

海绵动物保存及 DNA 提取方法的研究

龚琳, 欧徽龙, 王德祥, 柯才焕, 李文宇

(厦门大学 海洋与地球学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 海绵标本长期、完整的保存是开展海绵分类学及分子进化研究的重要前提, 本研究以建立通用的海绵动物标本的保存方法及快速、完整的基因组 DNA 提取方法为主要目的, 通过对硅质的山海绵 (*Mycale* sp.) 和钙质的白枝海绵 (*Leucosoleniidae* sp.) 为材料进行 -20°C 冰冻、乙醇固定、冰冻后风干和乙醇固定后风干等 4 种保存方法进行研究, 同时采用酚-氯仿法、高盐法、CTAB 法等 3 种基因组 DNA 提取方法, 测试了 4 种保存方法的 DNA 提取效率。实验结果显示, 海绵样品的 4 种保存方法以及 3 种 DNA 提取方法对于硅质海绵以及钙质海绵虽然在提取的 DNA 得率上有差异, 但都能获得较高纯度基因组 DNA。从经济成本、方便性、潜在的污染等因素考虑, 高盐法是首选的提取海绵基因组 DNA 的方法; 乙醇固定保存的海绵样品 DNA 得率最高, 冰冻的海绵样品得率最低, 推荐采用乙醇固定保存海绵样品的方法。

关键词: 海绵; DNA 提取; 保存

中图分类号: Q33; Q959.12 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)09-0037-06

海绵是最原始的多细胞动物, 全世界现生种约有 15 000 种^[1], 中国有 5 000 种左右^[2]。自从 20 世纪 50 年代在海绵体内分离出活性物质以来, 人们对海绵越来越关注。据统计, 海绵是迄今海洋天然产物的最大来源, 国内相关的研究主要集中在海绵动物体内活性物质及其产生机理^[2], 海绵动物古生物学^[3]、海绵动物骨针纳米生物技术和仿生合成^[4]等研究, 在海绵动物作为生物修复体改善水质^[5]等方面均有涉及。与国外相比, 中国关于海绵动物的研究显得非常薄弱, 尤其是海绵的生物学以及分类学研究相对滞后。

国外对于海绵保存方法的研究较多, 但仍存在争议, 目前存在 3 种公认的海绵运输途中的保存方法: 高分析纯二氧化硅干燥保存小片段的海绵、DMSO 缓冲液保存、冰冻干燥保存^[6]。但在野外大体积样品采样运输过程中这 3 种方法均不实用。当海绵样本较多、较大时, 从经济和简便性来说, 95% 的乙醇的保存方法是最佳的选择^[6], 而由于乙醇容易挥发, 若固定样品时间较长, 未及时更新固定液则容易出现样品损坏等情况。同时野外采集的样品使用乙醇固定是不允许携带乘坐公共交通工具的, 如飞机、火车、轮船等。因此, 探索一套完整的海绵样品野外采集, 长期有效保存, 便捷的 DNA 抽提的方法显得十分必要。

本实验旨在找到在野外采集和标本馆储存时海

绵最优的保存方法以及基因组 DNA 最优的提取方法, 以期从中获取有用的信息, 为野外标本采集、运输及后续处理提供重要的依据, 为建设馆藏海绵标本库的海绵储存方式的提供参考, 也为运用海绵 DNA 进行海绵的分子分类学及群体遗传学的研究提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 材料

实验选取福建漳浦后蔡海区人工渔排上硅质的寻常海绵纲的山海绵属 (*Mycale* sp.) 的种类和漳浦县前亭镇后蔡鲍鱼养殖场钙质海绵纲的白枝海绵 (*Leucosoleniidae* sp.) 为材料, 将两种海绵分别进行 -20°C 冰冻、95% 乙醇固定、冰冻后风干和 95% 乙醇固定后风干等 4 种方法处理, 运用酚氯仿法、高盐法、CTAB 法等 3 种不同方法对 4 种不同保存方法的海绵样品进行基因组 DNA 的提取。每种方法设 3 个平行组, 所有样品基因组 DNA 的提取具体操作如下:

(1) -20°C 冰冻保存法: 采集的新鲜样品直接置

收稿日期: 2012-03-25; 修回日期: 2012-10-24

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2010121034);

福建省自然科学基金资助项目(2011J01245)

作者简介: 龚琳(1988-), 女, 湖北襄阳人, 硕士, 主要从事海洋底栖生物学研究, E-mail: gonglin.123@163.com; 王德祥, 通信作者, 电话: 0592-2880159, E-mail: dxwang@xmu.edu.cn

于含有大量生物冰袋的保温箱中, 4 h 内转移至 -20°C 的冰箱中。整个保存过程避免反复冻融, 直到 2 个月后进行海绵样品 DNA 的提取;

(2) 乙醇固定法: 新鲜采集的样品经简单清洗后, 直接浸泡在 95% 的乙醇中, 24 h 内彻底更换固定液 1 次, 再经过 48 h 后第二次更换相同浓度的乙醇, 之后乙醇浸泡保存, 2 个月后进行海绵样品 DNA 的提取;

(3) 冰冻后风干法: 新鲜采集的样品经简单清洗后直接置于含有大量生物冰袋的保温箱中, 进行自然风干前用淡水彻底清洗海绵样品, 甩出多余水分, 自然风干保存, 干燥保存, 2 个月后进行海绵样品 DNA 的提取;

(4) 乙醇固定后风干法: 新鲜采集的样品经简单清洗后直接浸泡在 95% 的乙醇中, 20~24 h 后倾去固定液, 甩出多余液体, 自然风干, 干燥保存, 2 个月后进行海绵样品 DNA 的提取。

1.2 DNA 提取方法

1.2.1 SDS 酚-氯仿法

取海绵组织约 25 mg, 剪碎, 加入 500 μL DNA 抽提 buffer、50 μL SDS、5.0 μL 蛋白酶 K, 充分混匀后, 于 55°C 旋转加热箱消化 4 h。加入等体积饱和酚, 混匀, 12 000 r/min, 离心 10 min, 取上清。加入 2 μL 的 RNA 酶, 55°C 再消化 0.5 h。加入等体积酚: 氯仿, 混匀, 12 000 r/min, 离心 10 min, 取上清。加入等体积氯仿, 混匀, 12 000 r/min, 离心 10 min, 取上清。加入 2.5 倍体积的无水乙醇, 室温下放置 8~12 min, 12 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清, 75% 乙醇洗涤。室温下干燥后, 用 50 μL 超纯水溶解 DNA。

1.2.2 SDS 高盐法

取海绵组织约 25 mg, 剪碎, 加入 500 μL DNA 抽提 buffer、50 μL SDS、5.0 μL 蛋白酶 K, 2.0 μL RNA 酶, 充分混匀后, 于 55°C 旋转加热箱中消化 4 h。加入 400 μL 6 mol/L NaCl, 混匀, 12 000 r/min, 离心 30 min。取上清, 加入等体积的异丙醇, 混匀后置 -20°C 1 h, 12 000 r/min, 离心 15 min, 弃上清, 75% 乙醇洗涤。室温下干燥后, 用 50 μL 超纯水溶解 DNA。

1.2.3 CTAB 法

取海绵组织约 25 mg, 剪碎, 加入 500 μL 65°C 预热的 CTAB 缓冲液, 5.0 μL 蛋白酶 K, 充分混匀后, 于 55°C 旋转加热箱中消化 4 h。加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇, 混匀, 12 000 r/min, 离心 10 min, 取上清, 加入 2 μL 的 RNA 酶, 55°C 消化 0.5 h。加入等体

积氯仿: 异戊醇(24 : 1), 颠倒混匀, 12 000 r/min, 离心 10 min, 取上清, 加入 0.8 倍体积的异丙醇, 室温下放置 8~12 min, 12 000 r/min, 离心 20 min, 弃上清, 75% 乙醇洗涤。室温下干燥后, 用 50 μL 超纯水溶解 DNA。

1.3 DNA 检测方法

1.3.1 DNA 浓度和纯度检测

运用 ND-1000 超微量紫外分光光度计检测 DNA 的样品的浓度和纯度, 并读出其 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 的值。

1.3.2 凝胶电泳检测

在 1.0% 的琼脂糖凝胶 TAE 缓冲液 110 V 电泳 30 min, 运用 SYNGENE 凝胶成像及分析系统拍照和观察。

1.3.3 COI-PCR 扩增检测

参考海绵生物条形码专业网站提供的简并引物序列^[7], 采用正向引物 LCO-1490(5'-GGT CAACAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3')和反向引物 HCO-2198(5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3')。PCR 反应体系为 25 μL (2.5 mmol/L dNTP 2.5 μL , 10 \times PCR Buffer 2.5 μL , 5 U/ μL Taq polymerase 0.2 μL , 0.1 $\mu\text{mol/L}$ LCO-1490 1 μL , 0.1 $\mu\text{mol/L}$ HCO-2198 1 μL , ddH₂O 17 μL , DNA 模板 2 μL)。每个反应过程为 35 个循环, 一个循环包括: 94°C 50 s, 40°C 55 s, 72°C 1 min。首次循环 94°C 预变性 2 min, 最后 72°C 延伸 7 min。每次反应设置不含模板 DNA 的空白对照。1.0% 琼脂糖检测反应产物。

1.4 主要试剂和仪器

主要试剂: DNA 抽提 buffer(1 mol/L Tris-HCl pH8.0, 0.5 mol/L EDTA pH8.0, 2 mol/L NaCl), CTAB 缓冲液(2% CTAB, 100 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 20 mmol/L EDTA pH8.0, 1.4 mol/L NaCl), 10% SDS, 20 mg/mL 蛋白酶 K, 10 mg/mL RNA 酶, Tris-饱和酚, 酚/氯仿(酚: 氯仿: 异戊醇 = 25 : 24 : 1)。

主要仪器: HB-1000 型旋转加热箱, Mikro-22 型台式高速离心机, ND-1000 超微量紫外分光光度计(NanoDrop® ND-1000), Gene genius SYNGENE 凝胶成像及分析系统。

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度和纯度检测

表 1 为 3 种方法提取的 4 种不同保存方法的海绵基因组的 DNA 测定结果。从提取方法方面考虑,

如表 1, 对于同种海绵 3 种方法都能提取海绵基因组 DNA。山海绵 DNA 的浓度明显高于白枝海绵。山海绵各种提取方法获得的 DNA 的量差异不显著 ($P>0.05$), 而白枝海绵高盐法提取的 DNA 的浓度显著高于 CTAB 法 ($P<0.05$)。

从保存方法方面考虑, 由表 1 可知, 白枝海绵和

山海绵的 3 种提取方法结果均显示, 乙醇固定保存的海绵样品 DNA 得率显著高于其他 3 种方法。对于山海绵, 冰冻后风干的样品浓度显著高于乙醇固定后风干的样品, 冰冻的样品 DNA 得率最低, 而对于白枝海绵冰冻后风干、乙醇固定后风干、 -20°C 冰冻 3 种保存方法的 DNA 得率间无显著差异 ($P>0.05$)。

表 1 3 种方法提取的 4 种不同保存方法的海绵基因组的 DNA 测定结果

Tab. 1 Assessment of sponge genomic DNA that preserved in four ways using three extracting methods

提取方法	样品	白枝海绵			山海绵		
		质量浓度 (ng/ μL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	质量浓度 (ng/ μL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
CTAB 法	冰冻	18.5 \pm 19.0	1.80~1.94	1.76~2.16	108.9 \pm 28.6	1.93~1.94	1.81~1.96
	乙醇	103.1 \pm 34.5	2.03~2.06	1.88~2.43	799.9 \pm 24.2	1.95~1.98	2.00~2.08
	冰冻风干	100.5 \pm 40.1	1.78~1.95	1.24~2.00	412.8 \pm 37.8	1.89~1.91	2.06~2.16
	乙醇风干	36.5 \pm 17.1	1.90~2.07	1.56~2.24	226.0 \pm 44.4	1.97~2.02	1.85~2.04
	平均值	64.7 \pm 46.0	1.94 \pm 0.10	1.86 \pm 0.37	386.9 \pm 275.2	1.95 \pm 0.04	1.99 \pm 0.11
SDS 酚—氯仿	冰冻	78.8 \pm 12.0	1.73~2.13	1.63~2.16	91.4 \pm 24.3	1.89~1.94	1.60~2.11
	乙醇	145.9 \pm 13.7	1.90~2.08	1.52~2.01	394.8 \pm 36.3	1.95~2.01	2.14~2.25
	冰冻风干	80.8 \pm 16.6	1.91~2.08	1.76~2.37	380.6 \pm 100.6	1.98~2.05	2.10~2.31
	乙醇风干	71.6 \pm 11.0	2.00~2.09	1.71~2.54	279.4 \pm 62.9	1.87~1.97	2.14~2.28
	平均值	94.3 \pm 33.4	1.99 \pm 0.11	1.99 \pm 0.31	286.6 \pm 137.5	1.96 \pm 0.05	2.10 \pm 0.20
SDS 高盐法	冰冻	108.3 \pm 14.6	1.81~2.09	1.52~2.63	128.2 \pm 43.5	1.93~1.98	1.80~2.05
	乙醇	202.0 \pm 56.7	2.12~2.15	2.31~2.45	368.3 \pm 53.6	1.65~1.90	0.97~1.41
	冰冻风干	108.0 \pm 16.3	1.85~1.94	1.45~2.23	368.3 \pm 39.7	1.90~2.00	1.34~2.25
	乙醇风干	100.3 \pm 23.0	2.05~2.13	1.98~2.43	229.4 \pm 141.9	1.87~2.06	1.24~2.05
	平均值	129.7 \pm 51.8	2.12 \pm 0.12	2.14 \pm 0.39	273.5 \pm 127.9	1.92 \pm 0.11	1.73 \pm 0.42

2.2 DNA 的凝胶电泳检测

取 4 μL 基因组 DNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳图谱见图 1~图 3。从图中可知, 3 种方法均能获得大小约为 10 kb 的 DNA, 但有少量的拖带, 说明样品中尚有不同程度的降解。山海绵的 DNA 产量总体比白枝海绵的产量高。对白枝海绵而言, 冰冻后风干的保存方法 DNA 的条带最亮; 对硅质海绵而言,

冰冻保存的硅质海绵的条带比其他条带亮。

2.3 COI-PCR 扩增检测

以提取的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 产物电泳图谱如图 4 所示。从图谱中可以看出电泳条带单一, 大小与目标片段一致。这说明提取的基因组 DNA 具有较好的质量, 可以适用于 PCR 扩增反应。

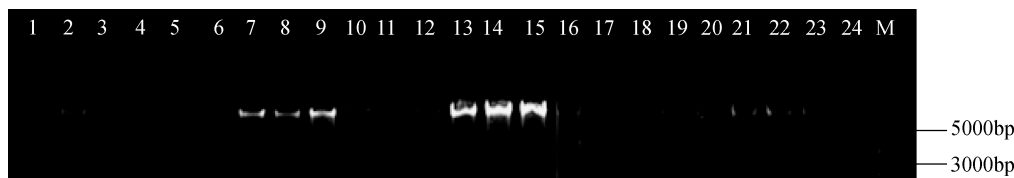


图 1 CTAB 法提取的不同保存方法的海绵基因组 DNA 电泳图

Fig. 1 Genomic DNA extraction of sponge preserved in different ways using the method of CTAB

1-12. 白枝海绵(1-3, 4-6, 7-9, 10-12 分别是 -20°C 冰冻保存, 乙醇保存, 冰冻后风干, 乙醇固定后风干保存样品); 13-24. 山海绵(13-15, 16-18, 19-21, 21-24 分别是 -20°C 冰冻保存, 乙醇保存, 冰冻后风干, 乙醇固定后风干保存样品); M. DNA 标记(图 2, 图 3 同)

1-12. *Leucosoleniidae* sp.(1-3, 4-6, 7-9, 10-12. indicate sponge samples respectively preserved with -20°C freezing, ethanol fixed, air drying and dried after ethanol fixed); 13-24. *Mycale* sp.(13-15, 16-18, 19-21, 22-24. indicate sponge samples respectively preserved with -20°C freezing, ethanol fixed, air drying and dried after ethanol fixed); M. DNA marker(The same as Fig.2, Fig.3)

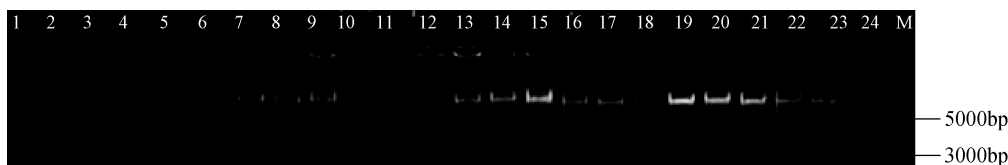


图 2 酚-氯仿法提取的不同保存方法的海绵基因组 DNA 电泳图

Fig. 2 Genomic DNA extraction of sponge preserved in different ways using the method of Phenol – Chloroform



图 3 高盐法提取的不同保存方法的海绵基因组 DNA 电泳图

Fig. 3 Genomic DNA extraction of sponge preserved in different ways using the method of salt-extraction of high concentration



图 4 PCR 扩增电泳图谱

Fig. 4 Electrophoreses diagram of sponge PCR amplification results

1-12. 山海绵; 13-24. 白枝海绵(1-3, 13-15 为 -20°C 冰冻保存样品; 4-6, 16-18 为乙醇保存样品; 7-9, 19-21 为冰冻后风干保存样品; 10-12, 22-24 为乙醇固定后风干保存样品); M. DNA 标记

1-12. *Mycale* sp.; 13-24. *Leucosoleniidae* sp.(1-3, 13-15. samples preserved with -20°C freezing; 4-6, 16-18. samples preserved with ethanol fixed; 7-9, 19-21. samples preserved with air drying; 10-12, 22-24. samples preserved with dried after ethanol fixed); M. DNA marker

3 讨论与结论

海绵体内含有许多共生细菌、藻类、虾和线虫等,这使得所提取的基因组 DNA 中混有杂质 DNA,作者在剪取海绵组织前需用无菌水仔细地漂洗几遍,同时尽量挑选其出水孔附近的组织,降低 DNA 被污染的概率。本实验中 3 种提取方法均显示白枝海绵 DNA 的得率显著低于山海绵 DNA 的得率,即采用同种方法提取 DNA,白枝海绵的得率小于山海绵。这可能与不同海绵的骨针含量不同有关。Riitzler 等^[8]研究了加勒比海的 10 种硅质海绵其骨针含量在 3.8%~67.1%,表明海绵种类不同其骨针含量差异较大。测得本实验中的硅质山海绵骨针平均含量为 52.5%,钙质白枝海绵骨针平均含量为 80.9%(课题组数据,未发表)。钙质海绵骨针所占的比重明显高于硅质海绵,即相同质量的钙质海绵中有机部分的含量明显低于硅质海绵。

酚氯仿法和 CTAB 法是目前国内外提取海绵 DNA 较常用的方法,由于其均含有酚氯仿抽提的步骤,在实验过程中需要做到防毒和防腐蚀措施。高盐法在国内外尚未见运用于海绵 DNA 的提取,其操作

步骤简便,用较短的时间也能获得较高的 DNA 产率。实验结果表明 3 种方法都能有效提取海绵基因组 DNA,山海绵各提取方法之间无差异,而白枝海绵采用高盐法提取的 DNA 产率较高。各种方法提取的基因组 DNA 纯度之间差别大, DNA 的吸光值 A_{260}/A_{280} 在 1.60~2.15 之间波动,均可能含有不同程度的 RNA 和蛋白质或苯酚。且用各方法所提取的 DNA 作为模板所获得 PCR 扩增产物也没有显著的差异。目前国内外较多的运用试剂盒法提取海绵组织 DNA,实验中作者也运用动物组织 DNA 提取试剂盒进行海绵组织 DNA 的提取,但由于海绵含有骨针,在消化的过程中很难消化完全,较容易堵塞柱子,提取的 DNA 量偏少,但一部分样品能进行后续的 PCR 扩增(数据未列出)。对于样品较多的实验,考虑到成本、效率和提取结果的稳定性,不建议运用试剂盒,而建议采用高盐法进行海绵基因组 DNA 的提取。

从表 1 中还可以发现高盐法提取的山海绵 A_{260}/A_{230} 的平均值明显低于 CTAB 法和酚氯仿法,表明其纯度较低,而白枝海绵各种提取方法纯度无显著差异($P>0.05$)。推测可能由于山海绵色素含量较高,高盐法由于没有使用有机相进行抽提,色素残余较

多,且提取过程中 DNA 需用 -20°C 沉淀 1 h,容易导致杂质与 DNA 共沉淀,使得高盐法提取的 DNA 沉淀为黄褐色,而运用 CTAB 法和酚氯仿法提取的为白色,而白枝海绵为白色,色素含量少,各提取方法纯度无显著差异。综合 PCR 的扩增结果,新鲜的有颜色的海绵运用 CTAB 法所获得的 DNA 质量最高。但对于乙醇固定后的样本,由于其色素已褪去,所以运用高盐法提取的 DNA 沉淀中色素杂质较少,其纯度较高。有文献证明 DNA 浓度在 $50\text{ ng}/\mu\text{L}$ 左右时,电泳效果都比较理想^[9],说明并不是浓度越高条带越亮。从图 1~图 3 中作者发觉冰冻后风干保存的钙质海绵条带要比其他条带亮,冰冻保存的硅质海绵的条带比其他条带亮。推测由于其 DNA 浓度刚好在跑出的电泳图谱条带较亮的范围。

乙醇和福尔马林是生物学上常用的固定剂,在海产动物研究中,杨文新^[10]、刘保忠^[11]、张海琪^[12]等的研究表明乙醇是海洋动物一种切实可行的固定剂,并且用乙醇作为固定剂比福尔马林作为固定剂的样品其 DNA 提取要快速、简易和有效。同时作者对保存多年的福尔马林固定海绵样品和福尔马林固定风干样品进行了 DNA 提取实验,得到的 DNA 产量极低且无法进行 PCR 扩增,通过预实验我们排除了选用福尔马林作为固定剂。本实验结果表明乙醇是海绵最优的固定剂,直接风干和乙醇固定风干的效果基本相同。在野外采样中由于乙醇固定的海绵样品无法进行航海航空运输,所以实验中发现野外采集样品后可先进行乙醇固定然后再风干,安全运输到实验室后在添加乙醇。海绵经乙醇固定后, DNA 降解的风险大大降低,风干后其 DNA 降解程度不大,最后再经乙醇固定,增加了后续实验的同步性和可比性,适于大量样本的固定和提取,尤其适用于远距离异地取材,避免了保存鲜活材料和冷冻材料的麻烦。在实际保存过程中应该注意用 96%乙醇固定 24 h 之后需要更换新鲜的乙醇,否则会出现絮状沉淀,不利于样品长久保存。

综上,新鲜海绵样品, DNA 纯度要求较高时,建议采用 CTAB 法。乙醇固定后的海绵样品,高盐法简便易行,是一种有效的、大量提取海绵基因组 DNA 的好方法,虽然其纯度相对较低,但能满足一般实验要求。乙醇固定保存的样品所提取基因组 DNA 的

浓度最高,是长久保存海绵样品的一种好方法。对于远距离异地取材则可采用冰冻后风干,等样品安全到达实验室后再添加乙醇的方法。

参考文献:

- [1] Hooper J N A. Coral reef sponges of the Sahul Shelf—a case for habitat preservation[J]. *Memoirs of the Queensland Museum*, 1994, 36: 93-106.
- [2] 张骁英,赵权宇,薛松,等. 海绵生物活性物质及海绵细胞离体培养[J]. *生物工程学报*, 2002, 18(1):10-15.
- [3] Wu W, Yang A, Janussen D, et al. Hexactinellid sponges from the early cambrian black shale of south Anhui, China[J]. *Paleont*, 2005, 79(6):1043-1051.
- [4] Werner E G M, 王晓红, 曾令森, 等. 海绵动物的演化意义及其生物硅的仿生应用[J]. *科学通报*, 2007, 52(12): 1372-1378.
- [5] 付晚涛, 张卫, 吴益春, 等. 繁茂膜海绵生物修复养殖水体中病原体的初步研究[J]. *海洋环境科学*, 2007, 26(3): 217-220.
- [6] Custódio M R, Lôbo-Hajdu G, Hajdu E. Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability[M]. Rio de Janeiro : Museu Nacional, 2007: 555-560.
- [7] Meyer C P, Geller J B , Paulay G. Fine scale endemism on coral reefs: Archipelagic differentiation in turbinid gastropods[J]. *Evolution*, 2005, 59: 113-125.
- [8] Riitzler K, Macintyre I G. Siliceous sponge spicules in coral reef sediments[J]. *Marine Biology*, 1978, 49: 147-159.
- [9] 严琳玲, 赵琼玲, 白昌军, 等. 基于改进 CTAB 法提取空间诱变柱花草总 DNA 研究[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(8): 3465-3467.
- [10] 杨文新, 苏秀榕, 杨治彪, 等. 鲍基因组 DNA 提取新方法研究[J]. *水产科学*, 2003, 22(1):14-16.
- [11] 刘保忠, 宋林生, 相建海. 海湾扇贝样品不同保存条件下 DNA 的提取及 RAPD 扩增比较[J]. *海洋科学*, 2001, 25(3): 51-53.
- [12] 张海琪, 薛良义, 李明云, 等. 不同保存方法的大黄鱼肌肉样品基因组 DNA 提取及 RAPD 分析[J]. *台湾海峡*, 2002, 21(3): 296-299.

Comparison of samples preservation and DNA extraction of sponges

GONG Lin, OU Hui-long, WANG De-xiang, KE Cai-huan, LI Wen-yu

(College of Ocean and Earth Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Mar.,25,2012

Key words: Sponge; genomic DNA extraction; preservation

Abstract: In order to build the optional method of sponge preservation and a safe, fast and effective genomic DNA extraction method, different ways of DNA extraction and preservation were studied in this paper. Two different species, *Mycale* sp. and *Leucosoleniidae* sp., and four different ways of preservation including -20°C freezing, ethanol fixation, air drying and ethanol fixation then drying were tested,. Three methods for DNA extraction including cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), Phenol – Chloroform and high salt extraction were examined. The results show that each method can obtain high quality genomic DNA. But considering economical, enviromental friendly and convenient factors, the method of high salt extraction was the best one among the three methods of DNA extraction. The amount and purity of DNA isolated from ethanol fixed specimens were the best. In a word, the ethanol fixed is the best method of sponge preservation.

(本文编辑: 谭雪静)