



一种适合蚊虫总 RNA 提取及样本保存的方法*

黄文雨** 卢莹 尹灿灿 马高风 刘啸 邵黄芳 李梦楠 孙恩涛***

(皖南医学院检验学院, 芜湖 241002)

摘要 【目的】建立适合蚊虫总 RNA 提取的方法, 探讨 4 种不同保存样本方法对蚊虫总 RNA 提取的影响。【方法】以室温、4 °C 冰箱、-20 °C 冰箱、-80 °C 冰箱 4 种不同方法保存蚊虫为研究对象, 运用改良 SDS 法、传统 SDS 法和 TRIzol 法分别提取蚊虫总 RNA, 用紫外分光光度计、琼脂糖凝胶电泳和 RT-PCR 检测提取 RNA 的质量, 并比较提取效果。【结果】改良 SDS 法、传统 SDS 法和 TRIzol 法提取蚊虫总 RNA 的浓度值分别为 $1.223\ 3 \pm 0.374\ 3$ 、 $0.675\ 0 \pm 0.319\ 8$ 、 $0.310\ 0 \pm 0.123\ 6$, 3 种方法的浓度值差异具有统计学意义 ($F=14.767$, $P<0.001$)。经 LSD 检验, 改良 SDS 法提取蚊虫总 RNA 的浓度高于传统 SDS 法、TRIzol 法 ($P=0.005$, $P<0.001$) ;改良 SDS 法提取的蚊虫总 RNA 纯度较高, A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 分别在 1.8-2.0 及 2.0-2.2 之间; 电泳检测结果表明 28 s、18 s 及 5.8 s 条带清晰完整, 条带之间无弥散, 且无苯酚、蛋白质和 gDNA 污染; β -actin 扩增显示符合 RT-PCR 的实验要求。在一个月, -20 °C、-80 °C 冰箱保存的蚊虫样本, 其总 RNA 的提取未见明显降解。【结论】改良 SDS 法是一种经济便利、可提取高质量蚊虫 RNA 的方法。-20 °C、-80 °C 冰箱在一个月对蚊虫样本具有较好的保存效果。

关键词 蚊虫; SDS 法; 改良 SDS 法; RNA 提取; 样本保存

A suitable method for isolating total RNA and preserving samples from mosquitoes

HUANG Wen-Yu** LU Ying YIN Can-Can MA Gao-Feng LIU Xiao
SHAO Huang-Fang LI Meng-Nan SUN En-Tao***

(School of Laboratory Medicine, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China)

Abstract [Objectives] To determine the best methods for isolating and preserving the total RNA of mosquitoes. [Methods] The ability of three methods to isolate total RNA from mosquitoes; the modified SDS, traditional SDS and TRIzol reagent methods, were compared. The quality of total RNA obtained was evaluated with ultraviolet spectrophotometry, agarose gel electrophoresis and RT-PCR assay. In addition, mosquito RNA samples isolated by the modified SDS method were preserved under four different conditions; room-temperature, 4 °C, -20 °C and -80 °C, and the quality of the RNA preserved under each condition compared. [Results] The average concentration values of total RNA isolated by the modified SDS method, traditional SDS method and TRIzol reagent method were $1.223\ 3 \pm 0.374\ 3$, $0.675\ 0 \pm 0.319\ 8$ and $0.310\ 0 \pm 0.123\ 6$, respectively. Analysis of variance indicates that there was a significant difference among these three methods ($F=14.767$, $P<0.001$). LSD test results suggest that the modified SDS method achieved higher concentration values of total RNA than the other two methods ($P=0.005$, $P<0.001$). The average spectrophotometric values of total RNA isolated by the modified SDS method were in the ranges 1.8-2.0 (A_{260}/A_{280}) and 2.0-2.2 (A_{260}/A_{230}). The agarose gel bands of the 28S rRNA, 18S rRNA and 5S rRNA were clear, indicating a high quality of RNA devoid of polyphenols, protein and gDNA contamination. The RNA β -actin

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31870352); 安徽省大学生创新创业项目 (201710368067); 皖南医学院大学生科研基金项目 (WK2018S49、WK2018S47)

**第一作者 First author, E-mail: 970225759@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: asdentao@126.com

收稿日期 Received: 2019-03-22; 接受日期 Accepted: 2019-04-25

gene could be amplified by RT-PCR assay. There was no significant degradation of total RNA samples that had been frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ after one month. [Conclusion] Our data provide strong evidence that the modified SDS method is a cost-effective and convenient way to isolate high quality mosquito RNA. Freezing mosquito RNA samples at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ can preserve their quality for up to a month.

Key words mosquitoes; SDS method; modified SDS method; RNA isolation; samples preservation

蚊虫是虫媒病的主要传播媒介(周钦贤, 2003; 张菊仙和龚正达; 2008)。高质量 RNA 提取是研究蚊虫与虫媒病相互关系的关键步骤(崔峰和乔传令, 2007; 周艳河等, 2011; 李辞修等, 2015; O'Brien *et al.*, 2015)。目前, 对于蚊虫总 RNA 的提取方法有 TRIzol 法、SDS 法、CTAB 法、试剂盒法等。研究表明, 不同样本材料往往采用不同的提取方法(Ridgeway and Timm, 2014; 黄学文等, 2018)。本研究拟对改良 SDS 法、传统 SDS 法及 TRIzol 法提取蚊虫总 RNA 的质量进行评价, 以期掌握一种更好、更经济、适合蚊虫总 RNA 提取的方法。

耿艺介等(2006)研究认为高质量 RNA 的提取与样本的保存条件密切相关, 样本保存方法不当易导致总 RNA 过多降解, 影响后续分子实验。目前对蚊虫保存方法的研究比较局限, 耿艺介等(2006)及孙立新等(2011)对蚊虫标本保存方法的探究均建立在应用试剂盒提取蚊虫 RNA 的基础上, RNA 提取试剂盒的成本较高, 不能得到广泛使用。本研究应用改良 SDS 法提取样本总 RNA, 探讨 4 种不同样本保存方法对蚊虫总 RNA 提取的影响, 为提取有效、高质量的总 RNA 方法提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

蚊虫采自安徽芜湖某高校校园内。经形态学鉴定为中华按蚊 *Anopheles sinensis*。于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 饥饿饲养一周。

1.2 主要试剂

TRIzol 试剂盒 (Invitrogen)、RT-PCR 试剂盒 (TIANGEN); $2\times$ Taq Master Mix (TIANGEN); β -巯基乙醇 (Solarbio); SDS (Solarbio); 醋酸

钠; 水饱和酚 (TIANGEN); 氯仿; 异丙醇、异戊醇、无水乙醇等为分析纯。紫外分光光度计 (美国 Thermo NanoDrop 2000)、PCR 仪 (Eppendorf Mastercycler nexus GSX1)。

1.3 蚊虫总 RNA 提取方法

1.3.1 实验分组 取 15 只成年活蚊虫, 随机分为 3 组, 每组 5 只。分别采用改良 SDS 法、传统 SDS 法、和 TRIzol 法提取蚊虫总 RNA。3 种方法各重复进行 12 次 ($n=12$)。

1.3.2 改良 SDS 法样本制备 配制 $800\text{ }\mu\text{L}$ 核酸萃取液 I ($100\text{ }\mu\text{L}$ 10% SDS、 $500\text{ }\mu\text{L}$ 水饱和酚、 $5\text{ }\mu\text{L}$ β -巯基乙醇 (现用现加)、 $195\text{ }\mu\text{L}$ DEPC 水)、 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ 核酸萃取液 II (水饱和酚: 氯仿: 异戊醇 = 125: 24: 1 和 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ 75%乙醇; 取 1.5 mL 离心管 (DEPC 水处理) 加入总体积 $800\text{ }\mu\text{L}$ 核酸萃取液 I, 轻轻吹打混匀, 将蚊虫样本置于管中, 于冰盒上用研磨杵迅速研磨, 并充分混匀得到匀浆液, 静置 2 min ; 向匀浆液中加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 2 mol/L 醋酸钠缓冲液 (NaAc), 轻轻吹打混匀, 根据 NaAc 缓冲液的最适 pH 值范围探究试验确定最佳的 pH 值。室温下孵育 5 min 。于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min ; 取上层水相, 加入等体积的核酸萃取液 II, 吹打混匀, 振荡 15 s 后室温静置 3 min 。于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min ; 取上层清液, 加入等体积的氯仿重复抽提一次; 取上层清液, 加入等体积的冰异丙醇, 吹打混匀, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 40 min ; 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min , 弃尽上清液, 并加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 75%乙醇, 漩涡震荡 15 s 洗涤沉淀; 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $7\text{ }500\text{ r/min}$ 离心 5 min , 弃尽洗涤液, 沉淀置于超净台中吹风干燥 5 min , 最后充分溶解于 $20\text{ }\mu\text{L}$ RNase-Free 水, 待测。

1.3.3 传统 SDS 法样本制备 根据文献 (Duan *et al.*, 1997) 中方法进行。

1.3.4 TRIzol 法样本制备 参见试剂盒说明书进行。

1.3.5 应用改良 SDS 法探讨蚊虫样本的保存和处理 将饥饿处理一周的成年活蚊虫于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中 5 min 冻死, 以 5 只/管分装于 1.5 mL 经 1%DEPC 水处理的 EP 管中, 实验共分 4 组。其中, 室温组分 5 管, 分别保存 0、3、6、12 和 24 h 后, 取管中蚊虫进行 RNA 提取; 其余 3 组以每组 3 管分别置于 4、 -20 、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存 1 d、1 周、1 个月后, 取出提取 RNA。

1.3.6 RNA 完整性分析及质量检测

1.3.6.1 RNA 浓度与纯度测定 采用紫外分光光度计测定 RNA 溶液的浓度及 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 比值 (Nadiya *et al.*, 2015), 每组样品重复 3 次, 求平均值。

1.3.6.2 RNA 电泳检测 采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。110 V、200 mA 电泳 20 min 后在紫外成像系统下观察拍照。

1.3.6.3 RT-PCR 扩增 β -actin 基因 参照 RT-PCR 试剂盒 (TIANGEN) 说明书合成 cDNA 模板并进行 PCR 反应。PCR 反应体系: 1.0 μL cDNA 模板、0.5 μL 上游引物、0.5 μL 下游引物、6.25 μL 2 $\times$ TaqMaster Mix、4.25 μL 无酶水。PCR 反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、 $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 循环 35 次, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终末延伸 7 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。引物参照文献 (胡莺等, 2003) 设计的 β -actin 基因引物序列, 上游引物: 5'-ATGGGCCAGAAGGACTCGTA-3'; 下游引物 5'-TTAGAAGCACTTTCGGTGCACAAT-3'。

1.4 数据分析

采用 SPSS 22.0 对数据进行统计分析。 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 及浓度用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 3 种方法的浓度比较采用单因素方差分析, 若差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 用 LSD 检验进行两两比较。

2 结果与分析

2.1 改良 SDS 法中 NaAc 缓冲液的 pH 值的确定

NaAc 缓冲液的 pH 在 3.5-3.9 范围时, 提取

的 RNA 条带清晰, 无 gDNA 污染, 无弥散带。结合蚊虫总 RNA 浓度及完整性检测 (表 1, 图 1) 结果表明采用 pH=3.8 的 NaAc 缓冲液提取的蚊虫总 RNA 浓度值最高为 $1.33\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 且条带完整清晰, 确定改良 SDS 法采用 pH=3.8 的 NaAc 缓冲液。

表 1 采用不同 pH 值 NaAc 缓冲液提取的蚊虫总 RNA 浓度

Table 1 The concentration values of mosquitoes' total RNA isolated with NaAc buffers of different pH values

pH	3.5	3.6	3.7	3.8	3.9	4.0	4.1	4.2
浓度								
Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1.21	0.91	0.97	1.33	1.32	1.28	1.26	1.28

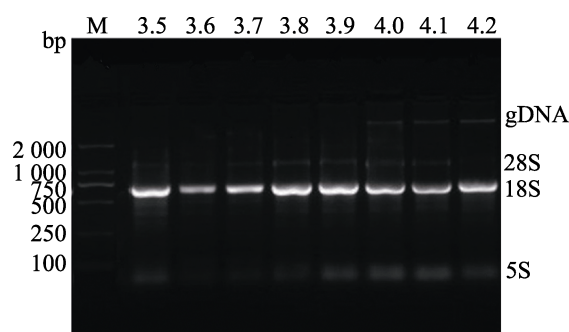


图 1 不同 pH 值的 NaAc 缓冲液提取蚊虫总 RNA 的电泳图

Fig. 1 The electrophoretogram of mosquitoes' total RNA isolated with NaAc buffers of different pH values

M: DNA marker; 泳道 1-8: 改良 SDS 法采用 NaAc 缓冲液的 pH 值 3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2。

M: DNA marker; Lane 1-8: Different pH values of the NaAc buffers: 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2.

2.2 不同提取方法提取的蚊虫总 RNA 质量比较

2.2.1 琼脂糖凝胶电泳分析 改良 SDS 法、传统 SDS 法、传统 TRIzol 法提取的 RNA 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (图 2)。泳道 3 为改良 SDS 法提取的蚊虫 RNA, 电泳结果显示 28 s、18 s 和 5 s 条带完整清晰, 条带之间无明显弥散现象; 传统 SDS 法, 可见明显的 gDNA 条带; TRIzol 法提取蚊虫 RNA 未见 28 s 条带, 且条带有明显弥散。

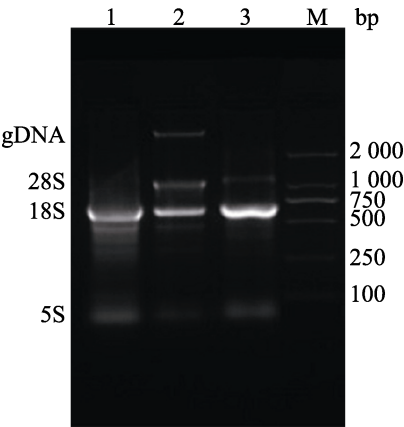


图 2 不同提取方法提取蚊虫总 RNA 的电泳图
Fig. 2 The electrophoretogram of mosquitoes' total RNA isolated by three different methods
M: DNA marker; 泳道 1-3: 提取 RNA 所用的 3 种方法 TRIzol 法、传统 SDS 法、改良 SDS 法。
M: DNA marker; Lane 1-3: RNA isolation methods of TRIzol reagent method, the traditional SDS method, the modified SDS method.

表 2 不同提取方法提取蚊虫 RNA 的浓度和纯度值 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 The average spectrophotometric values of RNA isolated through different methods of mosquitoes ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

方法 Methods	浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
改良 SDS 法 Modified SDS method	$1.223\ 3 \pm 0.374\ 3$	1.843 ± 0.051	2.133 ± 0.066
传统 SDS 法 Traditional SDS method	$0.675\ 0 \pm 0.319\ 8$	1.992 ± 0.047	1.706 ± 0.183
传统 TRIzol 法 TRIzol reagent method	$0.310\ 0 \pm 0.123\ 6$	2.079 ± 0.579	0.670 ± 0.404

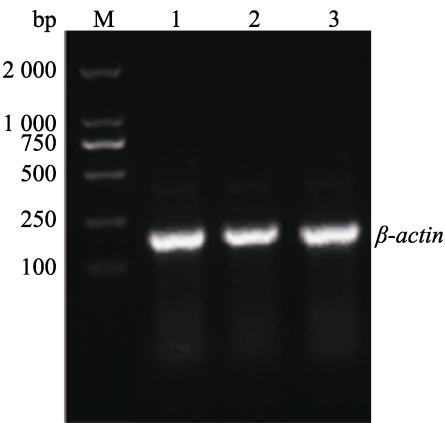


图 3 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 3 The electrophoretogram of RT-PCR assay of mosquitoes' total RNA isolated by three different methods
M: DNA marker; 泳道 1-3: 经 RT-PCR 检测的 RNA 所采用的提取方法 (改良 SDS 法、TRIzol 法、传统 SDS 法)。
M: DNA marker; Lane 1-3: RT-PCR assay of total RNA of the modified SDS method, TRIzol reagent method, the traditional SDS method.

2.2.2 RNA 浓度与纯度测定结果 改良 SDS 法、传统 SDS 法和 TRIzol 法提取蚊虫总 RNA 的浓度值分别为 $1.223\ 3 \pm 0.374\ 3$ 、 $0.675\ 0 \pm 0.319\ 8$ 、 $0.310\ 0 \pm 0.123\ 6$, 3 种方法的浓度值差异具有统计学意义 ($F=14.767$, $P<0.001$)。改良 SDS 法提取蚊虫总 RNA 的浓度值高于其他两种方法 (表 2)。

改良 SDS 法及传统 SDS 法提取的总 RNA 的 A_{260}/A_{280} 均在理想值范围 1.8-2.0 内; TRIzol 法的 A_{260}/A_{280} 高于 2.0。改良 SDS 法提取 RNA 的 A_{260}/A_{230} 在理想值范围 2.0-2.2 内; 传统 SDS 法、TRIzol 法的 A_{260}/A_{230} 均低于 2.0。

2.2.3 RT-PCR 扩增 β -actin 基因的电泳检测 3 种方法提取的蚊虫总 RNA 经 RT-PCR 后扩增出的 β -actin 基因片段长度均约 200 bp, 与预期结果一致, 条带单一, 无拖带 (图 3)。

2.3 不同条件下, 蚊虫 RNA 保存效果比较

将不同保存条件下的样本进行总 RNA 提取, 得到的产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 4)。室温保存 0 h, 提取的 RNA 有少量降解, 其余均有明显降解, 不利于 RNA 的提取 在 - 20 °C 和 - 80 °C 冰箱保存 1 d 和 1 周的样本提取的 RNA 条带清楚, 整齐; 在 - 20 °C 及 - 80 °C 条件下, 保存 1 个月的样本提取的 RNA 存在轻微降解现象; 4 °C 冰箱保存 1 d、1 周及 1 个月的蚊虫提取的总 RNA 均存在显著降解。

3 讨论

传统 SDS 法是常用的一种总 RNA 提取方法, 但对蚊虫进行总 RNA 提取存在明显的 gDNA 污染。gDNA 可扩增性会对 Northern 杂交分析、

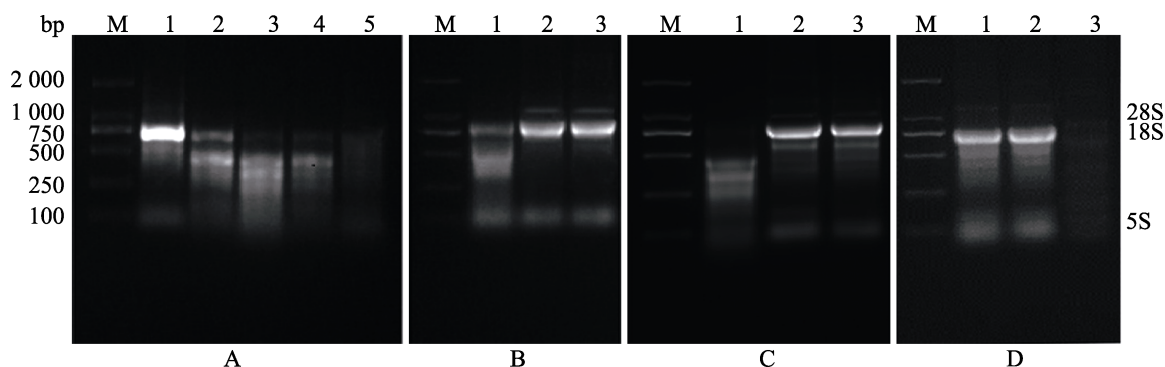


图 4 蚊虫在不同保存和处理条件下提取的总 RNA 的电泳图

Fig. 4 The electrophoretogram of Total RNA isolated from different preserved conditions of mosquitoes

A. 室温保存样本；B. 保存 1 d 样本；C. 保存 1 周样本；D. 保存一个月样本。

A. M: DNA marker, 泳道 1-5: 室温条件下样本保存 0、3、6、12、24 h；B. M: DNA marker,

泳道 1-3: 样本于 4 °C 冰箱、-20 °C 冰箱、-80 °C 冰箱保存 1 d；C. M: DNA marker,

泳道 1-3: 样本于 4 °C 冰箱、-20 °C 冰箱、-80 °C 冰箱保存 1 周；D. M: DNA marker,

泳道 1-3: 样本于 4 °C 冰箱、-20 °C 冰箱、-80 °C 冰箱保存 1 个月。

A. The preserved conditions of samples: Room-temperature; M: DNA marker, Lane 1-5: Preserved time in room-temperature freezer 0, 3, 6, 12, 24 h; B, C, D.

The preserved time of samples: One day, one week, one month, respectively;

B, C. M: DNA marker, Lane 1-3: Preserved conditions 4, -20, -80 °C;

D. M: DNA marker, Lane 1-3: Preserved conditions -20, -80, 4 °C.

RT-PCR 等实验操作产生干扰 (Puissant and Houdebine, 1990), 本研究通过改变 NaAc 缓冲液的 pH 来去除 gDNA。改良 SDS 法采用 2 mol/L、pH = 3.8 的 NaAc 缓冲液, 不同于传统 SDS 法 pH = 4.2 的 NaAc 溶液。偏酸性的 NaAc 缓冲液可以创造酸性的水相环境使部分核酸被酚抽提液吸附。水相 pH 值较低时, 大量核酸会分配到酚相中; 反之, 水相 pH 值过高, gDNA 会被抽提出来 (Farrell *et al.*, 2008)。因此, 改良 SDS 法采用较低 pH 的 NaAc 缓冲液, 有效去除 gDNA。另外, 传统 SDS 法提取的蚊虫 RNA 经电泳检测存在明显的条带弥散现象, 这可能与 RNA 本身不稳定及普遍存在的核糖核酸酶 (RNase) 能够通过外切和内切的方式降解 RNA 等原因有关。本研究在传统 SDS 法基础上进行优化, 即在核酸萃取液 I 中加入少量 RNase 的抑制剂 β -巯基乙醇, 其与 SDS 联合使用可有效抑制内源性 RNase 及酚类氧化酶 (Chang *et al.*, 1993), 帮助提取高质量的 RNA。为了避免蚊虫的色素及核酸溶液中过量的苯酚残存影响后续

实验, 改良 SDS 法改用 125:24:1 的酚/氯仿/异戊醇萃取核酸并用氯仿再次抽提纯化, 加入少许异戊醇可以减少蛋白质变性过程中产生的气泡。

改良 SDS 法提取的蚊虫总 RNA 经统计学检验, 总 RNA 浓度高于其他两种方法, 差异具有统计学意义; 经琼脂糖凝胶电泳和 RT-PCR 证明有效的去除了 gDNA 污染, 且 28 s、18 s 和 5 s 条带完整、条带间无明显弥散, 但 18 s 条带的亮度高于 28 s 条带的亮度, 这与从湖北钉螺、中国对虾、葱蝇、美洲大蠊等其他节肢动物及软体动物中提取的结果一致 (刘志刚等, 2001; 冯国忠等, 2010; 周向红等, 2011; 许树俊等, 2017)。本研究选取 β -actin 基因 (Kitade *et al.*, 2002; 董小林, 2013) 评价蚊虫总 RNA 质量结果表明改良 SDS 法获得的蚊虫总 RNA 符合下游分子生物学研究的实验要求。

TRIzol 试剂的主要成分异硫氰酸胍是一种较强的 RNA 酶抑制剂 (Sanjay *et al.*, 2011), 可以充分裂解细胞抑制内源性 RNase 活性, 从而减

少 RNA 的降解。但采用 TRIzol 法提取的蚊虫 RNA 仅出现 18 s 和 5 s 两条带且经核酸蛋白分析仪检测 A_{260}/A_{280} 大于 2.0, A_{260}/A_{230} 远小于 2.0, 说明提取的 RNA 不完整、RNA 发生降解且存在酚、色素等污染, 不能满足 Northern 对 RNA 完整性高或 RT-PCR 对酶反应抑制物残留严格的要求。TRIzol 试剂盒成本较高, 使用次数受到限制, 不适于大批量 RNA 样本的提取。

对蚊虫样本进行有效的保存, 有利于维持蚊虫及其携带物的完整性(孙立新等, 2011)。在无法实现立即进行 RNA 提取的情况下, 低温冷冻保存是目前常用的样本保存方式, 如液氮保存及低温冰箱保存, 但液氮保存条件较高且价格昂贵。本实验针对低温冰箱保存样本的研究结果显示, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存一个月内的蚊虫样本进行总 RNA 提取的产物未见明显降解, 对蚊虫样本具有良好的保存效果; 室温及 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存均出现明显的 RNA 降解。

参考文献 (References)

- Cui F, Qiao CL, 2007. The molecular mechanisms of insecticide resistance in mosquitoes. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(5): 621–626. [崔峰, 乔传令, 2007. 蚊虫抗药性分子机理. 昆虫知识, 44(5): 621–626.]
- Chang SJ, Puryear J, Cairney J, 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2): 113–116.
- Duan J, Cai X, Zhou L, Wang J, 1997. Single-step method of total RNA isolation by Sodium dodecyl sulfate/phenol extraction from cultured cells. *Anal. Biochem.*, 251(2): 291–292.
- Dong XL, 2013. The application of RNA extraction and real-time fluorescent quantitative PCR in insect. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(5): 1469–1473. [董小林, 2013, 昆虫总 RNA 提取及实时荧光定量 PCR 方法探讨. 应用昆虫学报, 50(5): 1469–1473.]
- Feng GZ, Li WS, Chen B, Li Y, 2010. Construction of a full-length cDNA library of summer-diapause pupae of the onion maggot, *Delia antiqua*. *Chinese Journal of Southwest University (Natural Science)*, 32(6): 89–94. [冯国忠, 黎万顺, 陈斌, 李莹, 2010. 葱蝇夏滞育蛹的全长 cDNA 文库构建. 西南大学学报(自然科学版), 32(6): 89–94.]
- Farrell RE Jr, Jin YX, Liu JH, Jin Y, 2008. RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization. Beijing: Chemical Industry Press. 176. [(美)法雷尔, 金由辛, 刘建华, 金言, 2008. RNA 分离与鉴定实验指南: RNA 研究方法. 北京: 化学工业出版社. 176.]
- Geng YJ, Chen HH, Gao ST, Huang DN, Zhang RL, 2006. Investigation into the impact of methods in raising and keeping of *Anopheles anthropophagus* on the extraction of total RNA. *Chinese Journal of China Tropical Medicine*, 6(8): 1358–1359. [耿艺介, 陈虹虹, 高世同, 黄达娜, 张仁利, 2006. 嗜人按蚊种群饲养及标本保存方法对总 RNA 提取影响的研究. 中国热带医学, 6(8): 1358–1359.]
- Huang XW, Pan J, Zhao LJ, Wu Y, Zhu JP, 2018. Evaluation of 3 methods of plasma micro RNA extraction. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 33(4): 335–338. [黄学文, 潘杰, 赵兰静, 吴茵, 朱菊平, 2018. 3 种血浆微小 RNA 提取方法的评价. 检验医学, 33(4): 335–338.]
- Hu Y, Shen B, Yang MX, Ma L, Li XL, Tian HS, Zhu CL, 2003. Clone and sequence analysis of β -actin gene from culex pipiens pallens. *Chinese Journal of Parasitic Disease Control*, 16(2): 6–9. [胡莺, 沈波, 杨明夏, 马磊, 李秀兰, 田海生, 朱昌亮, 2003. 淡色库蚊 β -肌动蛋白基因克隆与序列分析. 中国寄生虫病防治杂志, 16(2): 6–9.]
- Kitade Y, Fukuda S, Nakajima M, Watanabe T, Saga N, 2002. Isolation of a cDNA encoding a homologue of actin from *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 14(2): 135–141.
- Li CX, Shi M, Tian JH, Li MH, Qin XC, 2015. Screening for Japanese encephalitis virus in mosquitoes by high-throughput sequencing of viral RNA. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 26(5): 439–442. [李辞修, 施莽, 田俊华, 李明慧, 覃新程, 2015. 利用高通量测序技术检测流行性乙型脑炎病毒. 中国媒介生物学及控制杂志, 26(5): 439–442.]
- Liu ZG, Huang JC, Zhu ZY, Zhou ZW, Liu YL, Gong SM, 2001. Construction and primary characterization of cDNA expression library of *Periplaneta Americana* nymph. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 21(s2): 9–11. [刘志刚, 黄炯烈, 朱振宇, 周珍文, 刘玉琳, 龚十妹, 2001. 美洲大蠊若虫 cDNA 表达文库的构建和初步鉴定. 中华微生物学和免疫学杂志, 21(s2): 9–11.]
- Nadiya F, Anjali N, Gangaprasad A, 2015. High-quality RNA extraction from small cardamom tissues rich in polysaccharides and polyphenols. *Anal. Biochem.*, 485(1): 25–27.

- O'Brien CA, Hobson-Peters J, Yam AWY, Agathe MG, Colmant AMG, Mclean BJ, Prow NA, Watterson D, Hall-Mendelin S, Warrilow D, Mah-Lee N, Khromykh AA, Hall RA, 2015. Viral RNA Intermediates as targets for detection and discovery of novel and emerging mosquito-borne viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(3): e0003629.
- Puissant C, Houdebine LM, 1990. An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biotechniques*, 8(2): 148–149.
- Ridgeway JA, Timm AE, 2014. Comparison of RNA isolation methods from insect larvae. *Journal of Insect Science*, 14(1): 268–268.
- Sanjay G, Asosii P, Hitesh K, Arun K, Harsharan S, Bhardwaj PK, Arti R, Ravi SS, Jyoti R, Kashmir S, Sanjay K, 2011. An RNA isolation system for plant tissues rich in secondary metabolites. *Bmc Research Notes*, 4(1): 85–85.
- Sun LX, Hu HX, Zhu GQ, 2011. The evaluation of the protective effect of different preservation methods to mosquito RNA. *Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine*, 34(4): 238–241. [孙立新, 胡红霞, 朱国强, 杨庆贵, 2011. 不同保存方法对蚊虫 RNA 保护效果的评价. 中国国境卫生检疫杂志, 34(4): 238–241.]
- Xu SJ, Wang K, Zhang MH, Chen WJ, Guan GY, Liu MM, Xu L, Sun ET, 2017. Comparison of three different methods for isolating RNA from *Oncomelania hupensis*. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 29(3): 334–337. [许树俊, 王康, 张敏红, 陈文婕, 管国宇, 刘曼曼, 徐蕾, 孙恩涛, 2017. 3 种方法提取湖北钉螺 RNA 的比较. 中国血吸虫病防治杂志, 29(3): 334–337.]
- Zhang JX, Gong ZD, 2008. Survey of mosquito research in China. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 19(6): 595–599. [张菊仙, 龚正达, 2008. 中国蚊类研究概况. 中国媒介生物学及控制杂志, 19(6): 595–599.]
- Zhou QX, 2003. Pilot studies on mosquitoes and mosquito-borne diseases in China. *Chinese Journal of China Tropical Medicine*, 3(1): 19–23. [周钦贤, 2003. 中国蚊类及蚊媒病早期研究的综述. 中国热带医学, 3(1): 19–23.]
- Zhou XH, Yan BL, Li SH, 2011. Molecular cloning and characterization of the gene coding major allergen in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Chinese Journal of Fisheries Science*, 30(2): 102–106. [周向红, 阎斌伦, 李士虎, 2011. 中国明对虾主要过敏原基因分子克隆与序列分析. 水产科学, 30(2): 102–106.]
- Zhou YH, Yan H, Liu YX, Chen XG, 2011. Advances and prospects in micro RNA field of arthropod-borne viruses and their vectors. *Chinese Journal of Molecular Diagnosis and Therapy*, 3(2): 134–137. [周艳河, 言慧, 刘艳霞, 陈晓光, 2011. 虫媒病毒及其媒介蚊虫 microRNA 的研究现状和展望. 分子诊断与治疗杂志, 3(2): 134–137.]