

杨秀荣,王庆容,刘惠茹. 保存温度对黄颡鱼肝组织总 RNA 质量的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):258-260.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.077

保存温度对黄颡鱼肝组织总 RNA 质量的影响

杨秀荣,王庆容,刘惠茹

(遵义师范学院生命科学院,贵州遵义 563002)

摘要:以黄颡鱼肝脏为试验材料,用 TRIzol 法提取肝脏组织总 RNA,将试验样品置于不同温度下保存,在 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测 RNA 的质量。结果显示:在低温没有密封储存的情况下,RNA 保存较长时间,完整性好; -70 ℃ 下 RNA 可以保存 8 个月, -20 ℃ 下 RNA 可以保存 4 个月;在其他温度条件下,若密封保存,4 ℃ 下可保存 2 周,10 ℃ 下可保存 4 d 以上,20 ℃ 下保存 3 d 时条带清晰,保存 4 d 时条带模糊,30 ℃ 下保存 2.5 d 时条带变得模糊,到 3 d 时全部降解,40 ℃ 下保存 1 d 条带清晰,保存 2 d 条带变得模糊,保存 2.5 d 时完全降解。此外应注意的是,RNA 如果暴露于空气中,5 h 内所有试验组的 RNA 大多数降解。

关键词:黄颡鱼;肝脏总 RNA;保存温度;RNA 完整性

中图分类号:S917 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)11-0258-03

近年来,分子生物学各项技术无论在医学方面还是生物学方面的各个领域均得到广泛应用,高质量的 RNA 则是其他后续试验的基础。如 Northern blot 及杂交分析、寡聚(dT)纤维素选择分离 mRNA、cDNA 文库的构建、逆转录酶聚合酶链式反应(reversetranscriptase-polymerase chain reaction,简称 RT-PCR)、RNA 原位杂交、转基因材料鉴定、基因克隆及其表达等试验的成败,在很大程度上取决于 RNA 的质量^[1],对于 RNA 的质量评价,完整性和均一性是其关键因素^[2]。RNA 特殊的单链结构导致其自身结构极不稳定,加上周围环境中广泛分布 RNA 酶(RNase)并且难以灭活,导致 RNA 很容易降解。有些试验过程中使用 RNA 的时间跨度较大,因此确定 RNA 在不同温度下能保存的最长时间就尤其重要。关于

不同温度对 RNA 质量的影响及不同保存温度下 RNA 能够保存的最长时间方面的研究,目前相关报道较少。本试验以黄颡鱼肝组织 RNA 为试验材料,研究不同保存温度对 RNA 质量的影响,以期对分子生物学研究者日后如何保存 RNA 提供可行性参考。

1 材料与方法

1.1 试剂配制

0.5 × TBE 的配制。将 10.8 g Tris、5.5 g 硼酸、0.744 g EDTA-Na₂ 溶解于经高温灭菌的 2 000 mL 蒸馏水中,充分摇匀,调节 pH 值至 8.0。

琼脂糖凝胶的制备。取 0.7 g 琼脂糖溶解于盛有 70 mL 0.5 × TBE 溶液的蓝盖瓶中,将其放入微波炉中反复加热 3 ~ 4 次,直至琼脂糖完全溶解;待胶液冷却至 60 ℃,向其中加入 7 μL GoldView I 型核酸染色剂(其中琼脂糖的比例为 1%,核酸染料的比例为 0.01%),将胶液倒入事先已清洗干净、晾干且插入制胶梳子的胶槽之中,等到胶块冷却凝固后,即可将梳子拔出,完成用于电泳的琼脂糖胶块制作。

1.2 RNA 的提取与检测

1.2.1 TRIzol 法提取总 RNA^[3] 取健康黄颡鱼,用剪刀钝处猛击其头部使其昏厥,立即由泻殖孔剪至鳃盖后缘,迅速取肝脏组织(50 mg),将所取组织块放入 1.5 mL EP 管内并迅速置于液氮中速冻。

收稿日期:2015-11-11

基金项目:贵州省科技厅农业攻关项目(编号:黔科合 NZ[2013]3027 号);贵州省“125 计划”重大科技专项(编号:黔教合重大专项字[2013]025);贵州省科技厅联合基金(编号:黔科合 J 字 LKZS[2012]17 号)。

作者简介:杨秀荣(1962—),男,贵州沿河人,教授,主要从事遗传学、分子生物学教学与科研以及养殖动物疾病的中草药防治工作。
E-mail: yangxiurong7525@163.com。

通信作者:王庆容,硕士,教授,研究方向为动物分子生物学、鱼类遗传多样性、养殖动物疾病的中草药防治。E-mail: 610194977@qq.com。

[J]. 中国病原生物学杂志,2011,6(7):494-496.

[4] 韩 蕾,张旭燕,韩少山,等. 临床致病性不动杆菌的分子生物学鉴定[J]. 西安交通大学学报:医学版,2012,33(5):611-616.

[5] 陈翠珍,张晓君,房 海,等. 锦鲤中琼氏不动杆菌的分离与鉴定[J]. 水生生态学杂志,2009,2(1):86-90.

[6] 陆文浩,陈 辉,王习达,等. 异育银鲫致病性鲍曼不动杆菌的鉴定和系统发育分析[J]. 中国兽医科学,2009,39(4):303-309.

[7] 沈晓静,胡秀彩,兰 云,等. 锦鲤荧光假单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 水产科学,2014,33(7):443-446.

[8] 李劲松,魏殿军,祁 伟,等. 鲍曼不动杆菌临床分离株的耐药分析[J]. 天津医药,2003,31(6):373-375.

[9] 黄 林,陈全胜,张燕华,等. 冷却猪肉优势腐败菌分离鉴定及腐败能力测定[J]. 食品科学,2013,34(1):205-209.

[10] 毛芝娟,毛甬州,汪建萍. 两株鱼源琼氏不动杆菌的分离、鉴定和耐药特性分析[J]. 水产学报,2013,37(10):1572-1576.

[11] 张 涵,周 涛,王 岩. 综合养殖池塘中三角帆蚌和鱼类肠道细菌的组成[J]. 水生生物学报,2013,37(5):824-835.

[12] 刘 君,宋晓玲,陈志鑫. 益生菌对水产动物的作用研究进展[J]. 动物医学进展,2009,30(9):78-81.

向提前灭菌的研钵中倒入液氮以预冷研钵、研钵棒,采用液氮冷冻组织的方法,将组织置于液氮中充分研磨 5 min(在研磨过程中要注意及时补充液氮),最终将组织研磨至粉状。用经高温消毒的小钥匙将粉末集中,加入 2 000 μ L TRIzol 试剂以充分破碎细胞组织(按每 100 mg 组织加入 4 000 μ L 计算),待解冻后转入 2 个 1.5 mL EP 管内,离心 5 min(13 000 g,4 $^{\circ}$ C)。取 900 μ L 上清液转至新的 1.5 mL EP 管中,加入 400 μ L 三氯甲烷,用力振荡摇匀,室温静置 5 min,离心 15 min(13 000 g,4 $^{\circ}$ C)。将上清液合并于新的 1.5 mL EP 管中,加入 400 μ L 三氯甲烷,用力振荡摇匀,室温静置 2 ~ 3 min,离心 15 min(13 000 g,4 $^{\circ}$ C)。取上清液于另 1 支 EP 管中,加入等体积异丙醇,轻轻摇匀,冰上静置 15 min,离心 15 min(13 000 g,4 $^{\circ}$ C)。弃上清,向白色沉淀中加入用 1 000 μ L DEPC 水配制的 75% 乙醇清洗沉淀(轻摇混匀),离心 5 min(13 000 g,4 $^{\circ}$ C),倒掉上清液。真空干燥 RNA 沉淀,溶解于 30 μ L DEPC 水中。整个总 RNA 提取过程均在冰上进行,实验台经 70% 乙醇消毒,铁制试验器具经 200 $^{\circ}$ C 高温消毒 300 min,塑料器具置于 DEPC 水中浸泡过夜后高温灭菌 40 min,试验步骤严格按照规范操作,以防 RNA 酶污染。

1.2.2 RNA 质量检测 通过琼脂糖凝胶电泳的方法对各组 RNA 进行检测:将胶板没于 0.5 \times TBE 的电泳液中,取 5 μ L RNA 样品与 1 μ L 6 \times 载样缓冲液(loading buffer)混匀后加至点样孔中,130 V 电压电泳 20 min,此时条带已接近胶块中央^[4],将胶块置于凝胶成像分析仪下观察并拍照记录试验结果。

1.3 RNA 的保存

黄颡鱼肝组织总 RNA 保存条件见表 1。

表 1 黄颡鱼肝组织总 RNA 保存条件

保存温度 ($^{\circ}$ C)	保存时间							
-70	1 月	2 月	3 月	4 月	5 月	6 月	7 月	8 月
-20	1 月	2 月	3 月	4 月				
4	5 h	10 h	15 h	20 h	25 h	3 d	7 d	14 d
10	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	1 d	3 d	5 d
20	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	1 d	3 d	4 d
30	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	1 d	2.5 d	3 d
40	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	1 d	2 d	

2 结果与分析

2.1 RNA 的提取

所提 RNA 通过琼脂糖凝胶电泳后于凝胶成像分析仪下观察,图 1 显示,所提 RNA 均出现 28S、18S 条带,条带清晰无拖尾,且 28S 灰度值:18S 灰度值 > 1:1,接近 2:1,说明所

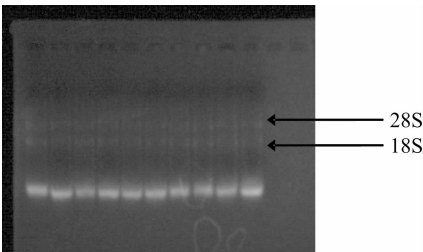


图1 黄颡鱼肝组织总 RNA 电泳结果

提 RNA 的完整性好。

2.2 不同保存温度对 RNA 质量的影响

将不同温度下保存的 RNA 样品通过琼脂糖凝胶电泳进行完整性检测,电泳结果显示:储存在 -70 $^{\circ}$ C 且未放入消毒袋中保存的 RNA,8 个月后,RNA 样品具有清晰的 18S、28S 条带,且 28S 灰度值:18S 灰度值 > 1:1,说明 RNA 的完整性良好,降解程度低(图 2 - A)。储存于 -20 $^{\circ}$ C 且未放置于消毒袋中的 RNA,即直接与周围环境接触,4 个月后,RNA 样品具有较为清晰的 18S、28S 条带,且 28S 灰度值:18S 灰度值 > 1:1,证明 RNA 较完整(图 2 - B)。保存于 4 $^{\circ}$ C 下的 RNA 样品如果直接与空气接触,储存 5 h 后,RNA 18S、28S 条带几乎完全消失;如果保存于消毒袋中,14 d 后,从图 2 - C 中可以看到 18S、28S 条带,证明 RNA 完整性较好。10 $^{\circ}$ C 下储存的 RNA 样品,如果没有放于消毒袋中,1 h 后条带几乎全部降解;如果储存于消毒袋中,经过 1、2、3、4、5 h 的保存,条带没有发生明显变化,储存 1 d 的 RNA 样品具有清晰的 18S、28S 条带且 28S 灰度值:18S 灰度值 > 1:1,储存 3 d 的 18S、28S 条带灰度值的比值减小,即已部分发生降解,当储存 5 d 时,条带变得非常模糊,说明 RNA 大部分已经降解(图 3)。在 20、30、40 $^{\circ}$ C 温度条件下,RNA 如果暴露于空气之中,储存 1 h 后,几乎不能观察到条带,如果保存于消毒袋中,20 $^{\circ}$ C 保存的 RNA 在经历 1、2、3、4、5 h 后,条带没有发生变化,仍具有清晰的 18S、28S 条带,保存 1、3 d 后,条带仍较为清晰,保存 4 d 后,RNA 条带开始模糊,即开始发生降解(图 4)。30 $^{\circ}$ C 下保存的 RNA 在经过 1、2、3、4、5 h 时,条带没有发生明显变化,保存 1 d 后条带较为清晰,保存 2.5 d 时条带开始模糊,保存 3 d 时,18S、28S 条带全部消失(图 5)。在 40 $^{\circ}$ C 条件下,RNA 在保存 1 d 时,条带亮度明显低于其他温度下保存的 RNA 样品;保存 2 d 后,18S、28S 条带全部消失(图 6)。

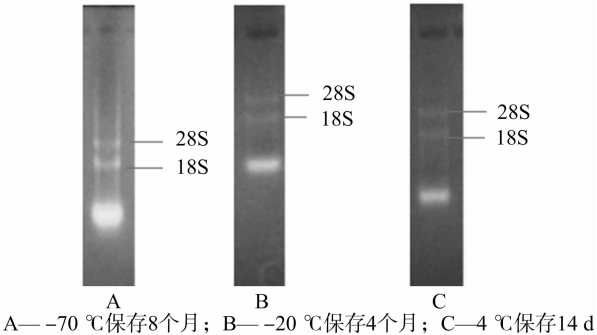


图2 黄颡鱼肝组织总 RNA 低温保存效果

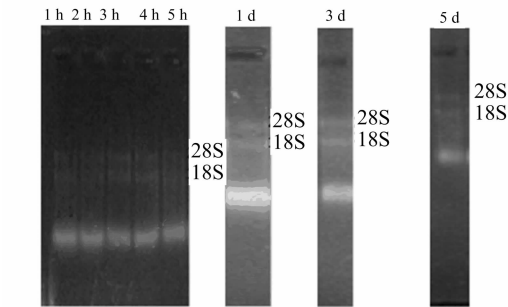


图3 10 $^{\circ}$ C 条件下不同保存时间的黄颡鱼肝组织总 RNA

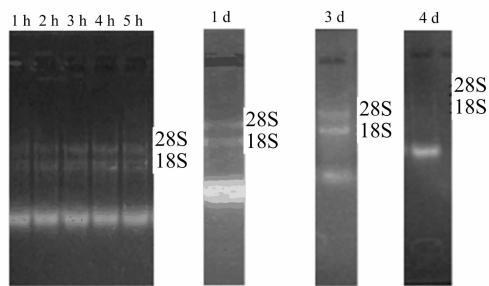


图4 20 °C 条件下不同保存时间的黄颡鱼肝组织总 RNA

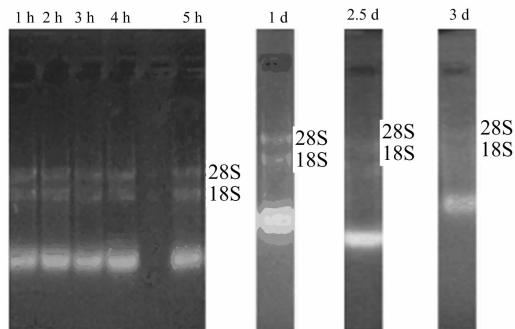


图5 30 °C 条件下不同保存时间的黄颡鱼肝组织总 RNA

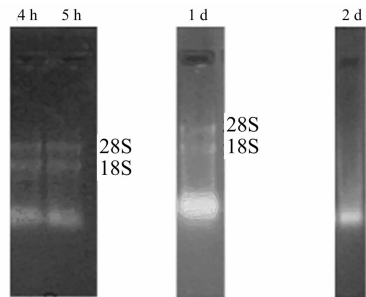


图6 40 °C 条件下不同保存时间的黄颡鱼肝组织总 RNA

3 讨论

3.1 RNA 质量的评价标准

RNA 的浓度、纯度、完整性是评价 RNA 质量的主要标准^[5]。此外,通过比较 RT-PCR 产物也可以对 RNA 的质量进行评价,分子杂交放射自显影检测也可以对 RNA 质量进行评价^[6],实时定量 PCR 法也是 RNA 质量检测的方法之一。可通过核酸蛋白测定仪检测 RNA 质量浓度及 RNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值以确定 RNA 样品的纯度^[7],如果 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值在 1.8~2.0 之间则说明 RNA 的纯度较高;采用 RT-PCR 法检验 RNA 的质量,因多糖等杂质的污染会在很大程度上抑制 RNA 的逆转录,当 RNA 不纯时,就会导致 RNA 逆转录的失败,如果 RNA 的完整性不高,即使有微量的降解也会使 mRNA 逆转录的 cDNA 长度大大减小,导致 RT-PCR 的失败^[8]。RNA 完整性的测定可通过琼脂糖凝胶电泳的方法,通过在凝胶成像分析仪下进行分析来完成对 RNA 完整性的分析鉴定,若 RNA 具有清晰的 18S、28S 条带,且条带均一无拖尾现象^[9]、28S 灰度值:18S 灰度值 $>1:1$,提示无明显降解^[10],说明 RNA 完整性好。本试验采用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性的方法来评价 RNA 的质量,如果电泳结果显

示 RNA 样品具有 18S、28S 条带,且条带清晰无拖尾,此外 28S 灰度值:18S 灰度值 $>1:1$,则说明 RNA 的完整性好,即降解少。本试验所采取的琼脂糖凝胶电泳来检测 RNA 质量的方法基本上可以实现对 RNA 完整性的分析,但是由于试验过程中专门用于拍摄电泳图片的相机出现故障,为了记录试验结果,采取普通相机拍摄的方法,最终导致试验结果所显示的图片颜色不一致,出现一定的色差。

3.2 影响 RNA 质量的因素

影响 RNA 质量的最大因素是 RNA 本身的单链结构,导致其很容易被降解,另外 RNA 酶分布广泛,难以灭活,从而极易导致 RNA 的降解。所以在试验过程中提高 RNA 质量最重要的措施就是避免 RNA 酶的污染^[11-12]。本试验显示,温度也是影响 RNA 质量的 1 个关键因素,不同温度下储存 RNA 的时间相同,温度越低,RNA 的质量变化越缓慢。相同温度下 RNA 储存不同时间,时间越长,RNA 的完整性也越低,即随着时间的增长,RNA 也在逐步被降解。

3.3 对分子生物学试验者的建议

由本研究初步得出结论:储存 RNA 时,最重要的是选择能够降低 RNA 酶活性或者除去 RNA 酶的手段,如果对 RNA 需要进行长时间的储存,应选择 -20、-70 °C 的温度进行保存,如果保存 RNA 在 1 周以内,且能够保证 RNA 得到良好的密封时,可以选择于 4 °C 进行保存。

参考文献:

- [1] 李 萍,熊 凡,富 青,等. 一种简便的 RNA 完整性检测方法[J]. 湖北中医学院学报,2005,7(3):39-40.
- [2] 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[J]. 化学研究,2012,23(5):93-96.
- [3] 李冬民,任吴超,王 璇,等. 利用 TRIzol 试剂和液氮提取大鼠胰腺高质量总 RNA[J]. 西安交通大学学报:医学版,2009,30(5):639-642.
- [4] 梁婧娴,陈志成,贺庆华,等. 检测总 RNA 质量的两种方法比较研究[J]. 西南民族大学学报:自然科学版,2012,38(1):69-72.
- [5] 史红鸽,戚元成,申进文. 一种从平菇菌丝中提取总 RNA 的方法[J]. 江西农业学报,2014(8):68-70.
- [6] 洪 敏,周晓萍,刘剑凯. 冷酚法提取 RNA 及质量鉴定[J]. 吉林大学学报:医学版,1992,18(2):105-107.
- [7] 张 杰,武晶晶,赵飞飞,等. 不同温度和不同放置时间对总 RNA 提取浓度和纯度的影响[J]. 实验技术与管理,2013(11):79-82,86.
- [8] 江 莎,孟 凡,周振雷,等. 荧光 Real-time PCR 鉴定鸡胸骨总 RNA 质量[J]. 生物学杂志,2012,29(5):92-95.
- [9] 徐 航,刘仁祥,徐如宏,等. 烟草 RNA 提取方法的优化及冰盒储存时间的探讨[J]. 江西农业大学学报,2014(3):495-500.
- [10] 路俊峰,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[J]. 中国临床神经科学,2010,18(2):199-202.
- [11] 吴旭东,侯玉霞,张文吉. 黄河鲇不同组织中 RNA 提取纯化方法研究[J]. 淡水渔业,2006,36(2):24-26.
- [12] 杨 佳,吴诗杰,王淑萍,等. 发菜总 RNA 提取方法的比较与优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):58-60.