Saturated ammonium sulfate solution

1.5 凡纳滨对虾组织 RNA 提取

将保存液去除后, 75% 乙醇清洗, 加 800 μl TRIzol 试剂冰上快速研磨, 研磨后孵育 5 min; 于 4℃ 以 $10\,000 \times g$ 离心 5 min; 取上清液, 加入 200 μl 三氯甲烷震荡混匀 15 s, 室温静置 2~3 min; 于 4℃ 以 $10\,000 \times g$ 离心 10 min, 此时溶液分为 3 层, 小心吸取上层溶液; 加入等体积异丙酮混匀静置 10 min 后, 4℃ 下 $10\,000 \times g$ 离心 10 min; 去除上清液, 加入 1 ml 75% 乙醇清洗沉淀, 4℃ 下 $75\,000 \times g$ 离心 5 min, 去除乙醇, 晾干沉淀, 以 50 μl 无 RNase 水溶解 RNA。

1.6 总 RNA 量的测定

以无 RNase 水为空白对照, 取 2 μl 组织总 RNA, 用微量分光光度计 (NanoDrop 2000c) 测定 260 和 280 nm 吸光度, 求出 RNA 的浓度。

1.7 RNA 完整性的检测

取 5 μl 上述提取的 RNA 溶液,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,测定 28S 和 18S 条带的亮度比值,比较不同保存液保存 RNA 的完整性。

1.8 凡纳滨对虾 RNA 的反转录

取 20 μg 组织总 RNA,加 10U 无 RNase 的 DNase I,5 μl 10 \times DNase I Buffer 和 20U RNase 抑制剂,用 DEPC 处理的水定容到 50 μl ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30 min,加入 2.5 μl 0.5mol/L EDTA 混匀,80 $^{\circ}\text{C}$ 加热处理 2min,用无 RNase 水定容至 100 μl 。加入 10 μl 3mol/L 醋酸钠和 250 μl 冷乙醇,-80 $^{\circ}\text{C}$ 放置 20 min。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液去除混合的 DNA。沉淀干燥后以 30 μl 无 RNase 水溶解。按照两步法荧光定量 RT-PCR 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)说明书进行反转录,在 20 μl 反应体系中含 2 μl 模板 RNA,10 pmol/L Oligo(dT)₁₈,1 \times TS Reaction Mix,Enzyme Mix 1 μl 。42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 使酶失活。

1.9 组织总 RNA 中 β -actin 的 RT-PCR 检测

根据凡纳滨对虾的 β -actin 基因序列(GenBank: AF300705.2),设计特异性引物 β -actin-F(5'-CAGAG-CAAGCGAGGTATCC-3')和 β -actin-R(5'-TCCAGACTCGTCGTACTCCT-3')。在 25 μl 的 PCR 体系中,含 1 \times Ex Taq Premix (TaKaRa)、上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μl 和 10 倍稀释的 cDNA 产物 0.5 μl ,模板为 1.8 中反转录产物稀释 10 倍后取 2 μl 。经 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min;35 个循环的 94 $^{\circ}\text{C}$ 30s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;最终 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。RT-PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.10 18S rRNA 基因的定量标准质粒构建

根据凡纳滨对虾 18S rRNA 基因序列(GenBank: AF186250.1),设计一对特异性引物 18S rRNA-F(5'-GCTTGC GTTCCC ATCCAC-3')和 18S rRNA-R(5'-CAAACACCCTCACAGGCTCA-3'),以 cDNA 为模板,采用该对引物和 1.9 中的反应体系,扩增 18S rRNA 的 182bp 片段。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,切胶回收特异性片段,按照 pMD18-T 载体试剂盒(TaKaRa)说明书将回收产物与 pMD18-T 载体连接,然后克隆到 DH5 α 感受态细胞(TaKaRa)中。挑取 LB 平板(含氨苄青霉素 50 $\mu\text{g/ml}$)上的单菌落,进行 PCR 检测并测序(上海生工生物技术有限公司测序部),筛选正确的阳性克隆,10 ml 扩大培养后用细菌质粒小提试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取质粒,用微量分光光度计(NanoDrop 2000c)测定浓度。

1.11 荧光定量 PCR 测定 18S rRNA 的 cDNA 产物的拷贝数

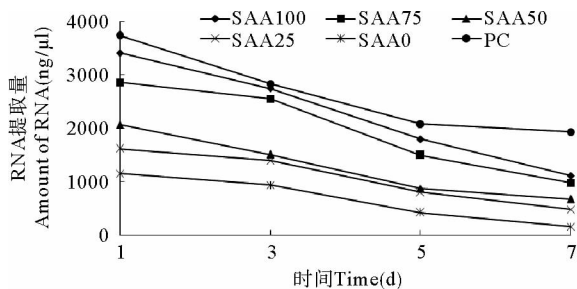
以保存组织提取 RNA 的 cDNA 为模板,以 18S rRNA-F 和 18S rRNA-R 为引物,按照两步法荧光定量 PCR 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)说明书进行荧光定量 PCR 鉴定核酸拷贝数。在 25 μl 体系中,含 2 μl 模板,上游和下游引物各 5 pmol/L,1 \times Trans Start Green qPCRSuperMix,Passive Reference Dye 0.5 μl 。在荧光定量 PCR 仪(RotorGene 2000)上进行荧光定量 PCR 反应,经 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;45 个循环的 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,设定每个循环结束时接收 SYBR Green 信号。通过 Rotor-6 软件对标准曲线及不同样品的核酸拷贝数进行分析。

2 结果

2.1 不同饱和度铵盐保存液保存的组织中提取总 RNA 量的差别

在不同饱和度(100%、75%、50%、25%)的醋酸铵和硫酸铵保存液中,将凡纳滨对虾鳃组织在 28 $^{\circ}\text{C}$ 温度下保存 1、3、5、7 d 后,采用 TRIzol 法提取 RNA,利用微量分光光度计测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值,求 RNA 浓度(图 1、图 2)。结果显示,所有饱和度下保存的组织中提取的总 RNA 浓度随着保存时间的延长而下降,而与其他饱

和度的溶液相比,100%饱和度的醋酸铵保存液和100%饱和度的硫酸铵溶液具有更好的保存效果,而从75%饱和度降低到50%饱和度时保存效果出现大幅度显著下降。根据本实验结果,本研究以100%饱和度的铵盐溶液作为基础保存液进行后续比较。



样品分别经100%饱和度醋酸铵溶液(SAA100)、75%饱和度醋酸铵溶液(SAA75)、50%饱和度醋酸铵溶液(SAA50)、25%饱和度醋酸铵溶液(SAA25)、无醋酸铵溶液(SAA0)和-80℃超低温冰箱(PC)保存

The tested samples were preserved in the 100% saturated ammonium acetate solution (SAA100), 75% saturated ammonium acetate solution (SAA75), 50% saturated ammonium acetate solution (SAA50), 25% saturated ammonium acetate solution (SAA25), solution without ammonium acetate (SAA0), and ultralow refrigerator at -80°C, respectively. Same in the followings

图1 不同饱和度醋酸铵保存液保存的组织中提取总RNA的量

Fig. 1 Amount of total RNA extracted from the tissue preserved in the ammonium acetate solution at different saturation

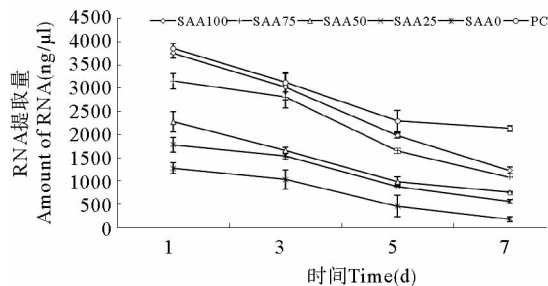


图2 不同饱和度硫酸铵保存液保存的组织中提取总RNA的量

Fig. 2 Amount of total RNA extracted from the tissue preserved in the ammonium sulfate solution at different saturation

2.2 不同pH的饱和铵盐保存液保存的组织中提取的总RNA量的差别

在5.2~7.0范围调节饱和铵盐保存液的pH值设定不同组(A1、A2、A3、A4、S1、S2、S3),进行对虾肌肉组织的保存,经28℃保存一定时间后提取总RNA。总RNA浓度测定结果表明,所提取的总RNA量在0~3d范围出现快速下降,但3d后趋于稳定,其中pH 5.2的饱和醋酸铵(A3)(图3)和pH 6.0的饱和硫酸铵(S3)(图4)在28d的保存时间内的总RNA量优于空白对照组保存1d的保存效果。

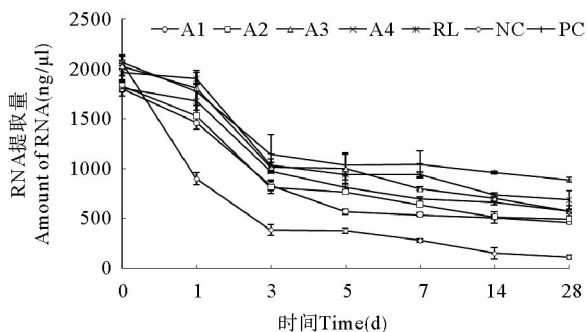
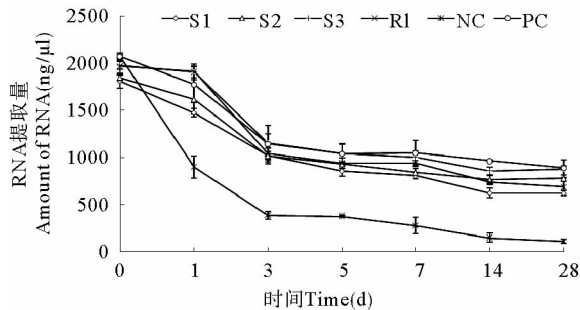


图3 不同pH饱和醋酸铵保存液保存的凡纳滨对虾肌肉组织中提取总RNA的量

Fig. 3 Amount of total RNA extracted from the tissue preserved in the saturated ammonium acetate solution at different pH



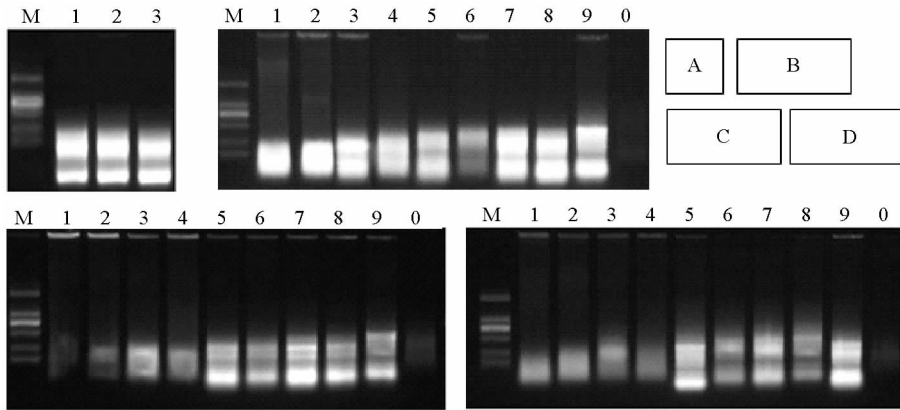
S1:pH 6.8 饱和硫酸铵保存样品;S2:pH 6.0 饱和硫酸铵保存样品;S3:pH 5.2 饱和硫酸铵保存样品;RL: RNAlate 保存样品;NC:无保存液的空白对照;PC:在-80℃保存的样品

图4 不同pH饱和醋酸铵保存液保存的凡纳滨对虾肌肉组织中提取总RNA的量

Fig. 4 Amount of total RNA extracted from the tissue preserved in the saturated ammonium sulfate at different pH

2.3 饱和铵盐保存液保存的组织中提取的总 RNA 的完整性

通过将提取的总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 5),新鲜组织的中所提取的总 RNA 明显能看到呈现出 18S rRNA 和 28S rRNA 两条区带,其中 28S rRNA 的数量大约是 18S rRNA 的两倍以上。对虾肌肉组织经 28°C 保存 7d 后,无保存液的对照组织几乎看不到 RNA 的区带,pH 7.0 (A1)和 pH 6.5 (A2)的饱和醋酸铵保存的组织中 28S rRNA 区带开始消失,pH 5.5 的饱和醋酸铵(A4)保存的组织中两条区带的界限变得模糊;经过 14d 后,所有饱和醋酸铵保存的组织的两条区带都变得模糊;经过 28d 的保存后,不同 pH 下饱和醋酸铵保存的组织虽然仍有 RNA 的区带,但两条区带的界限已经消失;而饱和硫酸铵保存的组织多数还能看到两条区带的界限,而且 pH 5.2 的饱和硫酸铵(S3)保存的组织在所有保存时间中两条 RNA 区带的比例和数量始终最稳定,甚至一定程度好于 RNA*later* 和 -80°C 保存的效果。



A. 新鲜组织总 RNA; B. 保存 7d 的组织总 RNA; C. 保存 14d 的组织总 RNA; D. 保存 28d 的组织总 RNA; M. 分子量标记; 泳道 1~8 分别为 A1、A2、A3、A4、S1、S2、S3、RNA*later* 保存液保存的组织; 9. -80°C 保存组织; 泳道 0. 空白对照组
A: Extracted RNA from fresh tissue; B: Extracted RNA from tissue preserved for 7d; C: Extracted RNA from tissue preserved for 14d; D: Extracted RNA from tissue preserved for 28d. Lane M: DL2000 Marker; Lane 1~7: tissue preserved in A1, A2, A3, A4, S1, S2, and S3, respectively; Lane 8: Tissue preserved in RNA*later*; Lane 9: Tissue frozen at -80°C; Lane 0: Control without any preservation

图 5 保存组织提取 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳

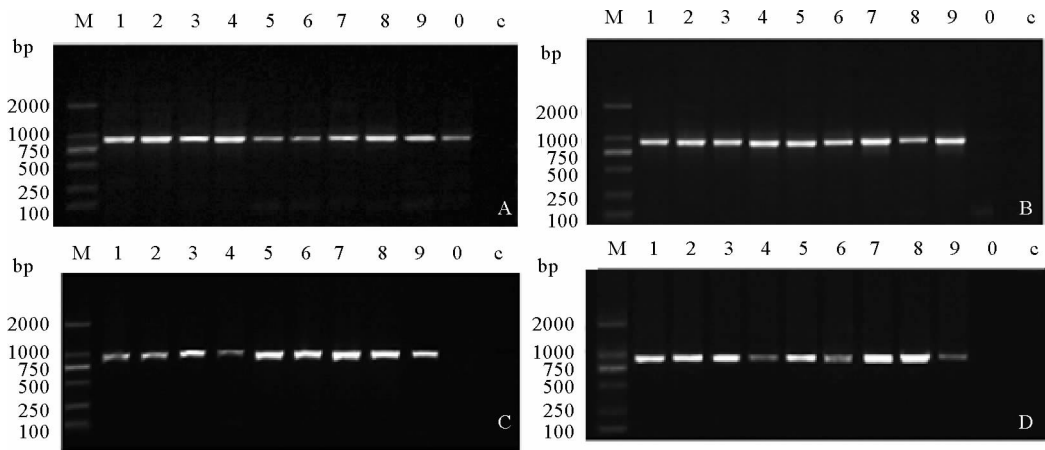
Fig. 5 Electrophoresis of RNA extracted from preserved tissue in 1% agarose gel

2.4 不同保存液保存组织 RNA 的 RT-PCR 效果

不同保存液在 28°C 下保存 3~28d 的组织提取 RNA 后,对 β -actin 基因片段(924bp)进行 RT-PCR 扩增,不加任何保存液的对照样品在保存 7d 后所提取的 RNA 就不能扩增出产物了,但用不同 pH 的醋酸铵和硫酸铵保存液在 28d 内保存的组织中提取的 RNA 均能有效地扩增出明显的产物(图 6),这种结果应该是 RT-PCR 灵敏度较高所致。

2.5 不同保存液保存的组织提取的总 RNA 中 18S rRNA 的荧光定量 PCR 检测

通过对 18S rRNA 的标准质粒的不同稀释度样品进行荧光定量 PCR 检测分析得出目的基因拷贝数(X)与 Ct 值的关系为: $Ct = -3.715 \lg X + 41.240$ ($R^2 = 0.993$)。经不同保存液在 28°C 下保存 0、7、14 和 28d 后,对对虾肌肉组织中提取的总 RNA 进行 18S rRNA 基因拷贝数测定表明(图 8),A3、S3、RL 组保存 28d 后的组织 RNA 拷贝数较 -80°C 保存组仍然相近,仍可以达到 10^5 Copies/mg 组织,比空白对照组高出两个数量级,对抑制核酸降解有明显的效果。

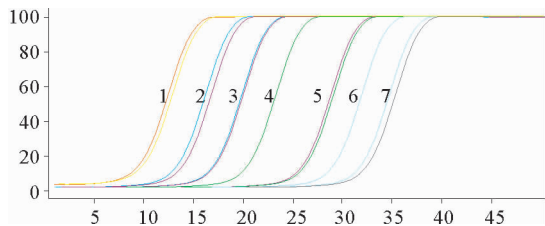


A. 保存 3d 的组织 RNA RT-PCR 产物; B. 保存 7d 的组织 RNA RT-PCR 产物; C. 保存 14d 的组织 RNA RT-PCR 产物; D. 保存 28d 的组织 RNA RT-PCR 产物; M. 2000 分子标记; 泳道 1~8 分别为 A1、A2、A3、A4、S1、S2、S3、RNA later 保存液保存的组织; 泳道 9. -80°C 保存的组织; 泳道 0. 不加保存液对照; 泳道 c. 不加模板空白对照

A: PCR products using RNA extracted from tissue preserved for 3d at 28°C ; B: PCR products using RNA extracted from tissue preserved for 7d; C: PCR products using RNA extracted from tissue preserved for 14d; D: PCR products using RNA extracted from tissue preserved for 28d; Lane M: DL2000 Marker; Lane 1~7: Template extracted from the tissue preserved in A1, A2, A3, A4, S1, S2, and S3, respectively; Lane 8: Tissue preserved in RNA later; Lane 9: Tissue frozen at -80°C ; Lane 0: Tissue without any preservation; Lane c: Without template

图 6 保存组织的 RNA RT-PCR 结果电泳

Fig. 6 Electrophoresis of PCR products using DNAs extracted from preserved tissue



1~7: 质粒拷贝数分别为 5.1×10^8 、 5.1×10^7 、 5.1×10^6 、 5.1×10^5 、 5.1×10^4 、 5.1×10^3 、 5.1×10^2

1~7 represent 18S rRNA plasmid ranging from 5.1×10^8 to 5.1×10^2

图 7 18S rRNA 质粒定量 RT-PCR 反应的扩增曲线

Fig. 7 Amplification plot of real-time RT-PCR assay for the detection of 18S rRNA plasmid

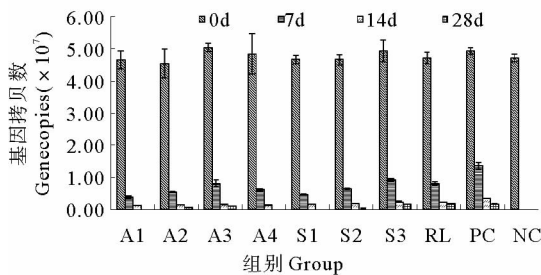


图 8 RT-PCR 定量组织保存 RNA 的 18S rRNA 拷贝数
Fig. 8 RT-PCR quantification of 18S rRNA from preserved tissue

3 讨论

RNA 提取是分子生物学研究的基本技术之一,是进行基因表达研究的基础。Northern Blotting、RACE (Rapid amplification of cDNA ends)、Real-time PCR、RT-PCR (Reverse transcriptase PCR)、蛋白质体外翻译以及 cDNA 文库的构建等都需要一定纯度和完整性的 RNA (王华等 2010; 王玉成等 2006; 吴旭东等 2006; 贺莉萍等 2007)。样品在脱离生物体后 RNA 极不稳定,极易被内源及外源的 RNase 降解,由于 RNase 广泛存在且难以灭活,使得高质量 RNA 不易获得 (Beaulieux *et al.* 2003; 王桂玲等 2003; 王玉成等 2006; 吴旭东等 2006; 贺莉萍等 2007; 高爱保等 2008; 吴艳华等 2008; Zhong *et al.* 2007)。

常温保存样品标本多数选择福尔马林或乙醇浸泡(Savioz *et al.* 1997; Masuda *et al.* 1999; 刘保忠等 2001; 罗晨玲等 2001; Legrand *et al.* 2002; 徐来祥等 2002; 张海琪等 2002; 方旅平等 2005; 田宗城等 2005; Rivero *et al.* 2006; 蔡振媛等 2006; Santos *et al.* 2009), 虽然福尔马林保存具有渗透力强、防腐杀菌效果好、固定速度快、能快速杀死生物细胞以固定生物大分子的优点(徐来祥等 2002; 张海琪等 2002; 黄为等 2008), 但诸多研究表明, 经福尔马林浸泡的样品有 RNA 易降解、抽提时易与蛋白共沉淀、提取的方法繁琐、重复性差等缺点(徐来祥等 2002; 张海琪等 2002; 黄为等 2008; Savioz *et al.* 1997; Masuda *et al.* 1999; Legrand *et al.* 2002; Rivero *et al.* 2006; Santos *et al.* 2009), 不利于后续研究。乙醇对组织有脱水作用和蛋白质变性作用, 使得被保存组织紧固, 降低了核酸提取的回收率。且保存过程需要保证足够的乙醇量而使保存过程繁琐。因此一种简便可行且又能满足分子水平研究分析的样品保存方法相当重要(张海琪等 2002; 方旅平等 2005; 田宗城等 2005; Thakuria *et al.* 2009)。

Rivero 等(2006)利用醋酸铵盐析蛋白、异丙醇沉淀 DNA 的方法提取福尔马林固定的组织核酸, 该方法简便、快速且得到高质量的 DNA, 改善了从福尔马林固定的组织中抽提核酸时存在核酸与蛋白共沉淀的问题。利用盐析原理降低蛋白质的溶解度, 使蛋白质凝聚而从溶液中析出抑制酶以保证核酸不被降解, 能使样品中的 RNA 基本保持在原来的状态。

本研究利用高浓度铵盐的盐析作用抑制酶的活性从而有效抑制核酸降解。研究表明, pH 6.0 的饱和醋酸铵保存液和 pH 5.2 的饱和硫酸铵保存液有较好的保存效果, 均可以得到大小一致、片段完整的 RNA, 提取的基因组 RNA 完整性和纯度较高, A_{260}/A_{280} 在 1.9~2.1 左右, 与 -80℃ 超低温保存的效果相差无几。采用本研究的保存液保存样品时不需要低温条件, 在 28℃ 保存 28d 的组织提取的核酸没有太多降解。PCR 及荧光定量结果显示保存液保存的组织提取的基因组满足 PCR 要求且保存 28d 后 18S rRNA 基因的拷贝数可达到 10^5 Copies/mg 组织, 与 -80℃ 低温保存的组织相差不大, 却与空白对照相比可高两个数量级。

本研究结果表明, pH 6.0 饱和醋酸铵溶液、pH 5.5 饱和醋酸铵溶液、pH 5.2 饱和硫酸铵溶液及 RNAlater 溶液对样品核酸降解均具有较好的抑制作用, 可以作为一种野外采集的样品保存方法。实验结果中 RNA 的提取量在平行组间有小量偏差, 而实验过程中即使新鲜样品提取的核酸也有少量降解, 可能是提取过程中机械剪切等损伤的影响导致得率不十分一致。

综上所述, 饱和醋酸铵保存液和饱和硫酸铵保存液, 尤其 A3、S3 保存液对组织 RNA 有较好的保存效果, 均能通过高质量、完整的基因组 RNA, 相对于 RNAlater、-80℃ 低温保存均可以作为有效的组织保存液。如果样品保存在低温(4℃ 甚至 -20℃)下效果会更好, 这对现场标本采集及标本的固定具有重要意义。

参 考 文 献

- 马莉, 谢秀兰, 岳华. 2007. 鸡 β -ACTIN 基因实时荧光定量 PCR 方法的建立. 中国畜牧兽医, 34(2): 73-75
- 王明森, 王洪光, 黄健. 2009. 水产动物病毒性疾病样品的采集和检测. 动物医学进展, 30(8): 109-112
- 王桂玲, 黄东阳, 刘戈飞. 2003. 一种从动物组织中提取高质量总 RNA 的方法. 生命科学研究, 7(3): 275-278
- 王玉成, 张国栋, 姜静. 2006. 一种适用范围广的总 RNA 提取方法. 植物研究, 26(1): 84-87
- 王忠发, 邵俊斌, 沃健儿, 王虹玲, 蒋文雅, 何伟贤. 2005. Taqman 实时荧光定量 PCR 快速检测白斑综合症病毒的方法研究. 中国卫生检验杂志, 15(6): 663-665
- 王华, 李华. 2010. 保存动物组织内 RNA 的方法改进. 生物技术通报, (6): 152-155
- 王桂玲, 刘戈飞, 黄东阳. 2003. 从动物组织提取高质量总 RNA 方法的改进. 生物技术通讯, 14(6): 512-514
- 方旅平, 林元烧, 曹文清. 2005. 不同保存条件下中华哲水蚤基因组 DNA 提取的比较. 海洋科学, 29(2): 1-4
- 田宗城, 刘良国, 曾伯平, 王文彬. 2005. 鱼类不同保存方法的 DNA 提取及 RAPD 分析. 内陆水产, 5: 33-35
- 刘保忠, 宋林生, 相建海. 2001. 海湾扇贝样品不同保存条件下 DNA 的提取及 RAPD 扩增比较. 海洋科学, 25(3): 51-53
- 阳成波, 印遇龙, 龚建华, 郁海, 黄瑞林, 李铁军. 2003. 实时定量 PCR 研究进展及其应用. 中国预防兽医学报, 25(5): 395-399
- 吴旭东, 侯玉霞, 张文吉. 2006. 黄河鲶不同组织中 RNA 提取纯化方法研究. 淡水渔业, 36(2): 24-26
- 吴艳华, 李杰, 高岚, 魏巍, 刘任. 2008. 生物组织总 RNA 的高效提取. 兰州大学学报(自然科学版), 44(2): 144-146
- 陈英剑. 2004. 荧光实时逆转录 PCR 定量研究进展. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 25(4): 348-351

- 罗晨玲,陈 清. 2001. 不同固定液及保存温度、时间对小鼠组织 DNA 的影响. 生物技术,11(3):44-46
- 岳志芹,刘 荃,梁成珠,高宏伟,徐 彪,邓明俊,江育林. 2008. 实时定量 RT-PCR 检测鱼类传染性造血器官坏死病毒方法的建立与应用. 水生生物学报,32(1):91-95
- 张海琪,薛良义,李明月,何 丰,余纪莲. 2002. 不同保存方法的大黄鱼肌肉样品基因组 DNA 提取及 RAPD 分析. 台湾海峡,21(3):296-299
- 贺莉萍,蒙艳斌,郭 毅. 2007. 标本固定对组织总 RNA 和病毒 RNA 的影响. 中国组织工程研究与临床康复,11(50):10038-10043
- 徐来祥,张知彬,宋铭晶,曹小平,王福生,张春光. 2002. 福尔马林保存的动物标本基因组 DNA 的提取方法. 动物学报,48(2):264-269
- 高爱保,王 兰. 2008. 长江华溪蟹组织 RNA 提取的研究. 海洋水产研究,29(5):107-111
- 黄 为,赵元君,唐安科. 2008. 3 种不同方法对标本基因组 DNA 固定和抽提效果研究. 重庆师范大学学报,25(2):20-24
- 蔡振媛,张同作,连新明,慈海鑫,苏建平. 2006. 一种提取动物基因组总 DNA 的野外样品保存方法. 四川动物,25(3):473-477
- Thakuria D, Schmidt O, Liliensiek AK and 2 others. 2009. Field preservation and DNA extraction methods for intestinal microbial diversity analysis in earthworms. *Journal of Microbiological Methods* 76:226-233
- Beaulieux F, Berger MM, Tchong R and 2 others. 2003. RNA extraction and RT-PCR procedures adapted for the detection of enterovirus sequences from frozen and paraffin-embedded formalin-fixed spinal cord samples. *Journal of Virological Methods* 107: 115-120
- Legrand B, Mazancourt PD, Durigon M and 2 others. 2002. DNA genotyping of unbuffered formalin fixed paraffin embedded tissues. *Forensic Science International* 125: 205-211
- Masuda M, Ohnishi T, Kawamoto S and 2 others. 1999. Analysis of chemical modification of RNA formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Research* 27(22): 4436-4443
- Rivero ERC, Neves AC, Silva-valenzuela MG and 2 others. 2006. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathology-Research and Practice*, 202(7): 523-529
- Santos S, Sá D, Bastos E and 4 others. 2009. An efficient protocol for genomic DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Research in Veterinary Science* 86(3): 421-426
- Savioz A, Blouin JL, Guidi S and 2 others. 1997. A method for the extraction of genomic DNA from human brain tissue fixed and stored in formalin for many years. *Acta Neuropathol* 93: 408-413
- Zhong JF, Weiner LP, Burke K, Taylor CR. 2007. Viral RNA extraction for in-the-field analysis. *Journal of Virological Methods* 144(1-2): 98-102