

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)组织样品 常温保存液的筛选和优化*

陈大恭^{1,2} 黄 健^{1,2,3①} 王海亮¹ 李 晋^{1,2}

(1. 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;
2. 上海海洋大学 上海 201306; 3. 青岛国家海洋科学重点实验室 青岛 266071)

摘要 以不同浓度乙醇为溶剂, 配制不同 pH 的硫酸铵和乙酸铵饱和溶液, 测试其对凡纳滨对虾组织的渗透效应在常温条件下对 RNA 的保护作用。因为乙酸铵在乙醇中的溶解度远高于硫酸铵, 且其铵离子的摩尔浓度在 0-80% 的乙醇溶剂中比较稳定。研究结果显示, 乙酸铵比硫酸铵能更快渗透到整体的对虾组织中, 并达到更高的浓度。50%、70% 及以上的乙醇为溶剂的饱和硫酸铵、50% 乙醇为溶剂的饱和乙酸铵(pH=6.0)溶液保存 RNA 的完整性较好, RNA 拷贝数较大, 半衰期较长。综合分析, 推荐 50% 乙醇的饱和乙酸铵溶液(pH=6.0)作为对虾组织样品的常温保存液, 该结果为野外样品采集及常温运输提供了一种有效方法。

关键词 铵盐; 乙醇; 常温; RNA

中图分类号 Q-34 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0071-10

随着分子生物学技术的发展和日趋成熟, 其在水产动物疾病诊断及分子病理学研究中的应用也逐渐深入(贺电等, 2007; 张世秀等, 2007)。不论是传统的 PCR 还是荧光定量 PCR、原位杂交、等温扩增和基因芯片等检测技术都是建立在核酸的基础上, 所以提取到高质量的核酸是后续分子研究顺利进行的前提。而高质量核酸的提取是基于样品的有效保存, 因此采集样品得到合理保存成为核酸提取及后续研究的关键。

在实验室样品一般保存于-20- -80℃(2000; 王敏强等, 2009; 李维凯等, 2012), 在从样品采集现场到实验室的运输过程中, 需要提供低温环境如小型冰箱或其他设备, 但在样品量很大的情况下很难满足这样的要求。乙醇因其价格低、取用方便和较好的保存效果在样品的短期及长期保存中得到了广泛应用(罗晨玲等, 2001)。在陆生动物保存液的研究中, Lader 等(2001)公布了一项以硫酸铵为主要成分的 RNAlater 保存液专利, 证明了该保存液对小鼠 RNA 的保存效果。杜

迎彬等(2013)以铵盐为主要成分进一步优化了对凡纳滨对虾 RNA 具有保护作用的保存液。

在以上研究的基础上, 本研究通过对样品 RNA 的完整性及拷贝数的检测, 探索一种以铵盐、乙醇为主要成分、能在常温条件下有效保护水产动物样品的 RNA、配置简单、安全有效的保存液。

1 材料与方法

1.1 实验材料

试验用凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)于 2013 年 9 月 14 日购自山东省青岛市胶州某对虾养殖公司, 体长为(11.0±1.5) cm, 充氧暂养于塑料整理箱(50 cm×40 cm×30 cm)。每天投喂两次, 及时换水。

1.2 保存液的配制与保存方法

将硫酸铵、乙酸铵溶解于灭菌去离子水、30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇中达到饱和状态, 并添加

* 公益性行业科研专项经费项目(201103034)、现代农业产业技术体系(CARS-47)、山东省泰山学者建设工程专项经费和农业部科研杰出人才及其创新团队专项经费共同资助。陈大恭, E-mail: datian.1011@163.com

① 通讯作者: 黄 健, 研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-04-27, 收修改稿日期: 2014-10-24

EDTA、柠檬酸钠分别达终浓度为 20、25 mmol/L。然后将每种饱和溶液用冰乙酸调节 pH 为 5.0、6.0 和 7.0，配制成 24 种保存液(表 1)。

取凡纳滨对虾的头胸部浸泡于 35 ml 保存液中，室温保存。分别以保存在 30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、RNAlater (Ambion, 美国)、37%甲醛、-20℃、

表 1 24 种待测保存液及其代号
Tab.1 Twenty-four preservation solutions and their codes

参数 Parameters	实验组 Groups																							
铵盐 Ammonium salt	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B		
溶剂 Solvent	0	0	0	3	3	3	5	5	5	7	7	7	0	0	0	3	3	3	5	5	5	7	7	7
酸度 Acidity	5	6	7	5	6	7	5	6	7	5	6	7	5	6	7	5	6	7	5	6	7	5	6	7

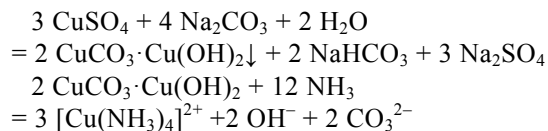
注：铵盐代号，A 为硫酸铵，B 为乙酸铵；溶剂代号，0 为去离子水，3 为 30%乙醇，5 为 50%乙醇，7 为 70%乙醇；酸度代号，5 为 pH=5.0，6 为 pH=6.0，7 为 pH=7.0

Note: Ammonium salt: A. Ammonium sulfate, B. Ammonium acetate; Solvent: 0. Deionized water, 3. 30% ethanol, 5. 50% ethanol, 7. 70% ethanol; Acidity, 5. pH=5.0, 6. pH=6.0, 7. pH=7.0

-80℃ 的凡纳滨对虾和新鲜组织为对照。

1.3 铵盐渗透效果的定性观察

配制 1%琼脂糖凝胶，在 0.5 mol/L CuSO₄ 溶液中浸泡约 30 min 使其浸透，去掉多余液体，胶略干燥后，在 0.5 mol/L Na₂CO₃ 中充分浸泡，使整个胶呈不透明的蓝白色，去掉多余液体，胶表层略干燥后，将被饱和硫酸铵和乙酸铵浸泡的凡纳滨对虾沿肠线切开后贴覆在胶表面 10 min，使虾体内的 NH₄⁺ 在碱性条件下生成 NH₃，与蓝白色碱式碳酸铜反应使胶呈透明的深蓝色，根据蓝色深浅判断虾体内的氨浓度。反应式如下：



1.4 肌肉组织中铵盐渗透效果的定量测定

取凡纳滨对虾肌肉组织，切成小块(0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm)，分别放入 1 ml 饱和硫酸铵、饱和乙酸铵，并分别在 30%乙醇、50%乙醇和 70%乙醇的饱和硫酸铵与乙酸铵中浸泡一定时间。取出浸泡的组织，用吸水纸吸去表层的液体，称量后加一定体积无氨水，研磨使铵盐溶出。取析出液稀释至 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷。取各梯度稀释液 1 ml，加 20 μl 酒石酸钾钠溶液(国标 GB747987)，混匀后加 30 μl 纳氏试剂(国标 GB747987)，混匀。放置 10 min 后，在 420 nm 波长处测定吸光度。由测得的吸光度减去零浓度空白管的吸光度后，对应标准曲线计算氨氮浓度。根据不同的稀释倍数计算虾体肌肉组织被铵盐溶液浸透时组织内的氨氮浓度。

1.5 对虾整体浸泡时铵盐渗透效应的定量测定

取全长为 10 cm 左右活的凡纳滨对虾若干尾，分别整只浸入 35 ml 的各种保存液。一定时间后，取虾体腹部甲壳下层肌肉组织及靠近肠道的肌肉组织(0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm)，用吸水纸吸干表层液体，称量后在 600 μl 无氨水中研磨。然后按 1.4 的方法测定肌肉组织中的氨氮含量。

1.6 RNA 的提取及其完整性检测

分别称取保存于每种保存液中样品的鳃组织约 20 mg，立即加入 800 μl TransZol (北京全式金生物技术有限公司)后充分研磨，室温静置 5 min，然后加入 160 μl 氯仿，剧烈振荡 15 s，室温孵育 5 min，4℃ 下 10000×g 离心 15 min。此时样品分成 3 层，小心吸取上层水相 400 μl 转移到新 EP 管中，并加入等体积的异丙醇，颠倒混匀，室温孵育 10 min 后 4℃ 下 10000×g 离心 10 min，去掉上清液，在管侧和管底形成胶状沉淀。加入 1 ml 75%乙醇(无 RNase 水配制)，剧烈涡旋后 4℃ 下 7500×g 离心 5 min，去掉上清后室温晾干沉淀，加入 30 μl 无 RNase 水溶解沉淀。取 RNA 溶液 5 μl 在 160 V 电压下电泳检测 RNA 完整性。

1.7 RNA 的定量检测

所得 RNA 溶液通过反转录试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)进行反转录，20 μl 反转录体系包括 1 μl 总 RNA (50 ng-5 μg)、1 μl 0.5 μg/μl Oligo(dT)₁₈ 引物、10 μl 2×TS 反应混合物、1 μl TransScript RT Enzyme Mix 和 1 μl gDNA Remover。于 42℃ 反应 30 min，85℃ 5 min 终止反应。得到的 cDNA 利用定量试剂盒 QuantiFast SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) 进行荧光

定量, 反应 20 μl 反应体系包括 10 μl 2 \times QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix、10 $\mu\text{mol/L}$ Primer F 和 Primer R 各 1 μl 和 cDNA 1 μl , 其中引物 Primer F 序列为 5'-GCT TGC GTT CCC ATC CAC-3', 引物 Primer R 序列为 5'-CAA ACA CCC TCA CAG GCT CA-3', 由上海生工生物工程有限公司合成。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 45 个循环。

2 结果

2.1 铵盐在水及不同浓度乙醇中的溶解度

对硫酸铵和乙酸铵室温下在水及不同浓度乙醇中的溶解度进行测定(图 1)。两种铵盐在乙醇中的溶解度均随乙醇浓度的升高而降低, 乙酸铵的溶解度远高于硫酸铵, 而且硫酸铵在 60% 以上的乙醇中的溶解度极低, 70% 左右乙醇中溶解度已经接近零。计算两种铵盐溶液中的 NH_4^+ 摩尔浓度, 结果显示, 硫酸铵和乙酸铵在水中的摩尔浓度比较接近, 分别为 7.8 mol/L 和 9.8 mol/L。但硫酸铵的铵离子摩尔浓度随溶剂中乙醇浓度的增加而快速下降, 40% 乙醇中溶解硫酸铵时, 铵离子的摩尔浓度下降到水中的一半以下; 而乙酸铵的铵离子在 0-80% 乙醇中溶解时的摩尔浓度相对稳定, 70% 乙醇中溶解乙酸铵时, 铵离子的摩尔浓度约为 7.4 mol/L, 接近水中硫酸铵的铵离子摩尔浓度。

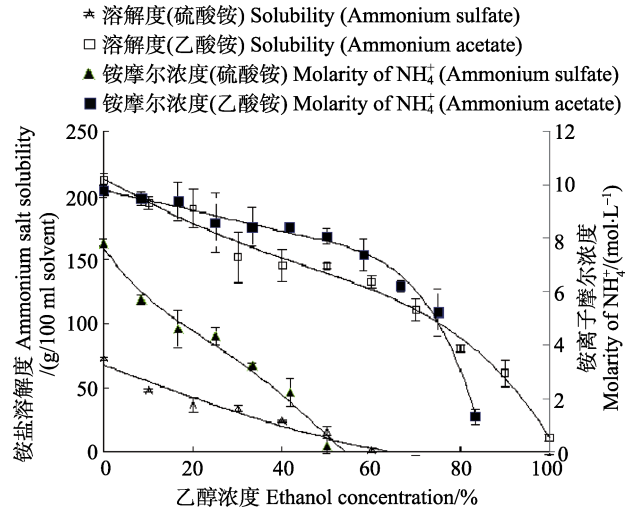


图 1 硫酸铵和乙酸铵在不同浓度乙醇溶剂中的溶解度和摩尔浓度

Fig.1 The solubility and molarity of ammonium sulfate and ammonium acetate in ethanol at different concentration

2.2 铵盐渗透效应的定性观察

铵盐对组织中核酸的保护作用首先需要铵盐能迅速有效地渗透入组织, 本研究采用琼脂糖凝胶中的碱式碳酸铜与组织中的铵盐在碱性条件下释放出的氨分子发生络和后产生颜色变化的原理, 建立了组织中铵盐存在情况的直观观察方法(图 2)。结果显示,

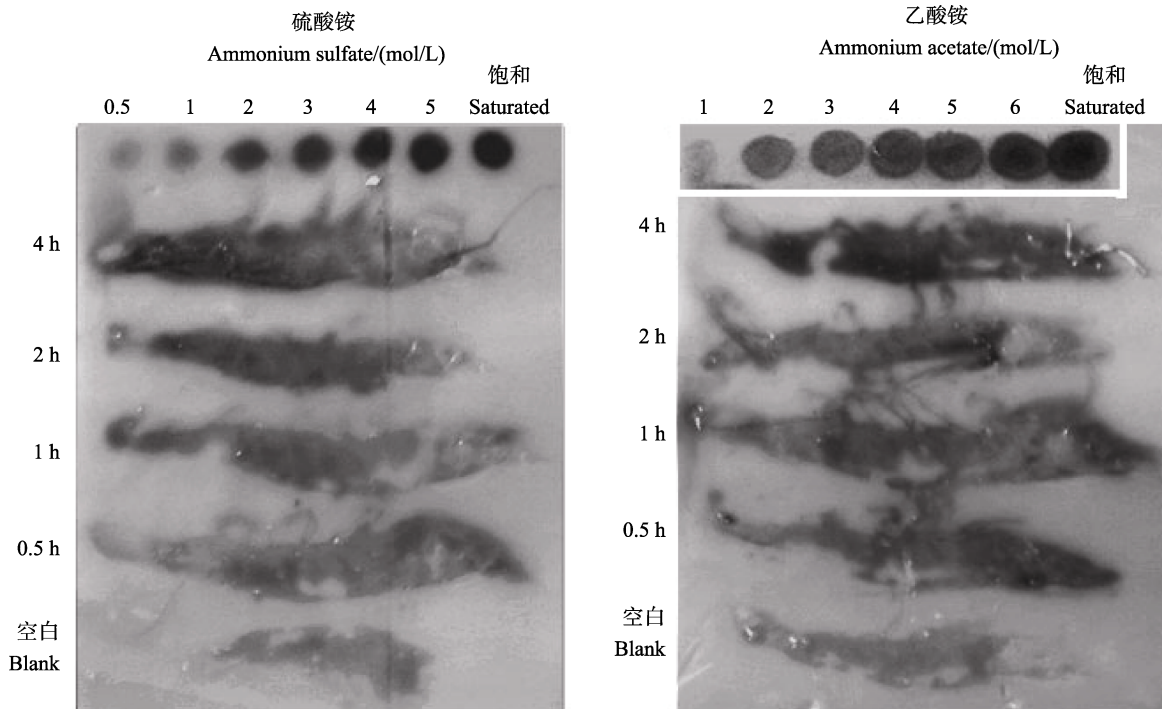


图 2 完整虾体浸泡铵盐饱和溶液后渗透效应的定性观察

Fig.2 Qualitative observation of the permeation in whole shrimp body immersed in ammonium salts solution

铵盐能使含碱式碳酸铜的不透明蓝白色琼脂糖凝胶变成深蓝色的半透明状,表明络合反应在此凝胶中得以有效进行。在 0.5–2 mol/L 范围内的铵盐溶液能在凝胶中显示出从浅到深的颜色差异,而高于 2 mol/L 的铵盐溶液在凝胶中产生的颜色变化差异不明显。未经铵盐浸泡的空白对虾在含碱式碳酸铜的凝胶中只能局部生成较浅的蓝色,这可能是虾体内代谢产生的少量氨,而浸泡在硫酸铵或乙酸铵饱和溶液中的虾体,随着浸泡时间的延长,经两种铵盐浸泡的虾体在凝胶中产生的蓝色都在加深。0.5 h 浸泡,铵盐浓度显示在虾头胸部首先出现升高,部分接近 2 mol/L 浓度,且在鳃部和头胸部尖端比较明显,说明铵盐能首先从比表面积较大的鳃部和头胸部尖端渗入;1 h 时部分腹节肌肉的凝胶颜色也在加深,节间区域较快,这可能是节间甲壳较薄的缘故;2 h 时,硫酸铵浸泡的虾腹节部位的凝胶颜色已基本出现均匀加深,4 h 时乙酸铵浸泡的整个虾体使凝胶中出现了很深的蓝色,硫酸铵浸泡的虾体也使凝胶中的蓝色普遍加深。需要注意的是,由于虾体不同部位与凝胶贴合的紧密程度存在差异,部分位置呈现出较浅的颜色可能并不代表真实的铵盐浓度。

2.3 铵盐对对虾肌肉组织的浸润作用

切取凡纳滨对虾肌肉小块在不同保存液中分别浸泡 1、2、4、8、12、24 h 后测定进入组织中的氨氮量(图 3),结果显示,肌肉组织小块内的氨氮浓度在浸泡后 1 h 内就已经基本达到了高峰,其中,硫酸铵(A0)和乙酸铵(B0)组均达到约接近 120 mg/g 组织的水平,

即 8.57 mol/kg,该浓度已达溶液中的饱和水平。而此后随着时间的延长,测得大部分实验组的组织中的氨氮浓度反而呈下降趋势。在 8 h 之后均趋于稳定,24 h 时硫酸铵(A0)约 70 mg/g 组织,乙酸铵(B0)约 85 mg/g 组织。含乙醇组的氨氮水平随乙醇量的增加而减低,其中硫酸铵组的氨氮水平比乙酸铵组减低得更显著,这与硫酸铵及乙酸铵在乙醇中的溶解性规律相符。

2.4 铵盐对完整虾体组织的渗透作用

完整的凡纳滨对虾在 8 种保存液母液中分别保存 1、2、4、8、12、24 h 后取不同部位的肌肉组织小块,检测其中的氨氮浓度。本研究选取了有代表性的紧贴甲壳的下方组织块和中间的组织块来测定。结果显示(图 4),硫酸铵和乙酸铵对完整虾体的渗透在 0–12 h 内均呈不断上升的趋势,12 h 后上升趋势减缓,硫酸铵对虾体的渗透效果显著低于乙酸铵,硫酸铵在浸泡 24 h 后的组织内氨氮浓度小于 7.5 mg/g,即 0.54 mol/kg (图 4-A0s);而乙酸铵浸泡 24 h 后组织内浓度达 36 mg/g 以上,即 2.6 mol/kg (图 4-B0s)。硫酸铵在组织中心和组织外层的铵盐浓度差异很小,乙酸铵在组织中心和组织外层的差异较明显。完整虾体与组织块浸泡的结果表明,完整的对虾甲壳对铵盐的渗透存在明显的阻碍作用,而乙酸铵更容易渗透入甲壳。

2.5 不同保存液保存的组织中 RNA 完整性的检测

凡纳滨对虾头胸部在室温条件下分别用 24 种保存液以及相应对照组中保存 1、3、7、14 d 后,提取组织 RNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察 RNA 的完整

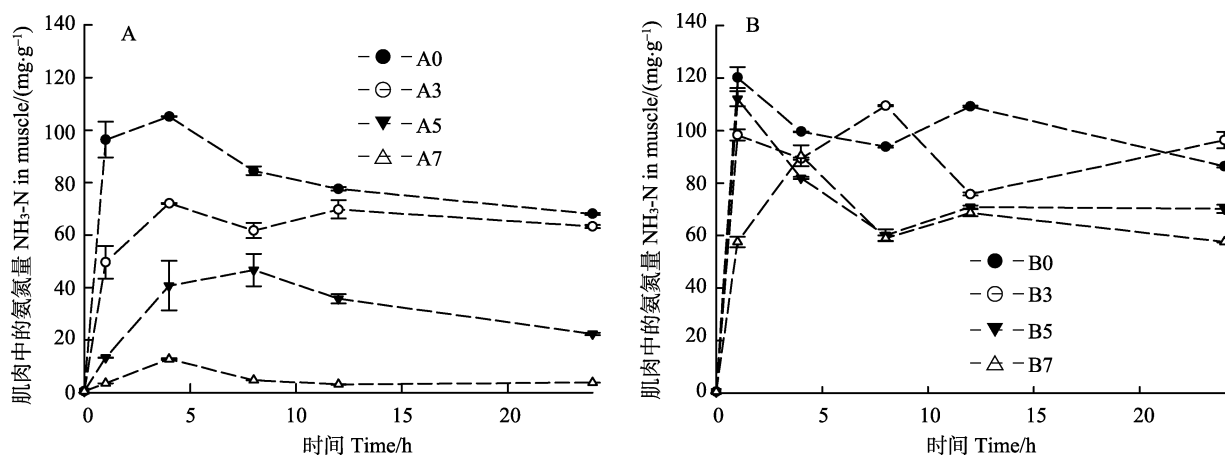


图 3 铵盐在组织小块中的渗透效应

Fig.3 Penetration of the ammonium salts in small pieces of shrimp tissues

A 表示硫酸铵, B 表示乙酸铵, 0 表示去离子水, 3 表示 30%乙醇, 5 表示 50%乙醇, 7 表示 70%乙醇

The legends indicate the solutions for preservation of the tissue pieces. The letters in the legends represent the solutes, of which "A" represents ammonium sulfate and "B" as ammonium acetate; the numbers in the legends represent the solvents, of which "0" represents water, "3" as 30% ethanol, "5" as 50% ethanol, "7" as 70% ethanol

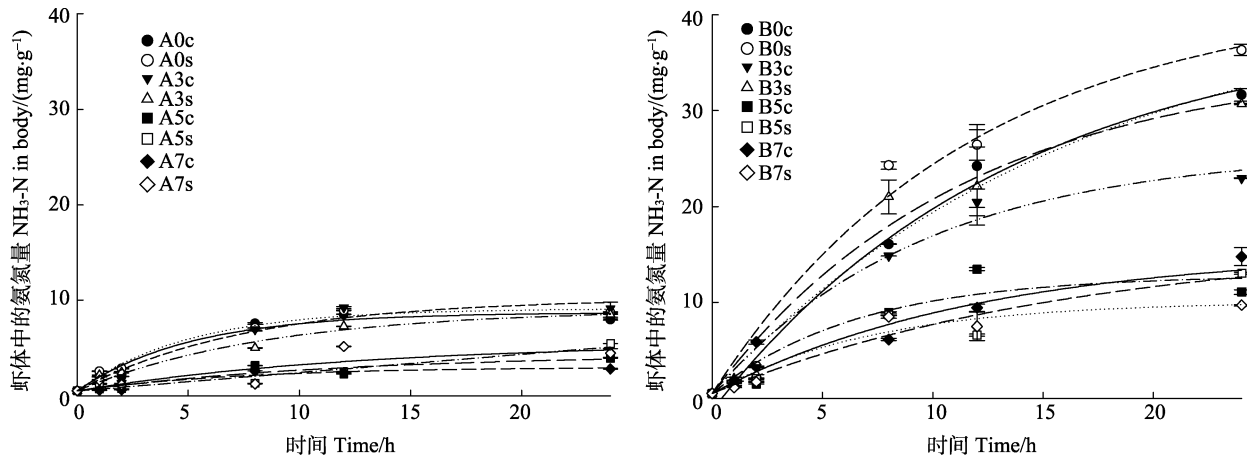


图 4 铵盐在虾体内的渗透效应

Fig.4 Penetration of the ammonium salts in intact bodies of *L. vannamei*

A 表示硫酸铵, B 表示乙酸铵; 0 表示去离子水, 3 表示 30%乙醇, 5 表示 50%乙醇, 7 表示 70%乙醇; c 表示内层组织, s 表示外层组织

The legends indicate the preserving solutions and the tissue locations. The capital letters in the legends represent the solutes, of which “A” represents ammonium sulfate and “B” as ammonium acetate; the numbers in the legends represent the solvents, of which “0” represents water, “3” as 30% ethanol, “5” as 50% ethanol, “7” as 70% ethanol; the lowercase letters in the legends represent the locations of the tissue, of which “c” represents the tissue taken at the center of the body and “s” represents the tissue taken from the superficial parties of the body

性。结果显示, 新鲜组织提取的 RNA 电泳结果可见清晰的两条 28S 和 18S 的区带(图 5)。

对照组保存的样品中, 甲醛保存的样品大多数情况下完全没有抽提出 RNA(图 6, a-d, 泳道 16-18); RNAlater、30%乙醇、-20℃ 冰冻等方式均未能完全阻止 RNA 的降解(图 6, a-d, 泳道 1-6 和 19-21); 50%乙醇保存以及 -80℃ 冻存对 RNA 的保存有所改善, 抽提的样品中大体可见 18S 和 28S 的条带(图 6, a-d, 泳道 7-9 和 22-24); 70%和 95%乙醇保存的样品抽提的 RNA 最完整, 两条区带最清晰(图 6, a-d, 泳道 10-15), 但偶尔有未抽提到 RNA 的情况出现(图 6-a, 泳道 13), 在保存 14 d 后, 核酸浓度也明显下降(图 6-d, 泳道 10-15)。

在不同的硫酸铵保存液的实验组中(图 7), 饱和硫酸铵水溶液保存 1-14 d 的 RNA 电泳结果均显示一定程度的降解, 总 RNA 中的 18S 和 28S 条带已经消

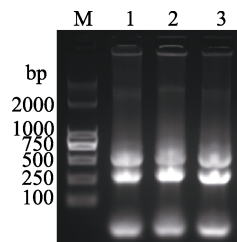


图 5 新鲜对虾头胸组织提取的总 RNA 电泳
Fig.5 Electrophoretogram of total RNA extracted from fresh tissue of shrimp cephalothorax

泳道 M: DL2000; 泳道 1、2 和 3 为新鲜组织提取的 RNA

Lane M: DL2000; Lanes 1, 2, and 3 are total RNA extracted from fresh tissue

失成为模糊一片(图 7, A05、A06 和 A07); 30%乙醇中的饱和硫酸铵溶液保存 1 d, 只有 pH=5.0 组有两条区带, 但在 3-14 d 的保存中, 不同 pH 的组还有可见条带及弥散区域(图 7, A35 和 A36); 50%乙醇中的饱和硫酸铵溶液保存的组织, 1 d 时提取的 RNA 有两条带, 随时间延长条带逐渐模糊, 平行组中部分样品存在重复性问题(图 7, A55、A56 和 A57); 70%乙醇中的饱和硫酸铵溶液保存 1-14 d 的组织中提取的 RNA 电泳, 多数结果显示, 28S 和 18S 条带界限清晰完整, 但与无硫酸铵的 70%乙醇的差异不大。

饱和乙酸铵的水溶液保存组织 1 d, 提取的 RNA 电泳结果中 18S 和 28S 条带清晰(图 8-a, B05、B06 和 B07), 3 种 pH 相比较, pH=6.0 的保存效果最好(B06); 30%乙醇中的饱和乙酸铵溶液保存组织 1 d, RNA 条带较微弱, 保存 3-14 d 后条带变得模糊, 在 pH=5.0 条件下稍好于其他 pH(图 8, B35); 50%乙醇中的饱和乙酸铵溶液保存组织 1 d, 提取的 RNA 电泳结果可见非常清晰的 3 条带, 而且 pH=5.2、pH=6.0 及 pH=7.0 的保存液提取的 RNA 条带亮度无明显差别, 但在 3 d 之后条带有所减弱, 7 d 后 28S 和 18S 的界限变得模糊, 28S 条带逐渐消失, 14 d 后 18S 也变得模糊(图 8, B55、B56 和 B57); 70%乙醇中的饱和乙酸铵溶液保存组织 1 d, RNA 28S 条带已很模糊, 只有 18S 条带, 随时间延长, 18S 条带也逐渐模糊, 劣于无乙酸铵的 70%乙醇的保存效果。

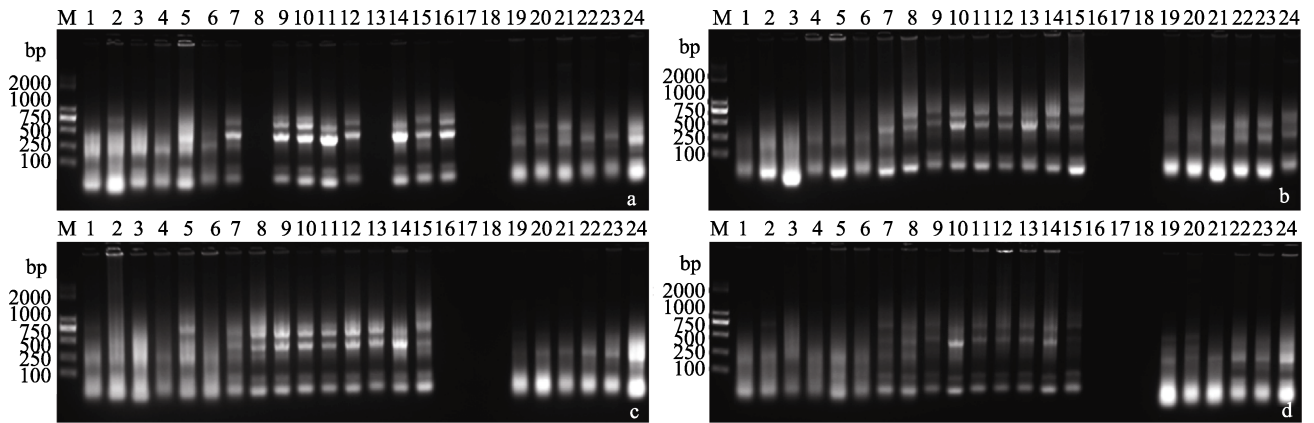


图6 对照保存1-14 d组织中提取的总RNA电泳

Fig.6 Electrophoretogram for total RNA extracted from tissues preserved for 1-14 d by control treatments

A: 1 d; B: 3 d; C: 7 d; D: 14 d; 泳道 M: DL2000; 泳道 1-3: RNA later; 泳道 4-6: 30%乙醇; 泳道 7-9: 50%乙醇; 泳道 10-12: 70%乙醇; 泳道 13-15: 95%乙醇; 泳道 16-18: 甲醛; 泳道 19-21: -20°C; 泳道 22-24: -80°C

A: 1 d; B: 3 d; C: 7 d; D: 14 d; Lane M: DL2000; Lane 1-3: RNA later; Lane 4-6: 30% ethanol; Lane 7-9: 50% ethanol; Lane 10-12: 70% ethanol; Lane 13-15: 95% ethanol; Lane 16-18: Formaldehyde; Lane 19-21: -20°C; Lane 22-24: -80°C

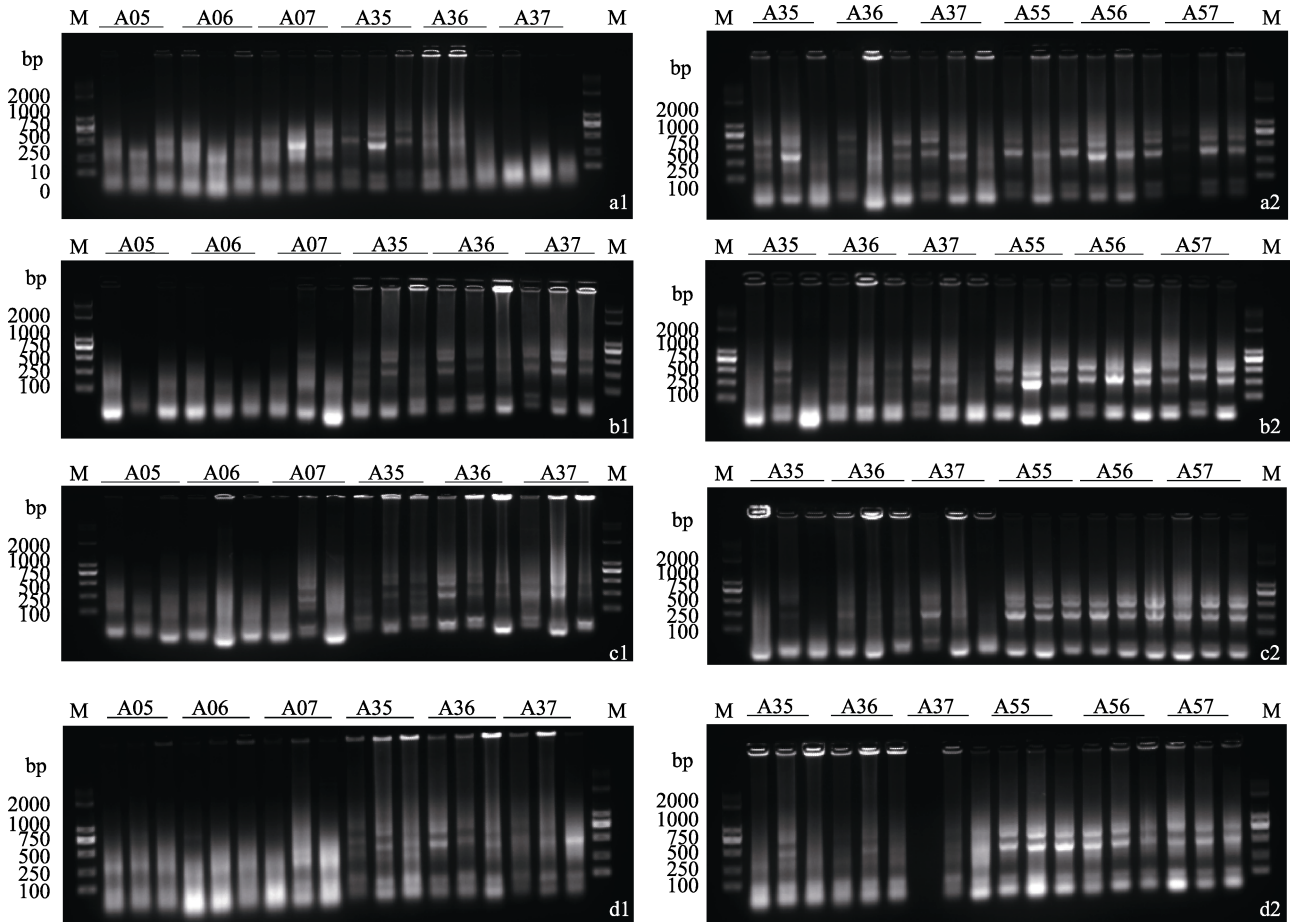


图7 硫酸铵保存液保存1-14 d的组织中提取的总RNA电泳

Fig.7 Electrophoretogram for total RNA extracted from tissues preserved in the ammonium sulfate solutions

a: 样品保存1 d; b: 3 d; c: 7 d; d: 14 d; 泳道 M: DL2000; 每种保存液保存的组织提取的总RNA采用3个泳道进行电泳, 相应泳道上标注保存液代号

a: Stored for 1 d; b: 3 d; c: 7 d; d: 14 d; M: DL2000. Each sample of the total RNA extracted from tissues preserved in different ammonium sulfate solutions was added in 3 lanes which was labeled with the code of the solutions

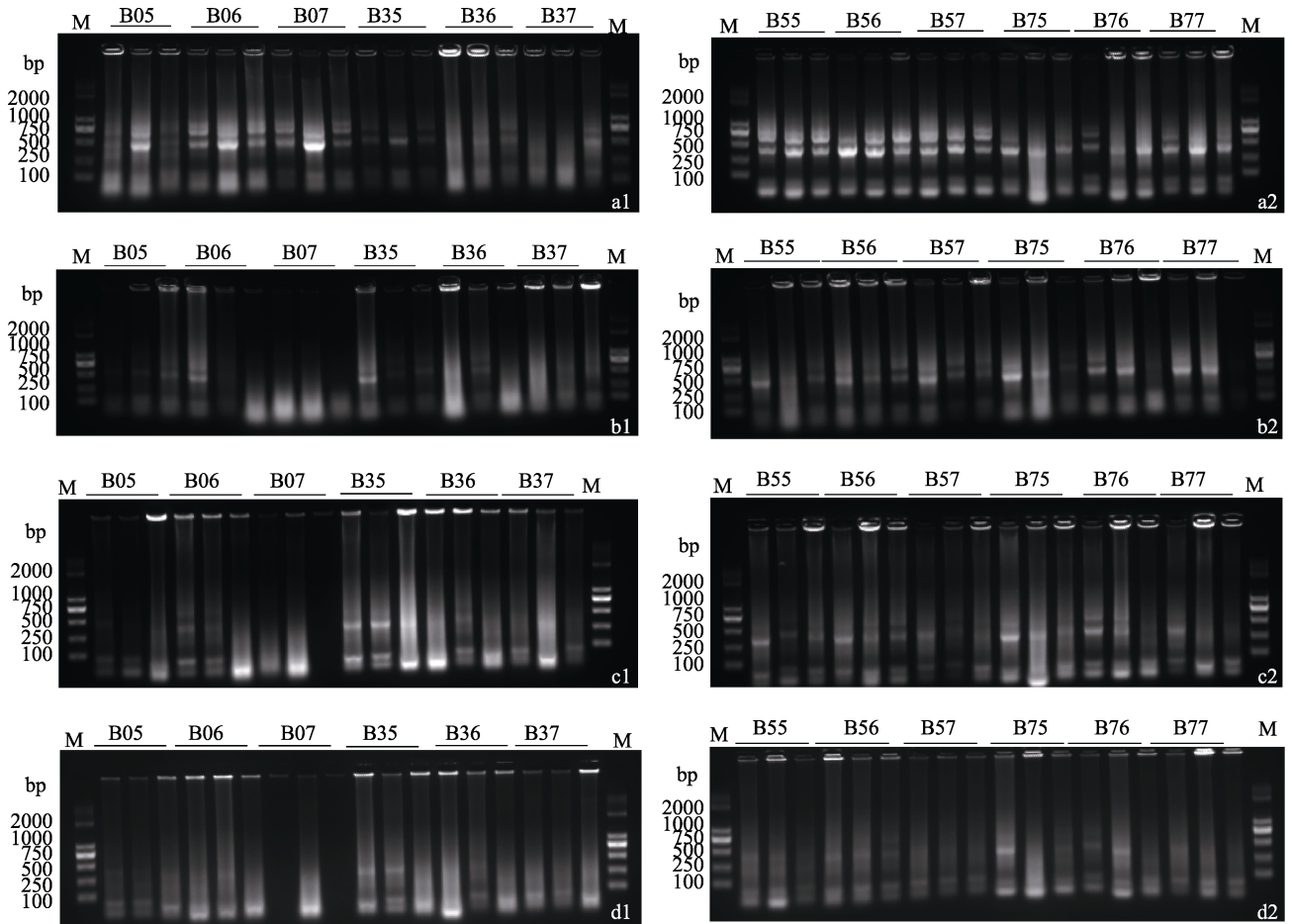


图 8 乙酸铵保存液保存 1-14 d 组织中提取的 RNA 电泳

Fig.8 Electrophoretogram for total RNA extracted from tissues preserved in ammonium acetate solution B05-B37 for 1-14 d

a: 1 d; b: 3 d; c: 7 d; d: 14 d; 泳道 M: DL2000; 每种保存液保存的组织提取的总 RNA 采用 3 个泳道进行电泳, 相应泳道上标注保存液代号

a: 1 d; b: 3 d; c: 7 d; d: 14 d; Lane M: DL2000. Each sample of the total RNA extracted from tissues preserved soaked in different ammonium acetate solutions was added in 3 lanes which was labeled with the code of the solutions

2.6 RNA 定量检测

利用荧光定量 PCR 仪对各保存液保存 0、1、3、7 d 的组织提取 RNA 的反转录产物进行定量, 单位质量组织中的核酸拷贝数对保存时间作图(图 9), 结果显示, 各保存组中组织 RNA 的降解速度在 1 d 以内速度很快, 3-7 d 的保存后组织中核酸拷贝数下降则相对缓慢, 硫酸铵各组间的差异性大于乙酸铵各组。组织中初始 3.2×10^9 copies/g 组织的 RNA 用 A75-A77、B55-B57、B75-B77 经 1 d 的常温保存, RNA 拷贝数均还在 10^9 copies/g 组织以上, 各种保存液保存 7 d 后的最终单位组织核酸拷贝数均在 10^7 - 10^8 copies/g 组织, 其中, 7 d 常温保存后 RNA 拷贝数下降不超过 20 倍的组包括 A37 (13.04)、A56 (7.25)、A57 (5.39)、A75 (3.51)、A76 (3.70)、A77 (3.65)、B05 (18.94)、B36

(8.44)、B37 (11.41)、B55 (18.78)、B56 (4.62)、B57 (11.46)、B75 (12.87)和 B76 (18.36)。对照组中, 70%和 95%乙醇组保存 1 d 后的 RNA 拷贝数在 10^9 copies/g 组织以上, 不同乙醇保存 7 d 后组织中 RNA 数量下降均不超过 20 倍, 分别是 30%乙醇(7.16)、50%乙醇(17.72)、70%乙醇(4.92)和 95%乙醇(6.29), 而甲醛保存的组织中所测得的 RNA 拷贝数下降最快, 3 d 后就已超过 1500 倍。

2.7 组织中 RNA 的半衰期

对上述 RNA 拷贝数的对数值与时间关系的变化进行线性回归, 并固定初始拷贝数对数值, 按自然衰减原理对各组 RNA 拷贝数的变化计算平均半衰期(图 10), 结果显示, 平均半衰期在 2 d 以上的组包括 A56 (2.15 ± 0.60 d)、A57 (2.26 ± 1.32 d)、A75 (3.22 ± 1.31 d)、A76

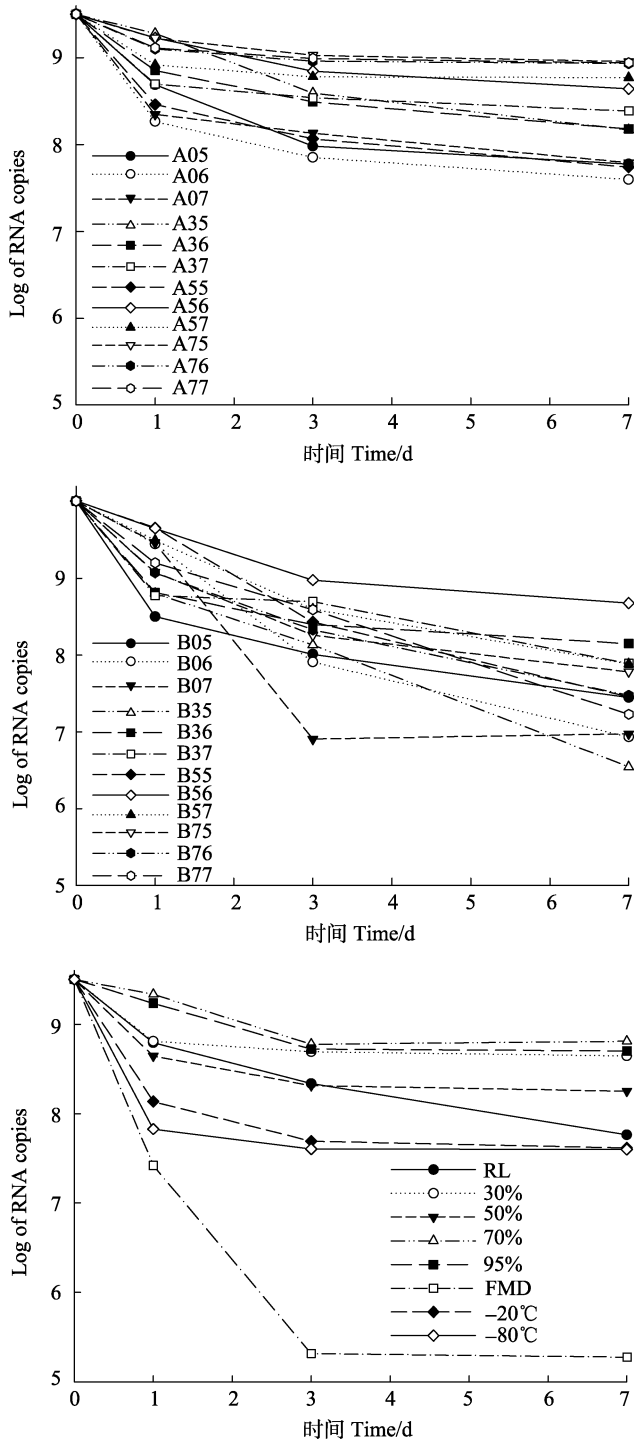


图9 各保存组的组织中RNA数量的荧光定量PCR检测结果

Fig.9 Results of FQ-PCR detection for the RNA copies in the tissues of each preservation group

A05-A77: 硫酸铵保存液; B05-B77: 乙酸铵保存液; RL: RNAlater; 30%-95%: 30%-95%乙醇; FMD: 甲醛
 A05-A77: preserved with ammonium sulfate; B05-B77: preserved with ammonium acetate; RL: preserved with RNAlater; 30%-95%: preserved with 30%-95% ethanol; FMD: preserved with formaldehyde

用可能主要是由于乙醇的保护作用所致,考虑到高浓度乙醇在运输中存在风险,以及由于硫酸铵在70%以上乙醇中溶解度太低,用70%清洗组织及提取的DNA时可能不容易将硫酸铵抽提出来,因此本研究推荐使用pH=6.0的乙酸铵的50%乙醇饱和溶液作为保存液。实验结果也表明,在特定的保存液缺乏、而运输风险不高的情况下,70%以上的乙醇能较好地保存其中的RNA,其效果优于RNAlater或-80℃冰冻。

3 讨论

目前对陆生动植物组织保存及核酸提取的研究很多(罗晨玲等, 2001; 王敏强等, 2009; 李维凯等, 2012; 路俊锋等, 2010; Bainard *et al*, 2010)。但针对组织与细胞结构都不同于陆生生物的水生动物的保存研究还少有报道。在海洋动物组织的保存中应用最多的是福尔马林和乙醇溶液。但福尔马林因其较强的挥发性,对实验人员眼睛、呼吸道及皮肤可能造成危害,危害身体健康;另外,很多研究指出,经福尔马林保存的组织中DNA和RNA提取效果不理想(方旅平等, 2005; 刘保忠等, 2001),虽然有学者已探索出一些方法将样品经过复杂的预处理后可以提取到能够应用于后续分子研究的核酸(方旅平等, 2005; 夏颖哲等, 2007; Rivero *et al*, 2006; de Bruyn *et al*, 2011),但由于其步骤繁杂、耗费时间较长而不能被广泛应用。本研究中利用甲醛保存组织提取的RNA电泳结果没有条带,保存3d后荧光定量实验表明回收的RNA拷贝数下降了1500倍以上,远低于新鲜组织和其他保存液。这种结果可能是由于甲醛对蛋白质以及核酸的氨基的固定作用,使核酸被牢牢地封固在组织中,保存后的组织在提取核酸之前只经过简单清洗操作,影响了甲醛保存样品中核酸的得率。另一种常见的保存液乙醇,特别是高浓度乙醇,因其价格低和使用方便而被广泛用于样品短期或长期保存,而且提取的核酸质量与完整性均能满足实验要求(方旅平等, 2005; 罗晨玲等, 2001)。但高浓度乙醇由于其易燃性的特点,在邮寄、国际货运、航空运输以及大量样品的集中存放中都受到严格限制。Lader等(2001)发明的RNAlater以及其他以高浓度铵盐(杜迎彬等, 2013)为主要成分的水相保存液为突破这些限制提供了较好的替代性选择,对陆生动物RNA有很好的保存效果(路俊锋等, 2010),对水生动物凡纳滨对虾的RNA的保存中常温保存7d后还能看到较模糊的RNA区带,但仍然存在保存样品中RNA含量短期内快速下降的问题,这一问题的原因可能是高浓度铵盐对组织的渗透速度(2.96±1.56 d)、A77 (3.03±1.54 d)、B56 (2.79±0.76 d)、

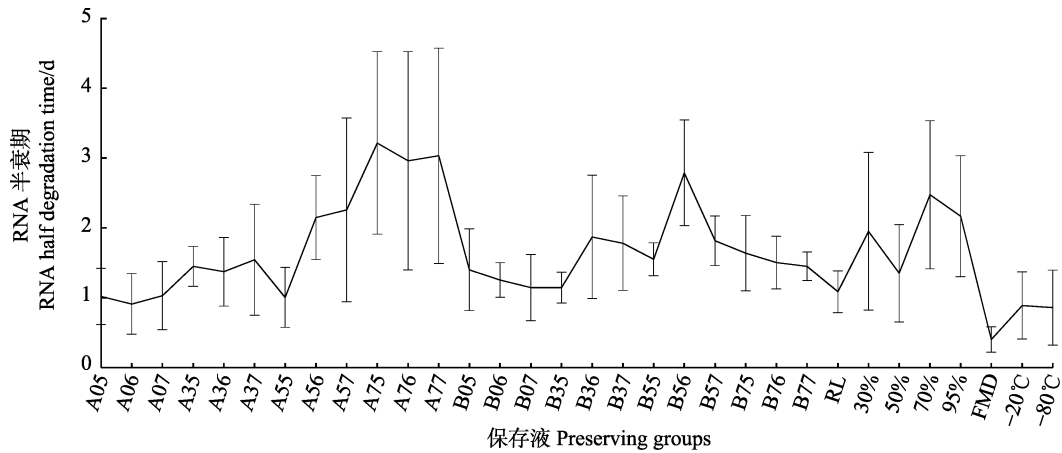


图 10 各组组织中 RNA 半数降解时间

Fig. 10 The RNA half degradation time of the each preserving group

A05–A77: 硫酸铵保存液; B05–B77: 乙酸铵保存液; RL: RNAlater; 30%–95%: 30%乙醇–95%乙醇; FMD: 甲醛
 A05–A77: preserved with ammonium sulfate; B05–B77: preserved with ammonium acetate; RL: preserved with RNAlater;
 30%–95%: preserved with 30%–95% ethanol; FMD: preserved with formaldehyde

70%乙醇(2.47 ± 1.06 d)和 95%乙醇(2.17 ± 0.87 d)。

根据上述铵盐渗透效应及 RNA 保存效果进行综合分析, 可见 50%乙醇中饱和硫酸铵和乙酸铵在 pH=6.0 的条件下对组织中 RNA 的保护效果均较好; 而硫酸铵的 70%乙醇饱和溶液也表现出优秀的保护效果, 但该溶液中硫酸铵浓度已经非常低, 其保护作用不够快所致(杜迎彬等, 2013)。但本研究中的 RNAlater 常温保存 1 d 的组织提取的 RNA 已经发生降解, 这可能是由于 RNAlater 对不同组织的渗透效应差异所致。因此探索一种能在常温条件下对水生动物核酸保存效果稳定、简便、安全的保存液对实验室样品采集及后续科研工作有重要意义。

一种好的保存液应该能快速地渗透组织, 但组织保存研究中很少对组织的渗透速度开展有效研究, 本研究通过测定渗透到组织中的保存液成分的浓度来检测各种保存液的渗透能力。组织小块中铵盐渗透效应的测定结果显示, 乙酸铵饱和溶液浸泡的组织小块中氨氮浓度能很快达到 85 mg/g 组织, 高于硫酸铵组的 70 mg/g 组织; 50%、70%乙醇溶液中的硫酸铵饱和溶液浸泡的组织块中氨氮浓度不到 20 mg/g 组织或更低, 而相应乙醇溶液中乙酸铵饱和溶液浸泡的组织块中氨氮可以达到 80 mg/g 组织或接近 60 mg/g 组织。在完整虾体中, 饱和乙酸铵浸泡的虾体中氨氮浓度可达到 36 mg/g 组织; 而饱和硫酸铵溶液组只有 7.5 mg/g 组织。上述结果表明, 甲壳对铵盐渗透虾体有一定的阻碍作用, 且乙酸铵较硫酸铵更容易穿透甲壳进入组织中。在使用 Davidson's AFA 固定对虾组织时, 需要首先对对虾肝胰腺和肌肉多点注射固定液, 然后再割开甲壳, 以便使固定液能尽快渗入组织中(Bell *et al.*,

1988), 因此, 采用本研究保存液对整体对虾进行保存时, 也可采用这种方法, 以使保存液能尽快渗透到组织中。

作为对照组, 本研究验证了不同浓度的乙醇保存的组织对 RNA 的保护效果, 结果显示, 30%乙醇不能有效保护组织中的 RNA; 50%乙醇在 1 d 内保存的效果较好, 随着时间延长, 保存效果逐渐变差。70%和 95%乙醇保存 14 d 后 RNA 的完整性依然很好, 验证了较高浓度的乙醇能对组织中的 RNA 起到良好的保存效果。70%乙醇配制的饱和硫酸铵溶液保存组织直到 14 d 均能得到清晰完整的 RNA 区带, 其平均半衰期在 2 d 以上, 在各实验组中表现出最好的保护效果, 但 70%乙醇中的硫酸铵浓度太低, 因此, 该溶液的保存效果可能主要来自于 70%乙醇。用 50%乙醇配制的饱和乙酸铵(pH=6.0)溶液保存的组织也可得到较完整的 RNA, 半衰期在 2 d 以上, 因该溶液中乙醇的含量较低, 因此在贮存和运输上均有比较好的安全性。此外, 考虑到后续核酸提取时可能有去除铵盐的需要, 而硫酸铵在 60%以上的乙醇溶液中溶解度极低, 所以在抽提核酸时, 不论是最初用乙醇清洗组织块还是最后用乙醇沉淀核酸, 都难以将硫酸铵完全清洗干净, 从而可能影响核酸提取效果及后续的分子学实验。综合考虑两种铵盐在对虾组织中的渗透能力、RNA 完整性和降解速率、后续提取操作以及高浓度乙醇在运输过程中存在的安全隐患, 推荐 50%乙醇配制的饱和乙酸铵(pH=6.0)作为对虾组织 RNA 样品常温保存液。此外, 研究表明, RNAlater 和饱和硫酸铵虽然在常温下有较好的 RNA 保存效果, 但低温更有利于长期保存(杜迎彬等, 2013), 因此, 在有条件进

行低温保存时,建议进行低温保存,不同温度下的保存效果有待进一步验证。

参 考 文 献

- 王敏强,王斌,刘晓玲. 保存温度与时间对动物组织 DNA 提取质量的影响. 安徽农业科学, 2009, 37(33): 16407-16409
- 方旅平,林元烧,曹文清. 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, 2005, 29(2): 1-4
- 李维凯,霍韬光,畅蓓,等. 保存条件对大鼠海马组织总 RNA 质量的影响. 化学研究, 2012, 23(5): 93-96
- 刘保忠,宋林生. 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, 2001, 25(3): 51-53
- 张世秀,张新中,谢珍玉,等. 分子生物学技术在水产养殖动物细菌性病原检测中的应用. 海南大学学报(自然科学版), 2007, 25(1): 96-100
- 杜迎彬,王志杰,杨冰,等. 对虾组织样品中 RNA 的铵盐常温保存法及其效果. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 88-96
- 张丽荣,朱筱娟,杨绍娟,等. FineFix 固定液与福尔马林固定液对组织保存及固定的比较. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(5): 573-575
- 罗晨玲,陈清. 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, 2001, 11(3): 44-46
- 贺电,吴后波. 分子生物学技术在水产养殖动物病原快速检测中的应用. 海洋科学, 2007, 31(3): 76-81
- 夏颖哲,张春光,陈宜瑜,等. 福尔马林保存鱼类标本中大片段 DNA 的提取. 水生生物学报, 2007, 31(4): 485-491
- 路俊锋,陈宏,吴劲松,等. 不同保存方法对脑胶质瘤和其周边组织 RNA 保存的研究. 中国临床神经科学, 2010, 18(2): 199-202
- Bainard LD, Klironomos JN, Hart MM. Differential effect of sample preservation methods on plant and arbuscular mycorrhizal fungal DNA. J Microbiol Methods, 2010, 82(2): 124-130
- Bell TA, Lightner DV. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 1988
- de Bruyn M, Parenti LR, Carvalho GR. Successful extraction of DNA from archived alcohol-fixed white-eye fish specimens using an ancient DNA protocol. J Fish Biol, 2011, 78(7): 2074-2079
- Lader E. Methods and reagents for preserving RNA in cell and tissue samples. United States Patent. US6,204,375B1 (2001)
- Rivero ER, Neves AC, Silva-Valenzuela MG, et al. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Pathol Res Pract, 2006, 202(7): 523-529

(编辑 冯小花)

Selection and Optimization of Simple and Convenient Sample Solutions for Shrimp Tissue Preservation at Normal Temperature

CHEN Datian^{1,2}, HUANG Jie^{1,2,3①}, WANG Hailiang¹, LI Jin^{1,2}

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

2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. National Oceanographic Center, Qingdao 266071)

Abstract Molecular biology technologies have been widely used in aquatic animal disease diagnosis and molecular pathology studies, which require high quality of nucleic acid. However, how to preserve sample quality at normal temperature is rarely investigated. In this study, we compared the preserving effect of RNA in the tissues of shrimp *Litopenaeus vannamei* stored in different preservation solutions at normal temperature to find one preservation solution that can be used at normal temperature and long-distance transportation. Saturated solutions of ammonium sulfate and ammonium acetate in a serial of solvents with different ethanol concentrations were used to preserve shrimp tissues. The results showed that ammonium acetate has higher solubility in ethanol solution than ammonium sulfate. The molarity of ammonium ion of ammonium acetate is steadier in 0-80% ethanol. Ammonium acetate penetrates into the tissue of intact shrimp faster and reaches a higher concentration than ammonium sulfate does. RNA with better integrity, higher copies, and longer half-life period was achieved in the tissue preserved in more than 70% ethanol, saturated ammonium sulfate in the solvent of 50% and 70% ethanol, saturated ammonium acetate in the solvent of 50% ethanol. These results suggest that the saturated ammonium acetate in 50% ethanol as the solvent (pH=6.0) can be used as sample preserving solution to preserve RNA in shrimp tissues at normal temperature.

Key words Ammonium salt; Ethanol; Normal temperature; RNA

① Corresponding author: HUANG Jie, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn