

海湾扇贝样品不同保存条件下 DNA 的提取及 RAPD 扩增比较*

刘保忠 宋林生 相建海

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 以海湾扇贝为材料,研究了鲜活样品以及采用冷冻保存、70%乙醇固定和10%福尔马林固定等方法保存的闭壳肌样品用于DNA提取的不同效果,并分析了不同保存条件下所提得DNA用于RAPD扩增的结果。研究表明,鲜活样品以及采用冷冻保存和70%乙醇固定的样品可以得到很好的DNA,其质量和得率没有显著差异,利用上述DNA模板进行RAPD分析,可以获得一致性很好的扩增结果。10%福尔马林固定样品则没有得到可用的DNA模板。采用70%乙醇固定保存海洋动物组织,是用于DNA提取及相关的分子生物学研究的快速、简易和有效的方法。

关键词 海湾扇贝, DNA提取, RAPD

随着分子生物学技术的发展,分子遗传标记技术被越来越多地应用于海洋动物学的各个研究领域。其中,RAPD,RFLP,微卫星等标记因其分辨率高、稳定性好,成为研究种群遗传学和种系发生的有效手段^[1]。因为该类标记对样品DNA的要求较高,以往的研究工作多以鲜活材料和超低温冷冻样品作为提取DNA的首选^[3,4,6,7]。在实际的研究工作中,野外取样的地点一旦较为偏远,受条件的限制,很难保证得到的样品活体运回或能够快速冷冻;另外,对一些稀有种和濒危种,鲜活样品的采集十分困难,这就为研究工作的开展带来了诸多不便。为了解决上述问题,本研究分别采取活体取样、低温冷藏、乙醇和甲醛固定等方法处理海湾扇贝样品,然后对样品DNA进行提取,并将所得的DNA进行了RAPD扩增,对用于分子标记研究的样品处理方法进行了探讨。实验中选取的海湾扇贝,是我国从美国引进的外来物种,繁殖和养成是在全人工条件下进行的,因此成为研究遗传变异的独特材料,引起人们的广泛关注。同时,本研究所取得的结果,对其他海产贝类分子遗传学的研究也有很好的应用前景。

1 材料和方法

1.1 样品处理

海湾扇贝样品取自中科院海洋研究所实验室暂养的亲贝,取两个亲贝解剖后各将其闭壳肌分为4等份样品,样品a直接用于提取DNA,样品b放入-20℃冰箱快速冷冻,样品c用70%乙醇固定,样品d用

10%的中性甲醛溶液固定。其中b,c,d样品储存10d后再用于DNA的提取。

1.2 DNA提取

样品a,b各取300mg组织剪碎后直接用蛋白酶裂解;样品c,d自固定液中取出后放入蒸馏水中浸泡24h,其间换水3~4次,浸泡期间样品始终置于4℃冰箱内,防止样品变质。样品自蒸馏水取出后用吸水纸吸去表面的水分,剪碎后裂解。

各取300mg组织,放入600μl裂解液:540μl HB(10mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 100mmol/L EDTA), 60μl浓度10%的SDS, 100μg蛋白酶K, 55℃水浴消化4~5h,至组织碎块完全裂解,裂解液变清。

裂解液分别用等体积的饱和酚、酚:氯仿(1:1)、氯仿:异戊醇(24:1)抽提,加入2倍体积的无水乙醇和终浓度10%的乙酸钠离心沉淀DNA,然后用70%的乙醇洗2次后晾干。

1.3 DNA定量检测

干燥好的DNA用50ml TE(pH 8.0)溶解成为母液,各取母液3μl用重蒸水稀释10倍,使用BECKMAN DU650紫外分光光度计检测DNA的含量。

将母液各取4μl,用1%的琼脂糖凝胶电泳,根据电泳结果评价所提DNA的质量。

1.4 RAPD扩增及电泳检测

* 国家自然科学基金资助项目 39700017号。

收稿日期:2000-05-22;修回日期:2000-07-06

实验所用引物为上海生工公司的随机引物,PCR扩增使用 PE 9600 扩增仪。RAPD 反应条件参照 Williams 1990 年的报道,94 °C 预变性 5 min,35 个扩增循环(94 °C 30 s,36 °C 1 min,72 °C 1 min),72 °C 延伸 10 min。

扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色,凝胶成像系统观察及记录。

2 结果

从电泳结果分析,样品 a, b, c 都得到了大小在 20 kb 左右的条带,说明 DNA 片段较大,且没有产生明显的降解,所得 DNA 无论从得率还是质量上 3 种处理方法无显著差异,而甲醛固定的样品则没有检测到 DNA(图 1)。

从测量结果看,甲醛固定样品的 OD_{600 nm} 值很低,其余各种保存条件下得到的 DNA,除 1 号个体 a 样品因为操作原因得率稍低外,其他样品保持了较高的得率,且 DNA 的量大致相同(表 1)。

利用随机引物的 PCR 扩增,在相同的扩增条件下,所得扩增产物没有显著差异,通常用于遗传分析的主条带表现出了很强的一致性,说明冷藏及乙醇处理样品所得的 DNA 完全可以用于 PCR 扩增,其结果用于遗传分析,同鲜活材料所得的结果具有很好的可比性(图 2),利用甲醛固定样品的提取物扩增,各种模板浓度都未检出扩增产物。



图 1 不同保存条件下海湾扇贝样品 DNA

Fig.1 DNA templates isolated from *Argopecten irradians*
M 为 λ DNA EcoRI + HindIII; 1a, 1b, 1c, 1d 及 2a, 2b, 2c, 2d 分别为个体 1, 2 之鲜活、冷冻及乙醇和甲醛固定样品(图 1, 图 2 同)

3 讨论

已有的研究结果,绝大多数是采用活体取样或冷冻样品获得的,本研究证实,乙醇固定的样品完全可以得到质量很好的 DNA 样品,PCR 扩增产物上述两

种方法所得结果表现出很好的一致性,说明乙醇固定是野外取样保存材料的简便可行的方法,其固定保存的样品完全可以满足遗传分析的需要,并且所得结果同以前的研究结果具有很好的可比性。甲醛固定的海湾扇贝样品,采用我们目前的提取方法,没有得到高质量的 DNA,这与王义权等对蛇的研究结果相似^[1]。作者曾尝试延长浸泡时间和采用双倍蛋白酶 K 的用量,都没能取得满意的结果。肖武汉等报道从甲醛固定的云南鲟标本中提取到 DNA 并成功地用于其细胞色素 b 基因序列的分析^[2],因此,海洋动物甲醛固定样品的 DNA 提取方法,需要我们进一步研究,因为以往固定保存的动物样品,多数是以甲醛作为固定剂的。



图 2 海湾扇贝样品 DNA 的 RAPD 电泳图谱

Fig.2 The electrophoresis pattern of RAPD from tissues preserved with different methods *A. irradians*

细胞内 DNA 的降解,主要是自身 DNA 酶的作用,乙醇和甲醛作为常用的固定剂,都能较快地渗入细胞内部,促使蛋白质变性,各种水解酶很快失活,从而达到保存 DNA 的作用。甲醛固定的材料,较难提取到好的 DNA 样品,因为固定样品的 DNA 分子产生交联作用,DNA 抽提时与蛋白等产生共沉淀进入酚相。另外,甲醛氧化后形成的甲酸对 DNA 有较强的降解作用。

乙醇固定样品时,应保证足够的乙醇用量,如果野外采样没有足够大的容器用于固定样品,可采用多次更新固定液的方法,同样可以取得满意的结果。

参考文献

- 1 王义权,周开亚等.动物学杂志,1999,34(1):33~37
- 2 肖武汉,吴春花等.动物学研究,1997,18(3):242,252,258,284
- 3 Caccione A. et al.. J. Heredity, 1997, 88(4):316~324
- 4 Elo K. et al.. Aquaculture, 1997, 152:55~65

研究报告 *REPORTS*

- 5 Russell Stothard J. *et al.* . *J. Moll. Stud.* , 1996 , 62 : 165 ~ 176
- 7 Todd C.D. *et al.* . *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* , 1997 , 210 : 251 ~ 274
- 6 Stothard J. R. *et al.* . *J. Moll. Stud.* , 1996 , 62 : 165 ~ 176

DNA ISOLATION AND RAPD ANALYSIS OF THE *Argopecten irradians* TISSUE PRESERVED WITH DIFFERENT METHODS

LIU Baozhong SONG Lirsheng XIANG Jianghai
(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071*)

Received : Jul .6 ,2000

Key Words : *Argopecten irradians* , DNA isolation , RAPD

Abstract

In order to search for a suitable method for the tissue preservation and DNA isolation of marine animals , the adductor muscle of bay scallop (*Argopecten irradians*) was treated with different methods : frozen at - 20 °C , fixed with 70 % ethanol and 10 % formaldehyde more than 10 days . DNA templates about 20 kb were extracted successfully from the fresh , frozen and 70 % ethanol fixed tissues . RAPD analysis indicated that PCR product has no obvious distinction among them in the same individuals . No usable DNA was gotten from the formaldehyde fixed tissue . The result suggested that the 70 % ethanol is appropriate for tissue preservation , and the extracted DNA is satisfactory for RAPD analysis .

(本文编辑 : 刘珊珊)