

海洋无脊椎动物组织总 RNA 提取方法的探讨

冯政夫, 王 琳, 李文侠, 部 凡, 胡彦江, 朱 伟

(青岛农业大学 生命科学学院, 山东 青岛 266109)

摘要: RNA 提取是分子生物学研究的基础实验, 由于海洋无脊椎动物组织结构以及体成分的特殊性, 导致现有的 RNA 提取方法不能完全胜任此工作。作者以刺参(*Apostichopus japonicus*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)为研究对象, 对异硫氰酸胍 RNA 提取方法进行了改进。栉孔扇贝和凡纳滨对虾的肝胰腺富含 RNase, 刺参体壁结构致密、富含胶原蛋白, 而成熟期精巢富含多糖, 因此在这些动物组织中提取 RNA 时, 在原有方法基础上增加了瞬时匀浆、增加氯仿及酸性酚的抽提次数, 或添加高盐溶液等方法。实验结果显示, 改进方法后获得的 RNA 具有完整的 28S、18S 和 5S rRNA 条带, $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 和 $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ 比值分别为 1.89~2.0 和 1.98~2.11, β -actin 基因扩增条带清晰, 所获得的组织 RNA 的纯度和质量符合 cDNA 合成和基因功能研究的要求。

关键词: 无脊椎动物; RNA 提取; 刺参(*Apostichopus japonicus*); 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*); 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)

中图分类号: S488 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2014)11-0024-05

doi: 10.11759/hyxx20140427001

RNA 是生命活动中基因表达过程的生物大分子, 它的分离在分子生物学中占有重要的地位。纯净、稳定、完整的 RNA 对于分子克隆和基因表达分析实验是非常重要的, 而 mRNA 是分子克隆、RT-PCR、构建 cDNA 文库、基因表达等实验的物质基础^[1-2]。

海洋无脊椎动物门数、种类繁多, 而刺参(*Apostichopus japonicus*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是我国的重要养殖动物, 随着其养殖规模的增加, 养殖过程中的病害及营养失衡等问题日益严重。从分子水平研究其营养调控及病害防治是新兴的最为有效的方法之一, 而 RNA 又是基因表达与分析实验的关键物质之一。由于其生存环境的不同, 造成不同动物组织的成分和结构的明显差异(栉孔扇贝和对虾的肝胰腺内源 RNase 活性高, 对虾眼柄色素含量较高, 而刺参体壁和成熟期精巢分别富含胶原蛋白和多糖等物质), 给水生动物组织总 RNA 的提取带来一定难度^[3-5]。

目前使用较多的 RNA 提取方法, 如苯酚法、胍盐法(异硫氰酸胍法和 Trizol 试剂盒), 对提取海洋无脊椎动物肝胰腺、刺参体壁等组织总 RNA, 存在内源 RNase 活性抑制不彻底, 组织内多糖、胶原蛋白和色素等物质的残留等问题, 这样的 RNA 不能精确反映基因表达信息, 给后续实验分析带来许多不确定性^[6-8]。

作者以山东半岛主要养殖动物刺参、栉孔扇贝、凡纳滨对虾为研究对象, 根据组织富含的物质成分不同, 在异硫氰酸胍 RNA 提取方法的基础上进行改进, 以其获得高质量刺参体壁、精巢、栉孔扇贝肝胰腺的总 RNA, 为大量提取海洋无脊椎动物组织总 RNA 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

刺参取自青岛市田横养殖场, 栉孔扇贝和凡纳滨对虾取自青岛市城阳区水产品批发市场。实验动物从养殖场取回或市场购回后, 暂养在 160 L 的圆形育苗桶中, 充气, 停止喂食 2 d。取样前将刺参等动物用灭菌的蒸馏水冲洗干净, 在冰上迅速解剖获取各组织, 并将组织剪成约 30 mg 的小块置于液氮中迅速冻实, 存放于 -80℃ 冰箱中, 用于组织总 RNA 提取。

RNA 提取所用的 Tris、醋酸钠、氯仿、过氧化

收稿日期: 2014-01-28; 修回日期: 2014-05-22

资助项目: 国家自然科学基金项目(31272678), 山东省现代农业产业技术体系项目(SDAIT-15-011-10), 青岛农业大学实验技术研究项目(SYJK 12-14)

第一作者简介: 冯政夫(1965-), 女, 博士, 专业方向为细胞生物学; 朱伟, 通信作者, E-mail: zhuw001@163.com

氢、异丙醇、酸性酚、醋酸等试剂购自上海生工生物工程有限公司；反转录 M-MLV 试剂盒, PCR 反应的 r-Taq 酶, dNTP 等购自大连宝生物公司；基因引物由上海生工生物工程有限公司合成。

实验中使用的药勺、枪头、EP 管等塑料制品, 在 1% 焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水中浸泡 24 h 或 3% H_2O_2 中浸泡 3 h 后高温灭菌, 而金属用具、研钵和玻璃器皿 180℃ 烘烤 6 h, 确保 RNA 提取中所有器具均无 RNase 污染。

1.2 实验方法

1.2.1 筛选去除塑料制品 RNase 方法

实验设计 3 个处理, 以 1% DEPC 水处理组为对照。

(1) 枪头和 EP 管等塑料制品在 3% H_2O_2 中浸泡 3 h 后, 用经过 2 次灭菌的双蒸水冲洗干净, 121℃ 灭菌 35 min, 烘干, 备用。

(2) 枪头和 EP 管等塑料制品在 0.5% SDS (十二烷基硫酸钠) 浸泡 3 h 后, 用经过 2 次灭菌的双蒸水冲洗干净, 121℃ 灭菌 35 min, 烘干, 备用。

(3) 枪头和 EP 管等塑料制品用 30% 氯仿浸泡 3 h 后, 用经过 2 次灭菌的双蒸水冲洗干净, 121℃ 灭菌 35 min, 烘干, 备用。

1.2.2 异硫氰酸胍 RNA 提取方法的优化

在异硫氰酸胍提取方法的基础上进行优化^[9-10]。

(1) 解离核酸蛋白复合物

裂解液包含 3 mL 溶液 D(4 mmol/L 异硫氰酸胍, 0.17 mmol/L 月桂酰肌氨基酸钠, 0.025 mmol/L 柠檬酸钠)、500 μ L $CHCl_3$ 和 15 μ L β -巯基乙醇, 混合均匀后置冰上预冷 5 min。裂解液中加入新鲜的或 -80℃ 冰箱保存的动物组织约 100 mg, 轻微振荡后进行电动匀浆处理(FSH-II 电动匀浆器), 冰上放置 5~10 min。

对于质地致密的刺参体壁, 采用瞬时多次的匀浆方法, 确保组织细胞的彻底裂解以及 RNA 与蛋白的解离。每次匀浆时间为 5~8 s, 冰上放置时间为 2~3 min, 确保 RNase 的释放与活性的抑制。匀浆结束后冰上放置 5~10 min, 进一步裂解细胞并彻底抑制 RNase 活性。

对于富含 RNase 的栉孔扇贝肝胰腺组织, 从 -80℃ 冰箱取出后立即放入无 RNase 污染的、预冷的裂解液中, 并适当增加裂解液用量(每 20 mg 组织加 1 mL 溶液 D), 并采取匀浆 3~5 s, 冰上放置 2~3 min

的组织匀浆方式, 确保组织细胞的破碎与 RNase 活性的抑制同步进行。

(2) 去除大分子和不溶性物质

去除蛋白质和多糖。对于富含多糖的刺参成熟期精巢, 在第 2 次取上清加入氯仿时, 还需加氯化钠 (5 mol/L) 使其终浓度为 0.8 mol/L, 形成高离子强度溶液, 再加入 10% 的十六烷基三甲基溴化铵溶液 (w/v, 终浓度 2%), 使其与多聚糖形成复合物沉淀下来, 通过离心去除动物组织中的多糖。

去除基因组 DNA。在第 3 次上清液中分别加 0.5 倍上清体积的 $CHCl_3$ 和酸性酚, 剧烈震荡后于 4℃、12 000 r/min, 离心 10 min。离心后管内液体分成三层, RNA 在上清里, 基因组 DNA 在下层。拿取离心管时要轻拿轻放, 不能引起管内物质的震荡, 吸取上清时用小枪头进行少量多次的吸取方式, 每次取样决不能引起中间层的搅动。

(3) 沉淀 RNA

取上清, 加入异丙醇和 3 mol/L NaAc (pH 5.2) (上清: 异丙醇: NaAc = 10: 10: 1), 轻轻颠倒混匀, -20℃ 冰箱中静置 2 h, 于 13 000 r/min, 4℃ 离心 30 min。

(4) 纯化 RNA

去除残留的 RNase 和蛋白质。弃上清, 各管沉淀加入 200 μ L 溶液 D 振荡重悬, 冰上放置 5 min。依次加入 100 μ L 氯仿和 100 μ L 酸性酚(溶液 D: 氯仿: 酸性酚=体积比 2: 1: 1)混匀, 13 000 r/min, 4℃ 离心 30 min。如有蛋白层出现, 继续进行酸性酚与氯仿的抽提, 直至无中间蛋白层为止。

去除多糖。收集管中的沉淀, 加入 1 mL 75% 乙醇, 0.5 mL (5 mol/L) NaCl, 轻弹 EP 管底部使沉淀悬浮, 12 000 r/min, 4℃ 离心 5 min。吸出乙醇, 沉淀干燥数分钟, 确认管中没有乙醇后, 加入 40 μ L 无 RNase 的去离子水溶解沉淀。

去除基因组 DNA。向 RNA 溶液中加入 5 μ L $10 \times$ DNase I buffer、2 μ L DNase I (10U)、0.5 μ L RNasin(40U)和无 RNase 的去离子水补足至 100 μ L, 混匀后 37℃ 孵育 40~50 min。孵育结束后, 加入 50 μ L 酸性酚和 50 μ L $CHCl_3$, 剧烈振荡后 13 000 r/min, 4℃ 离心 10 min。

沉淀 RNA。取上清加入异丙醇和 3 mol/L NaAc (pH 5.2)(上清: 异丙醇: NaAc=10: 10: 1), -20℃ 条件下沉淀 1 h 后, 于 13 000 r/min, 4℃ 离心 30 min 收集沉淀。

为了进一步去除沉淀中残留的色素、多糖、胶

原蛋白和试剂,用冷藏的、含 0.1 mol/L 醋酸钠的 70%乙醇洗涤 1~2 次,并保证每次将核酸沉淀悬浮起来,才能保证残留的色素等物质被洗去,然后 10 000 r/min, 4℃ 离心 15 min, 去除残留的乙醇,在超净台中干燥 5~10 min 直至乙醇彻底挥发,然后用 10~20 μ L 无 RNase 的去离子水溶解沉淀。质量合格的 RNA 保存于-80℃备用。

1.2.3 RNA 质量检测

获得的总 RNA 于 70℃保温 15 min 后, 0.1 μ L RNA 溶于含溴酚蓝的 3 μ L TE 缓冲液中,用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样品的完整性及有无 DNA 残留等。如果 RNA 的电泳图出现明显的 3 条 rRNA 带(28S, 18S 和 5S), 且无基因组 DNA、蛋白等污染, 则取 1 μ L 总 RNA 溶于 19 μ L 无 RNase 去离子水中, 混匀后用核酸蛋白测定仪测定 A_{280nm} 、 A_{260nm} 和 A_{230nm} 相对吸收值, 以确定样品浓度及纯度。

检测合格的 RNA 经 M-MLV 反转录试剂盒合成第一链 cDNA, 利用 PCR 技术扩增刺参、凡纳滨对虾和栉孔扇贝的 β -actin 基因, 进一步检测提取的 RNA 质量。 β -actin 基因引物序列见表 1。

表 1 β -actin 基因引物序列

Tab.1 Primer of β -actin gene

动物名称	引物序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
刺参	F1: AAGGTTATGCTCTTCTCACGCT	137
	R1: GATGTCACGGACGATTTTCACG	
凡纳滨对虾	F2: AGTAGCCGCCCTGGTTGTAGAC	242
	R2: TTCTCCATGTCGTCCCACT	
栉孔扇贝	F3: GCTGGTGATGGTGTTCACA	634
	R3: GCCAGACTCGTCGTATTCCT	

2 结果

2.1 去除 RNase 方法的比较

2.1.1 去除外源 RNase 方法的比较

琼脂糖凝胶电泳结果显示, 3% H_2O_2 和 0.5% SDS 浸泡枪头等塑料用具处理组能完全去除枪头、EP 管等塑料用品上 RNase, 其所提取 RNA 有清晰的 28S、18S 和 5S rRNA 条带, 其中 3% H_2O_2 处理组与 DEPC 对照组没有明显差异(图 1A)。核酸蛋白测定仪测得 RNA 的 A_{260nm}/A_{280nm} 和 A_{260nm}/A_{230nm} 比值分别为 1.96~2.02 和 1.65~1.97, 其中 SDS 和氯仿处理组的 A_{260nm}/A_{230nm} 比值分别为 1.65 和 1.72, 有明显的盐残留和 RNA 降解, 且 SDS 和氯仿具有易形成泡沫,

造成枪头堵塞和冲洗难度大的弊端。凡纳滨对虾 β -actin 基因 PCR 产物凝胶电泳显示, 3% H_2O_2 和 0.5% SDS 处理组都有明显的目的条带(242bp), 与对照组没有明显差异(图 1B)。

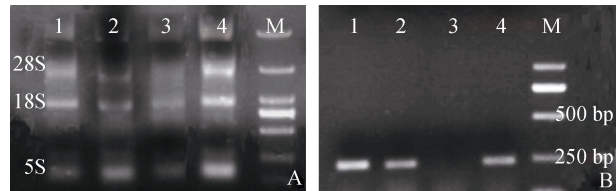


图 1 不同去除外源 RNase 方法提取的 RNA 和 β -actin PCR 产物凝胶电泳

Fig.1 Electrophoresis profiles of total RNA from different methods to eliminate extrinsic RNase and amplification band of β -actin PCR

A. 凡纳滨对虾肌肉组织 RNA 电泳图; B. 凡纳滨对虾肌肉组织 β -actin 基因扩增图

1. 3% H_2O_2 浸泡 3 h; 2. 0.5% SDS 浸泡 3 h; 3. 30% $CHCl_3$ 浸泡 3 h; 4. 1% DEPC 浸泡 12 h(对照); M. DL2000 marker

A. Electrophoresis profiles of total RNA from muscle of *Litopenaeus vannamei*; B. Amplification band of β -actin PCR from muscle of *Litopenaeus vannamei*

1. plastic inundated by 3% H_2O_2 for 3 hours; 2. plastic inundated by 0.5% SDS for 3 hours; 3. plastic inundated by 30% $CHCl_3$ for 3 hours; 4. plastic inundated by 1% DEPC for 12 hours (control); M. DL2000 marker

2.1.2 去除内源 RNase 方法的比较

栉孔扇贝肝胰腺 RNA 的提取, 采用增加溶液 D 用量(组织: 溶液 D=20 mg: 1mL), 瞬时多次匀浆和在第 1 次上清液中加入溶液 D 的方法, 获得了较高质量的 RNA (图 2)。3 种处理方法提取的肝胰腺 RNA 均有明显的 28S 和 18S 条带(图 2A), 只有加 50 μ L 溶液 D 提取组的 28S 比 18S 亮。加溶液 D 处理组的 A_{260nm}/A_{280nm} 分别为 2.0 和 2.08, A_{260nm}/A_{230nm} 比值分别为 1.98 和 2.45, 其中加入 100 μ L 溶液 D 处理组的 A_{260nm}/A_{230nm} 比值为 2.45, 有明显的盐等物质残留(图 2A)。栉孔扇贝 β -actin 基因 PCR 产物凝胶电泳显示, 加溶液 D 的 2 种处理组均有目的基因条带(634bp), 但加 50 μ L 溶液 D 处理组好于加 100 μ L 溶液 D 处理组(图 2B)。

2.2 不同方法获取 RNA 质量分析

2.2.1 去除刺参体壁的胶原蛋白

在刺参体壁 RNA 提取中采用缩短组织匀浆时间, 增加匀浆次数、增加氯仿和酸性酚的抽提次数, 可获得高质量的刺参体壁 RNA。增加氯仿和酸性酚抽提次数的刺参体壁 RNA 具有明显的 3 条 rRNA 条带(图 3A), 其 A_{260nm}/A_{280nm} 和 A_{260nm}/A_{230nm} 分别为 1.92 和

2.03, 以其作为刺参 β -actin 基因扩增的 cDNA 模板, 获得了较好的目的条带(137bp, 图 3B)。

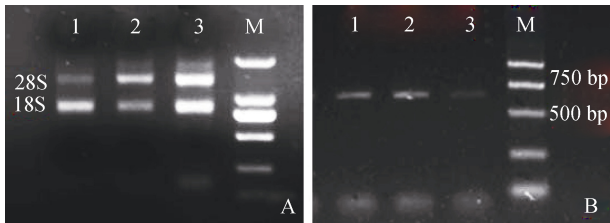


图 2 不同抑制内源 RNase 方法提取的 RNA 和 β -actin RT-PCR 产物凝胶电泳

Fig.2 Electrophoresis profiles of total RNA from different methods to eliminate endogenous RNase and amplification band of β -actin PCR

A. 栉孔扇贝肝胰腺 RNA 电泳图; B. 栉孔扇贝肝胰腺 β -actin 基因扩增图

1.第 1 次上清液中不加溶液 D(对照); 2.第 1 次上清液中加溶液 D 50 μ L; 3.第 1 次上清液中加溶液 D 100 μ L; M. DL2000 marker

A. Electrophoresis profiles of total RNA from hepatopancreas of *Chlamys farreri*, B. Amplification band of β -actin PCR from hepatopancreas of *Chlamys farreri*

1. first supernatant without solution D (control); 2. first supernatant with 50 μ L solution D; 3. first supernatant with 100 μ L solution D; M. DL2000 marker

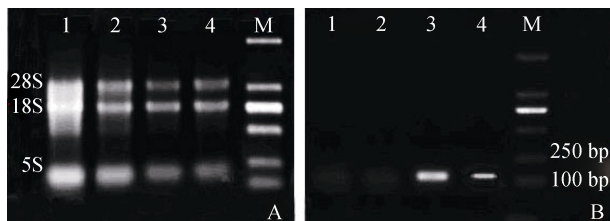


图 3 不同处理方法获取 RNA 质量比较

Fig.3 Comparison of RNA quality from different extraction methods

A. RNA 电泳图 B.刺参 β -actin 基因扩增图

1.刺参体壁不增加氯仿和酸性酚抽提次数(对照); 2.刺参成熟期精巢不加高盐溶液 (对照); 3.刺参体壁增加氯仿和酸性酚抽提次数; 4.刺参成熟期精巢加高盐溶液; M. DL2000 marker

A. Electrophoresis profiles of total RNA, B. Amplification band of β -actin PCR

1. no repeat phenol and chloroform extraction in the body wall of sea cucumber two more times (control); 2. no high concentrated solution of NaCl used in the RNA extraction of testis for sea cucumber (control); 3. repeat phenol and chloroform extraction two more times in the body wall of sea cucumber; 4. high concentrated solution of NaCl used in the RNA extraction of testis for sea cucumber; M. DL2000 marker

2.2.2 去除刺参精巢中多糖

刺参成熟期精巢富含多糖, 采用匀浆后第 2 次取上清时加入高盐溶液, 可获的较好的刺参成熟期精巢总 RNA(图 3A)。增加高盐溶液处理组的总 RNA 有清晰的 3 条 rRNA 带, 条带之间有弥散, 其 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 和 $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ 分别为 1.89 和 2.11, 其 β -actin 基因

扩增条带较清楚, 说明该方法所提取的刺参成熟期精巢总 RNA 的质量完整, 无降解, 无拖尾, 适用于富含多糖动物组织总 RNA 提取(图 3B)。

3 讨论

在水生无脊椎动物组织总 RNA 提取中普遍存在的问题是 RNA 降解, 多糖、胶原蛋白和色素等大分子物质的残留^[5-6]。

RNase 广泛存在于自然环境中, 无论内源还是外源的, 均会造成 RNA 降解, 导致 RNA 质量下降, 不能反映目的基因的真实表达情况^[11]。外源 RNase 主要来自于枪头、EP 管等 RNA 提取用具, 虽然 1% DEPC 去除外源 RNase 的传统方法效果很好, 但是 DEPC 具有致癌和污染环境等不利因素。李银聚等尝试用氯仿去除塑料用具上的外源 RNase, 但提取的 RNA 只能用于大规模的实验教学使用, 与本文的氯仿处理组实验结果相似^[11]。3% H_2O_2 能彻底抑制外源 RNase, 且具有操作方便、处理时间短、安全及成本低廉等优点, 是 DEPC 的很好替代品。内源 RNase 的抑制是 RNA 提取成功的关键, 动物肝胰腺组织 RNase 含量高, 传统的 RNA 提取方法无法及时抑制其活性, 较难获得完整的 RNA^[12]。张传仓等^[6]在液氮中研磨富含 RNase 的动物组织, 目的是让组织细胞快速解离并迅速抑制 RNase 活性, 与本文瞬时匀浆法的目的之一致。异硫氰酸胍是有效的 RNase 抑制剂, 本实验采用增加溶液 D (含 4mmol/L 异硫氰酸胍) 的用量、瞬时多次匀浆、第 1 次上清液中增加少量溶液 D 的方法, 使栉孔扇贝肝胰腺组织细胞的裂解, RNase 的释放与 RNase 活性的抑制同步进行, 保证 RNA 的完整性。溶液 D 的适量添加(上清液: 溶液 D=12: 1)可抑制 RNase 活性, 超量易造成试剂残留进而抑制 RNA 的反转录, 掩盖了基因的实际表达情况(图 2A)。

动物组织成分的残留是影响 RNA 质量的又一关键问题。刺参体壁有较厚的结缔组织层, 组织匀浆难度大, 且富含粘多糖、胶原蛋白和色素, RNA 提取中往往造成 RNA 浓度较低和组织成分残留^[3-4]。吉成龙等^[4]用 3 种 RNA 提取方法均没有获得高质量的 RNA, 管家基因检测几乎观察不到条带, 主要原因是组织成分残留抑制了 RNA 的反转录, 与本文的对照实验结果一致(图 3)。郑珂等^[3]在刺参体壁 RNA 提取中增加了氯仿与酸性酚混合液的抽提, 获得了较完整的刺参体壁 RNA, 与本文的实验方法和结果相

似。基于刺参体壁组织结构和所含成分的特殊性,本文采用缩短每次匀浆时间,增加匀浆次数,确保组织细胞彻底裂解和核酸蛋白复合物的解离,为了彻底去除刺参体壁 RNA 中胶原蛋白、色素残留,在上清液抽提中增加氯仿、氯仿和酸性酚的抽提次数,获得高质量的 RNA。此外,刺参成熟期精巢富含多糖,在第 2 次上清液中加入高盐溶液和十六烷基三甲基溴化铵,使其与多糖形成复合体沉淀下来,通过离心法去除,也获得了较高纯度和浓度的 RNA。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 吴旭东, 侯玉霞, 张文吉. 黄河鲶不同组织中 RNA 提取纯化方法研究[J]. 淡水渔业, 2006, 2: 24-26.
- [3] 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.
- [4] 吉成龙, 孙国华, 杨建敏, 等. 刺参组织总 RNA 提取的研究[J]. 水产养殖, 2010, 31(1): 25-28.
- [5] 王宁, 傅洪拓, 乔慧, 等. 青虾眼柄组织总 RNA 提取方法的比较和分析[J]. 中国农学通报, 2011, 27(03): 378-382.
- [6] 张传仓, 刘卫鹏, 朱德新, 等. 富含 RNA 酶组织总 RNA 提取方法的改良[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(6): 797-799.
- [7] 李高赵, 朱静. 一种改进的牛蛙性腺组织总 RNA 提取方法[J]. 湖南农机, 2010, 37(1): 78-80.
- [8] 于艳, 管群, 张斌, 等. 人类精子高质量提取方案的优化[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(21): 3589-3593.
- [9] Joseph S, David W R. Molecular Cloning: A Laboratory Manual(3rd)[M]. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] Chan C X, Teo S S, Ho C L, et al. Optimisation of RNA extraction from *Gracilaria changii*[J]. Journal of Applied Phycology, 2004, 16: 297-301.
- [11] 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.
- [12] 喻晓丹. 猪肝脏总 RNA 快速提取方法[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(3): 621-623.

Extraction of total RNA from marine invertebrate tissue

FENG Zheng-fu, WANG Lin, LI Wen-xia, BU Fan, HU Yan-jiang, ZHU Wei

(College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Received: Jan., 28, 2014

Key words: marine invertebrate; RNA extraction; *Apostichopus japonicus*; *Chlamys farreri*; *Litopenaeus vannamei*

Abstract: RNA extraction is the basic experiment of the molecular biology study. The particularity of marine invertebrate in tissue structure and component results in some disadvantage to obtaining pure RNA using general RNA extraction methods. In this study, sea cucumber, *Apostichopus japonicus*, scallop, *Chlamys farreri* and the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* were used as the experimental materials. The method was modified from the method of Guandine Throcyanoate Reagent. Hepatopancreas of scallop and white shrimp were rich in endogenous RNase. The sea cucumber body wall was compact and rich in collagen and its testis was rich in polysaccharides. During the process of RNA extraction from these tissues, extraction time of chloroform and phenol-chloroform was increased, and brief homogenate and high concentrated solution of NaCl were used. The results show that A_{260nm}/A_{280nm} and A_{260nm}/A_{230nm} ratio of RNA were 1.89~2.0 and 1.98~2.11, respectively. The bands of 28S, 18S and 5S were integrity, and the amplified band of β -actin gene was clear. The data demonstrate that the RNA obtained was suitable for cDNA synthesis and future functional genomic studies.

(本文编辑: 梁德海)