

大黄鱼高质量基因组 DNA 的简便提取方法*

A SIMPLE METHOD FOR EXTRACTION OF HIGH QUALITY GENOMIC DNA FROM *Pseudosciaena crocea* (Richardson)

李明云 张海琪

(宁波大学海洋与水产系 315211)

关键词 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea* (Richardson)), 基因组 DNA, 提取, RAPD

目前常用的分子标记技术如 RAPD、AFLP、微卫星等都是 DNA 为研究对象, 而高质量 DNA 的简便快速提取是至关重要的^[1]。大黄鱼(*Pseudosciaena crocea* (Richardson)) 曾是我国著名的四大海洋渔业对象之一, 也是目前闽浙两省重要的经济养殖品种。近年来养殖大黄鱼普遍出现生长缓慢、抗病能力弱、性成熟提早、个体小等生物学性状退化的现象^[2]。为了从 DNA 水平上研究大黄鱼遗传多样性, 为养殖大黄鱼种质的改良和养殖业的健康持续发展提供依据, 我们首先要从大黄鱼组织中提取基因组 DNA。在提取实验中, 发现常规的酚/氯仿/异戊醇抽提法不够理想, 操作繁琐, 需时较长, 稳定性差。为此, 我们尝试用星普组织微量 DNA 纯化试剂盒提取大黄鱼的基因组 DNA, 获得了较满意的结果。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验所用的大黄鱼是 2001 年 3 月 2 日取自浙江宁波宁海樟树村养殖场, 健康状况良好, 体重为 350~500 g。采用充氧袋充氧后快速运回实验室, 并于增殖研究室内的玻璃缸内暂养。

星普组织微量 DNA 纯化试剂盒购自宁波星普基因技术有限公司, 随机引物、DNA 聚合酶(含 Buffer 和 Mg^{2+})、dNTPs 购自上海生工公司, 其它试剂均为分析纯试剂。

1.2 方法

解剖取背部肌肉。酚/氯仿/异戊醇抽提基因组 DNA 法参考魏群^[3]的方法。称取 300 mg 新鲜组织, 加 400 μ l 裂解液(0.5% SDS + 1 mol/L NaCl), 冰浴研磨成

匀浆, 加入 10 μ l 浓度为 20 g/L 的蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 水浴过夜, 裂解物用等体积的饱和酚、酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和氯仿/异戊醇(24:1)各抽提一次, 14 000 r/min 离心 20 min。移出上层水相至 1.5 ml 离心管中, 加两倍体积预冷至 -20 $^{\circ}$ C 的无水乙醇, 混匀, -20 $^{\circ}$ C 静置过夜, 14 000 r/min 离心 30 min; 沉淀物用 70% 乙醇漂洗 2~3 次, 室温自然干燥, 最后将 DNA 溶于 100 μ l TE 稀释液中。

用星普组织微量 DNA 纯化试剂盒提取 DNA, 步骤参照产品说明, 略有改进。称取 10~25 mg 组织加入 1.5 ml 离心管中, 加 300 μ l 裂解液, 用组织捣碎棒将组织充分捣碎成匀浆, 14 000 r/min 离心 1 min, 弃上清液待用。再在离心管中加入 400 μ l 裂解液与 10 μ l 浓度为 20 g/L 的蛋白酶 K, 立即在振荡器上剧烈振荡 30 s, 使离心管底部的沉淀打散, 再加入 5 μ l 浓度为 10 g/L 的 RNA 酶, 混匀后 70 $^{\circ}$ C 水浴 10~15 min, 14 000 r/min 离心 2~4 min, 取上清液加入 200 μ l 7.5 mol/L 异丙醇, 并立即在振荡器上振荡 30 s, 充分混匀。将混合液转移到旋转离心柱, 14 000 r/min 离心 1 min, 弃过滤液, 用 500 μ l 无水乙醇洗离心柱 2 次, 14 000 r/min 离心 1 min, 弃去过滤液, 再次 14 000 r/min 离心 4~6 min, 最后用 100 μ l TE 缓冲液洗脱离心柱

* 浙江省自然科学基金资助项目 399428 号。

第一作者: 李明云, 出生于 1942 年, 大学本科, 教授, 研究方向: 苗种繁育。E-mail: limingyun@nbip.net.cn

收稿日期: 2001-05-22; 修回日期: 2001-10-10

上的 DNA。

1.3 质量检测

DNA 经稀释后在 Cary 100 紫外分光光度计上检测 260 nm 和 280 nm 的光吸收值, 计算 DNA 的浓度, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的质量。

1.4 RAPD 扩增及电泳检测

以星普法所提取的大黄鱼基因组 DNA 为模板, 使用经过筛选的、能扩增多带的引物 S103 5'-AGACGTCCAC。反应体系含 dNTP 200 μ mol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, 引物 0.8 μ mol/L, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ l, Taq DNA 聚合酶 1 U, DNA 模板设置 5 个浓度 10, 25, 50, 100, 200 ng, 反应总体积 25 μ l, 于 *Thinke rseries* II 基因扩增仪上进行。循环参数参照文献[7], 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 循环 35 次, 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 结束反应。扩增产物由 1.4% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 电泳检测

用上述方法能获得较高质量的 DNA。经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示。

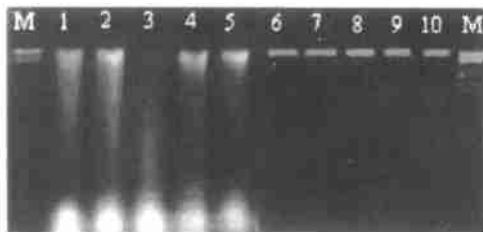


图 1 大黄鱼基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图
M: λ DNA/ EcoR I + Hind III; 泳道 1~5 为传统法提取的 DNA, 泳道 6~10 为星普法提取的 DNA。

从图 1 可以看到传统方法和星普法提取的 DNA 分子量大小基本与 21 kb 分子量标准同一水平排列, 因此可以满足一般分子生物学研究对 DNA 分子大小的要求。传统方法提取的 DNA 含有杂质, 所以有拖带现象, 并且含有 RNA。若要纯化还需要用 RNA 酶处理。而星普法所提取的 DNA 主带清晰完整, 未见有拖带现象。

2.2 紫外吸收检测

采用 Cary100 紫外分光光度计检测 260 nm 和 280 nm 的光吸收值。传统方法提得的 DNA 浓度平均为 100 mg/L, A_{260nm}/A_{280nm} 比值在 1.5~1.9 之间, 结果变异大, 常含有蛋白质污染。而星普法提取 DNA 稳定

性好, 所得的 DNA 浓度平均为 150 mg/L 左右, A_{260nm}/A_{280nm} 比值在 1.75~1.9 之间, 说明所提取的 DNA 质量高, 几乎没有 RNA 及蛋白质污染。传统方法和星普法相比, 后者所提取的 DNA 质量高, 故在大黄鱼基因组 DNA 提取过程中, 以星普法为佳。

2.3 RAPD 分析

采用星普法所提取大黄鱼肌肉的基因组 DNA 为模板, 进行 RAPD 扩增, 电泳检测结果见图 2。5 个模板浓度的 RAPD 条带清晰度高, 重复性好, 进一步证实了所提取的 DNA 质量高, 完全可以满足 RAPD 实验对模板 DNA 质量的要求。

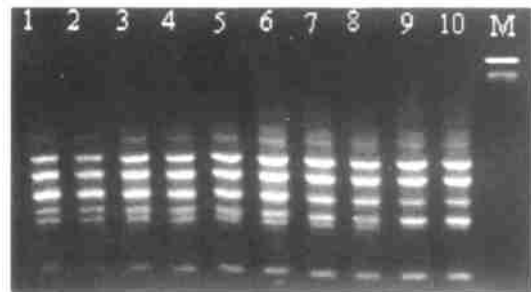


图 2 大黄鱼 RAPD 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图
M: 同图 1; 1(2) 为 10 ng, 3(4) 为 25 ng, 5(6) 为 50 ng, 7(8) 为 100 ng, 9(10) 200 ng DNA 模板的 RAPD 扩增产物。

3 讨论

DNA 的提取是分子生物学研究中的基本技术, DNA 样品的质量对实验的成败至关重要。提取动物 DNA 的方法虽然很多, 但每种方法中最为关键的有 3 点: (1) 破碎细胞壁和细胞膜使 DNA 释放到提取缓冲液中; (2) 消除蛋白质、多糖等杂质的污染; (3) 防止 DNA 的降解。各种方法都是针对以上 3 点做了不同的改进和完善。一般而言, 一个好的 DNA 提取方法应符合以下标准: (1) 所提取的 DNA 完整, 电泳检测时有良好的电泳图谱; (2) 操作程序应当快速、简便、成本低, 并尽可能避免使用有毒试剂; (3) 所提取的 DNA 量大。以往对于海水鱼类分子生物学的研究所采用的是传统方法抽提 DNA^[4-6]。传统方法提取 DNA 耗时长, 需要 1~2 d 才能完成整个过程, 操作繁琐, 往往需要用多次酚和氯仿等有机溶剂进行抽提, 而饱和酚具有高度腐蚀性, 易引起严重的烧伤, 因此对实验人员不利, 并且传统方法的结果不稳定。

采用星普法提取 DNA, 其原理是采用强有效的裂

实验与技术

EXPERIMENT & TECHNOLOGY

解液完全破碎细胞并利用旋转离心柱内的固态膜选择性地吸附 DNA。当标本经细胞裂解处理后,加入离心柱内,通过高速离心, DNA 能被高效选择性地吸附在固态膜上,而绝大多数杂质(蛋白质、糖类、脂类、盐等)均可通过固态膜被离心掉。再经两次洗脱离心将残留在固态膜上的微量杂质(主要是二价阳离子和一些杂质蛋白等生化反应抑制物)除去,最后用低盐中性缓冲液洗脱以获得高纯度的 DNA。本法所需材料较少,只要 10 ~ 25 mg 就足够了,且 1 ~ 2 h 内就可以完成整个过程。其最大的特点就是用离心柱吸附 DNA。由于固态膜吸附 DNA 的能力有限,若使用过多的组织,反而会降低 DNA 的数量,因此一个组织样品用量需控制在 25 mg 左右,这是快速提取 DNA 需注意的第一点;第二点是组织捣碎要完全,如果组织捣碎不完全,将明显地降低 DNA 的产量,并可能引起旋转离心柱堵塞。用该法提取的 DNA 分子质量大,纯度高,作模板可产生带型丰富、清晰的

RAPD 图谱。

参考文献

- 1 汪永庆、王新国、徐来祥等。一种动物基因组 DNA 提取方法的改进, *动物学杂志*, 2001, **36** (1): 27 ~ 29
- 2 王 军、全成干、苏永全等。官井洋野生与养殖大黄鱼同工酶的研究, *海洋科学*, 2001, **25** (6): 39 ~ 41
- 3 魏 群。分子生物学实验指导。北京: 高等教育出版社; 海得堡: 施普林格出版社, 1999。66 ~ 68
- 4 丁少雄、王 军、全成干等。鲢状黄姑鱼养殖群体的遗传多样性, *科学通报*, 1998, **43** (21): 2 294 ~ 2 299
- 5 权洁霞、戴继勋、沈颂平等。梭鱼人工养殖群体与自然群体的随机扩增多态 DNA(RAPD) 分析, *海洋学报*, 2000, **22** (5): 82 ~ 87
- 6 Ma muris Z., Apostolidis A. P., Theodorou A. J. *et al.*. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to evaluate intraspecific genetic variation in red mullet(*Mullus barbatus*), *Marine Biology*, 1998, 132: 171 ~ 178
- 7 Williams J. G. K., Anne R. K., Kenneth J. A. R. *et al.*. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18** (4): 6 531 ~ 6 535

(本文编辑: 刘珊珊)