

## 马氏珠母贝 DNA 快速一步法 (ROSE) 提取及 ISSR-PCR 应用 \*

吕林兰<sup>1,2</sup> 王爱民<sup>3,4\*\*</sup> 杜晓东<sup>1</sup> 严虹羽<sup>3</sup><sup>1</sup> 湛江海洋大学 湛江 524025)<sup>2</sup> 海南省热带农业资源开发利用研究所 三亚 572025)<sup>3</sup> 海南大学海洋学院 海口 570228)<sup>4</sup> 广西海洋研究所 北海 536000)

**摘要** 以马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 为材料, 采用一步法 (ROSE) 提取 DNA, 并将提取的 DNA 应用于 ISSR 扩增。结果表明: ROSE 法提取 DNA 比常用的 SDS 法简易, 快捷, 无污染物产生, 节省费用 99%, DNA 提取效率相当。ROSE 法和常用的 SDS 法提取的 DNA 分别用于 ISSR 分析, 可以获得一致性很好的扩增效果。因此, ROSE 法提取 DNA 是一种适合于海洋贝类大规模提取 DNA 的有效方法。

**关键词** 马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*), DNA 一步法提取, PCR 应用

**中图分类号** Q78, Q178.53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)10-0042-04

随着现代分子生物学和生物技术的快速发展, 分子遗传标记技术已广泛地应用于植物、动物和微生物的各个研究领域。RAPD、ISSR、SSR 及 AFLP 等分子标记已成为研究生物种群遗传学、系统进化及保护生物学等的有效手段<sup>[1]</sup>。近年来, 分子标记技术的应用也日益受到海洋生物学家的重视。然而, 以 DNA 为研究对象的分子遗传与育种学研究大都具有特殊的生活环境, 样本采集数量大, 样本需要长时间保存及只能运回实验室进行 DNA 的大量提取等问题为海洋分子生物学研究带来了不便和困难。1995 年 Steiner 等<sup>[2]</sup>首先报道 ROSE 法 (Rapid one-step Extraction) 提取 DNA; 1997 年方宜钧等<sup>[3]</sup>人进一步简化了 ROSE 法, 成为更为省时省力的“一步一管法”; 简化提取 DNA 的方法已广泛应用于作物分子生物学研究中<sup>[4,5]</sup>。目前, 海洋生物的 DNA 提取方法常见的是以酚氯仿抽提为基础的 SDS 法<sup>[6,7]</sup>, 其提取过程, 主要不足是耗时长, 成本高。本研究探索将应用于植物的 ROSE 法改良后应用于马氏珠母贝的 DNA 提取, 试图为海洋生物大规模 DNA 提取提供一条方便快捷的途径, 并应用于 PCR 研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

本研究材料为海南野生马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*), 取 6 只贝解剖后取其闭壳肌, 样品 1, 2, 3 用

SDS 法提取 DNA, 样品 4, 5, 6 用 ROSE 法提取。

### 1.2 DNA 提取方法

ROSE 法: 本方法按 Steiner<sup>[2]</sup>和方宜钧等<sup>[3]</sup>人的方法稍作改进后进行。ROSE 提取缓冲液为 1% SDS, 10 mmol/L Tris-HCl, 0.3 mmol/L EDTA, 2% PVPP, pH 8.0。实验操作如下:

(1) 取马氏珠母贝闭壳肌 0.2 g 剪碎置于 1.5 mL 的 Eppendorf 管中。(2) 加 500  $\mu$ L 的 ROSE 提取缓冲液, 混匀后置于 90  $^{\circ}$ C 水浴中, 不时颠倒混匀, 温育 20 min。(3) 于冰浴中 5 min, 使组织和 PVPP 沉淀, 置于 4  $^{\circ}$ C 保存备用。

SDS 法 (常规法): 本方法按刘必谦<sup>[6]</sup>等人的方法稍作改进。SDS 提取缓冲液为: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2), 1 mmol/L EDTA-Na, 400 mmol/L NaCl, 1% SDS 和 100  $\mu$ g/mL 蛋白酶 K。实验操作如下:

\* 国家自然科学基金项目 39969003 号; 广西壮族自治区科学研究与技术开发项目, 桂科配 0007018 号; 国家 863 计划项目 2002AA603022 号。

\*\* 通讯作者: ai.mwang6@hotmail.com

第一作者: 吕林兰, 出生于 1976 年, 硕士研究生。研究方向: 贝类遗传育种和养殖。E-mail: lvlinlan@sohu.com

收稿日期: 2002-12-30; 修回日期: 2003-06-10

(1) 0.2 g 闭壳肌于研钵中加液氮研磨成粉末状,置于 1.5 mL Eppendorf 管中。(2) 加入 500  $\mu$ L 提取液,55  $^{\circ}$ C 消化过夜(至样品变清)。(3) 变清的样品中加入 150  $\mu$ L 饱和 NaCl。(4) 室温 800 r/ min 离心 20 min。(5) 加入 500  $\mu$ L 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)轻轻混匀 10 min。(6) 室温 12 000 r/ min 离心 10 min,将上清小心转移至另一 1.5 mL Eppendorf 管中。(7) 加 500  $\mu$ L 氯仿,轻轻混匀,抽提 10 min。(8) 室温 12 000 r/ min 离心 10 min,将上清小心转移至另一 1.5 mL Eppendorf 管中。(9) 溶液中加入 10  $\mu$ g RNA 酶,37  $^{\circ}$ C 保温 30 min。(10) 加入等体积氯仿,轻轻混匀,再抽提 10 min。(11) 室温 12 000 r/ min 离心 10 min,小心转移上清至另一 1.5 mL Eppendorf 管中。(12) 加入 1 mL 预冷的无水乙醇,于 -20  $^{\circ}$ C 沉淀 0.5 h。(13) 室温 12 000 r/ min 离心 5 min。(14) 弃上清,加 70% 的酒精洗涤。

(15) 室温干燥后,加 100  $\mu$ L TE 溶解。

### 1.3 ISSR 扩增

用上述两种方法提取的 DNA 作模板,用 ISSR 随机引物对其进行 PCR 扩增。

## 2 结果

### 2.1 DNA 提取的质量检测

用 ROSE 法提取的 DNA 直接取其上清液(250  $\mu$ L),稀释 20 倍后用 Spectramlab 52 紫外分光光度计检测 DNA 含量。SDS 法提的 DNA 凉干后用 100  $\mu$ L 的 TE 溶解,稀释 50 倍后检测。检测结果如表 1 所示。从表 1 可以看出,用 ROSE 法提取的 DNA 量,样本间 DNA 量相差不大,最大相差 82 ng,而 SDS 法提取的 DNA 量却相差较大,最大达 196 ng。

以 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测上述两种方法提

**表 1 SDS 法和 ROSE 提取的 DNA 量检测**

**Tab.1 Examination of DNA contents extracted by SDS method and ROSE method**

样本	SDS 法			ROSE 法		
	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6
DNA 含量 (ng/ $\mu$ L)	324	410	520	218	284	202
平均数 (ng/ $\mu$ L)	418 $\pm$ 98.2			235 $\pm$ 43.5		

取的 DNA,吸取 2  $\mu$ L 原液,以 5 V/cm 电泳 1 h,EB 染色,在紫外凝胶图像系统中观察并扫描,结果如图 1 所示。由图 1 可以看出 SDS 法和 ROSE 法提取的 DNA 都没有明显的降解现象。经紫外分光光度计检测其纯度,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>均达到 1.8,电泳也无明显拖尾,由此说明 DNA 样品纯度较高,可满足一般分子生物学的

实验需求。

### 2.2 ROSE 法与 SDS 法的操作程序及其效率分析

从本研究可以得出,用 ROSE 法提取 DNA 不需大型的仪器设备,不需要液氮,操作简易,省时省力,成本低廉,DNA 提取率高(表 2)。

**表 2 SDS 法和 ROSE 法 DNA 提取操作及效率比较**

**Tab.2 Comparisons of operating steps and efficiencies between SDS method and ROSE method**

比较项目	SDS 法	ROSE 法
提取时间(min/样本)	50	5
提取步骤(步/样本)	15	3
所需仪器设备	离心机	不需要
是否需要液氮	需要	不需要
提取试剂成本(元/样本)	0.96	0.085
DNA 提取率( $\mu$ g/mg)	0.21	0.29
能否用于野外操作	不能	能



图 1 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA

Fig.1 0.8% Agarose gel examination of amplified DNAs  
1,2,3,4,5,6 为样号

### 2.3 ISSR 扩增及电泳检测

实验所用的 ISSR 引物为 UBC primer, PCR 扩增

仪为美国 M 公司生产的 PTC100 型, 所用缓冲液和酶均购自 Promega 公司。反应总体积为 25  $\mu$ L, 反应体系为: 2.5  $\mu$ L 10 $\times$  buffer, 1.5  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ L ISSR 引物, 0.5  $\mu$ L 甲酰胺, 1 unit Taq 酶, DNA 15 ng, 加双蒸水至总体积 25  $\mu$ L。反应程序为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 43 个循环 (94  $^{\circ}$ C 1 min, 52  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 2 min), 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 电极液为 1 $\times$  TBE, 恒压 5 V/cm 进行电泳, 电泳后银染, 观察扫描并记录实验结果。结果如图 2 所示。从图中可以看出, 以 ROSE 法提的 DNA 与 SDS 法提取的 DNA 在用于 ISSR 扩增时, 其扩增产物无明显区别, 扩增效果基本一致。

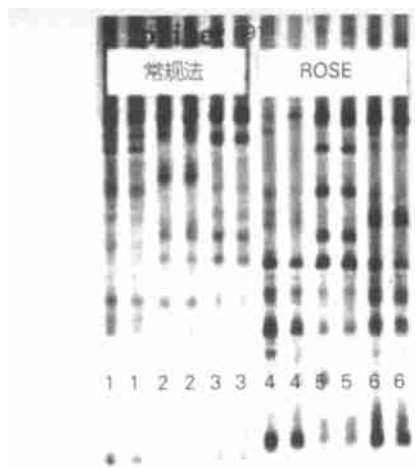


图 2 不同方法提取的 DNA 的 ISSR 扩增结果

Fig. 2 ISSR bands of Amplified DNAs from two different extracting methods  
1, 2, 3, 4, 5, 6 为样本号

### 3 讨论

DNA 分子标记是 DNA 水平变异的直接反映, 既不受环境影响, 也不受基因表达与否的限制, 标记数量丰富, 遗传性稳定, 所有这些特性使得它具有广泛的应用前景。在水产动物上, 已有不少报道应用在遗传多样性分析、种质资源调查、杂交优势预测等方面。如何在短时间内大规模进行海洋生物的 DNA 提取是广大海洋生物学家共同关心的问题。常见的 SDS 法提取 DNA 不仅需要大型的仪器设备, 如低温冰箱、

离心机等, 而且操作繁琐, 苯酚氯仿使用不慎还会对人体造成伤害, 其废液对环境也是一种污染。本研究采用的 ROSE 法, 一步一管即可完成 DNA 的提取, 方法简单, 提取快速, 成本低廉, 而且无污染。一次提取的 DNA 量可用于 3 000 次 PCR 实验, 完全满足像 ISSR 分子标记所需的模板量, 而且由于 ROSE 法操作简单即一步一管, 避免了 SDS 法中不断转移上清和一些人原因造成的误差, 在保证取样量一致的情况下, 用 ROSE 法提取的 DNA 量在样本间基本保持一致, 使得在最后用于扩增时, 样本间模板浓度无需调整, 扩增更加稳定。本研究的 ISSR 扩增结果也进一步证实了 ROSE 法应用于 PCR 的可行性, 而且 ROSE 法提取的 DNA 中大分子量 DNA 占比例高, 从而减少了小分子量 DNA 片段引起的扩增产物不稳定。显然, ROSE 法是一种简单快捷的 DNA 提取方法, 尤其为野外、远洋工作者提取 DNA 提供了方便。

**致谢:** 本工作在海南省热带农业资源开发利用研究所完成, 承蒙方宣钧研究员指导和审阅, 在此一并致谢。

#### 参考文献

- 1 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种. 北京: 科学出版社, 2001. 1-84
- 2 Steiner J J, Poklemba C J, Jellstrom, et al. A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(13): 2569-2570
- 3 方宣钧, 孔巍, 金尧军. 快速一步法 (ROSE) 提取 DNA 应用于 RAPD PCR 扩增. *高技术通讯*, 1997, 7(10): 41-43
- 4 Burr K, Harper R, Linacre A. One-step isolation of plant DNA suitable for PCR amplification. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2001, 19: 367-371
- 5 Gustine D L, Voigt P W, Brummer C, et al. Genetic variation of RAPD markers for North American white clover collections and cultivars. *Crop Sci*, 2002, 42: 343-347
- 6 刘必谦, 戴继勋. 巨蛎属牡蛎遗传多样性研究. *水产学报*, 1998, 22(3): 193-197
- 7 Smith P L, Gaffney P M, Purves M. Genetic markers for identification of *Patagonian* and toothfish. *Journal of Fish*, 2001, 58: 190-194

## RAPID ONE-STEP EXTRACTION OF *Pinctada martensii* DNA FOR ISSR-PCR AMPLIFICATION

LÜ Lir-Lan<sup>1,2</sup> WANG Ai-Min<sup>3,4</sup> DU Xiao-Dong<sup>1</sup> YAN Hong-Yu<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang, 524025)

(<sup>2</sup> Hainan Provincial Institute of Tropic Agricultural Resource, Sanya, 572025)

(<sup>3</sup> Ocean College, Hainan University, Haikou, 570228)

(<sup>4</sup> Guangxi Institute of Oceanography, Beihai, 53600)

Received: Dec., 30, 2002

Key Words: *Pinctada martensii*, Rapid one-step extraction DNA, PCR

### Abstract

Rapid One-step Extraction( ROSE) of DNA was used to extract DNA from pearl oyster, *Pinctada martensii* and the DNAs were applied to ISSR-PCR analysis. The results showed that the ROSE was more simple and more quickly than the SDS method that was usually used; There was no pollution in the extracted productions, and it can save 99% of extracting expenses when the same qualities of DNAs were extracted by SDS method. The DNAs extracted with both the ROSE and SDS methods were used for ISSR comparison, and the amplified DNA bands showed no difference, therefore, we came to the conclusion that ROSE method is efficient for extraction DNA of marine shellfish on a large scale.