

不同保存条件下中华哲水蚤基因组 DNA 提取的比较

方旅平, 林元烧, 曹文清

(厦门大学 海洋与环境学院 福建 厦门 361005)

摘要: 以采自厦门港的中华哲水蚤 (*Calanus sinicus*) 为对象, 研究多种保存条件对中华哲水蚤基因组 DNA 提取的影响。结果表明, 除 5% 福尔马林保存的样品没有提取到 DNA 之外, 其余样品均能成功提取出基因组 DNA; 以该 DNA 为模板通过相应引物成功扩增出线粒体 DNA COI 基因片段。其中无水乙醇保存样品提取可靠的基因组 DNA 方法的建立, 为野外样品保存工作提供了一个简便、经济的途径。

关键词: 中华哲水蚤 (*Calanus sinicus*); 基因组 DNA 提取; 保存方法

中图分类号: Q33; Q959.223.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2005)02-0001-04

进入 20 世纪 90 年代以来, 分子生物学技术引入浮游动物遗传学的研究已受到广泛关注, 此类研究对 DNA 质量的要求较高。已有的以 DNA 为对象的研究中大多数所采用的样品为活体样品或冷冻样品, 但是在野外工作尤其在海上这两者样品保存很难实现, 因此一种简便可行, 且又能满足 DNA 水平研究分析的样品保存方法相当重要。针对该问题, 作者以中华哲水蚤 (*Calanus sinicus*) 为研究对象, 采用 95% 乙醇 (4℃)、100% 乙醇 (4℃)、5% 福尔马林 (4℃)、TE 溶液 (-80℃) 4 种保存方法对其进行处理 (其中 95% 乙醇与 100% 乙醇保存时间相差约为 1a), 提取基因组 DNA, 通过凝胶电泳、EB 染色对所提取的基因组 DNA 进行检测, 探讨了不同样品处理方法及保存时间对 DNA 提取的影响。本研究结果对于其它浮游小型甲壳类动物的分子遗传学的研究奠定了良好基础。

1 材料与与方法

1.1 样品采集

样品采集地点: 厦门港, 2001 年 12 月 ~ 2003 年 1 月。采集方法: 采用浮游生物大型网水平拖取。

1.2 样品处理及保存

室内处理: 从采集到的海洋动物样品中分选出中华哲水蚤, 置于过滤海水 (砂滤) 中暂养过夜。

种类鉴定: 以形态学为依据, 利用解剖镜进行整体鉴定。

样品保存: 首先将中华哲水蚤在解剖镜下清洁体表附着物, 再利用多种方法对样品进行保存。值得注意的是固定的样品特别是单只冷冻保存的样品, 在保存之前用灭菌纯水进行多次充分的洗涤。

1.3 DNA 基因组提取

取出保存的样品, 若是无水乙醇保存的样品首先利用梯度稀释浸泡 (每个梯度浸泡 1h) 的方法基本去除样品中的乙醇, 其稀释梯度为 60%、30%、10% 和灭菌纯水, 4℃ 过夜, 再将样品吸干, 加入 TE 溶液 (pH 8.0) 100 μL; 若为福尔马林保存样品, 首先通过梯度稀释浸泡的方法去除样品中的福尔马林, 其稀释梯度同上, 再将样品吸干, 加入 TE 溶液 (pH 8.0) 100 μL; 若为直接单只无溶液冷冻的样品, 则直接加入 TE 溶液 (pH 8.0) 100 μL; 若为单只 TE 溶液 (冷冻) 保存则无需此过程。

收稿日期: 2003-09-26; 修回日期: 2004-02-26

基金项目: 国家自然科学基金基础研究重大课题资助项目 (G1999043708)

作者简介: 方旅平 (1978-), 女, 浙江衢州人, 硕士, 助理工程师, 研究方向: 海洋浮游动物生理生态、海洋分子生态学, 电话: 0592-2189433, E-mail: flpfang@xmu.edu.cn

破碎样品,加入 10%SDS 溶液(1:10),蛋白酶 K (终浓度为 1g/L) 55℃ 水浴消化 3~4h。用 TE 溶液补至总体积至 350 μL,再加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混合溶液,混匀。11000 r/min 离心 6 min,吸取上清。加入等体积异丙醇,1/10 体积 NaAC,混匀。-80℃ 沉淀 1h。12000 r/min 离心 15 min,倒出上清液。加入 70%乙醇 500 μL,12000 r/min 离心 5 min,倒出上清液。晾干,加入 30 μL TE 溶液(pH 8.0)溶解 DNA,取出 5 μL 进行琼脂糖凝胶(0.8%)电泳,EB 溶液染色,凝胶成像系统拍照以确定提取是否成功。提取的 DNA 基因组或进行 PCR 扩增,或置 -20℃ 下保存备用。

1.4 目的基因片段 mtDNA COI 的扩增及纯化引物:

正向: LCO-1490 5' - GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G - 3'

反向: HCO-2198 5' - TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA - 3'

PCR 扩增程序:

(1) 94℃: 5 min; (2) 94℃: 1 min; (3) 42℃: 2 min; (4) 72℃: 3 min; (5) 72℃: 10 min;

其中(4)至(2)共循环 40 次

PCR 反应体系: 总体积为 25 μL, 具体如下:

缓冲液(10×): 2.5 μL

Mg²⁺(25mmol/L): 1.0 μL

LCO-1490(60 μmol/L): 0.5 μL

HCO-2198(60 μmol/L): 0.5 μL

dNTP(各 2.5mmol/L): 0.25 μL

Taq DNA 聚合酶(5U/μL): 0.15 μL

DNA 模板: 2 μL(20ng)

H₂O: 18.1 μL

PCR 产物使用小量胶回收试剂盒(华粤公司)进行纯化。1%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,取象。

2 结果

2.1 DNA 提取结果

图 1 为不同保存方法中华哲水蚤 DNA 提取后的检测图,其中,取模板母液 5 μL,加入 1 μL loading buffer(6×),0.8%琼脂糖电泳,EB 染色,全自动凝胶成像分析系统拍照。

从图 1 中可以明显看出使用福尔马林保存的样品无法提取出 DNA 或者极难以提取出 DNA,而其它

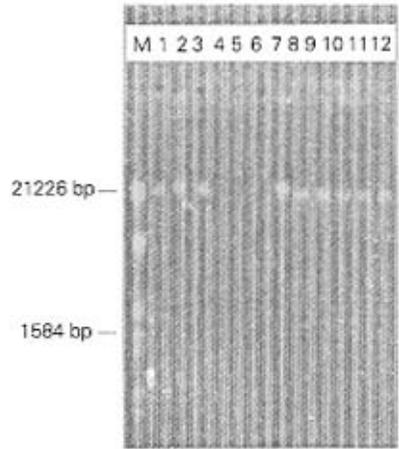


图 1 不同保存方法中华哲水蚤基因组 DNA 提取的检测
Fig. 1 Genomic DNA extraction of *Calanus sinicus* preserved in different ways

泳道从左向右: M, DNA 标记(Lambda DNA/EcoRI + Hind III Marker, 3); 1~3. TE 溶液(-80℃)保存的样品; 4~6. 5%福尔马林(4℃)保存的样品; 7~9. 95%乙醇(4℃)保存(2001年12月固定); 10~12. 100%乙醇(4℃)保存(2003年1月固定)

Lanes from left to right: Lane M. DNA marker(Lambda DNA/EcoRI + Hind III Marker, 3); lane 1~3. samples preserved in TE solution(-80℃); 4~6. preserved in 5% of formalin solution; 7~9. preserved in 95% ethanol(fixed in Dec, 2001); 10~12. preserved in 100% ethanol(fixed in Jan, 2003)

保存方法下的中华哲水蚤均可提取出所需 DNA 只是提取量有所差异,特别是通过高浓度乙醇固定的样本虽然固定时间达到一年以上但对 DNA 提取量的影响很小。

2.2 PCR 扩增结果

以提取出 DNA 的 9 个个体的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,并将其产物进行回收纯化,1.0%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,拍照(图 2)。

从图 2 中可看出,以本实验方法所提取出的 3 种不同保存条件下中华哲水蚤基因组 DNA 为模板可成功扩增出所需的基因片段。

3 讨论

以本实验的提取方法无法从福尔马林保存的样品中提取出 DNA,结果如图 1 所示; 4~6 泳道无法观察到 DNA 的条带。这与刘保忠等人的对海湾扇贝(*Argopecten irradians*)样品的研究结果相似^[1]。影响因

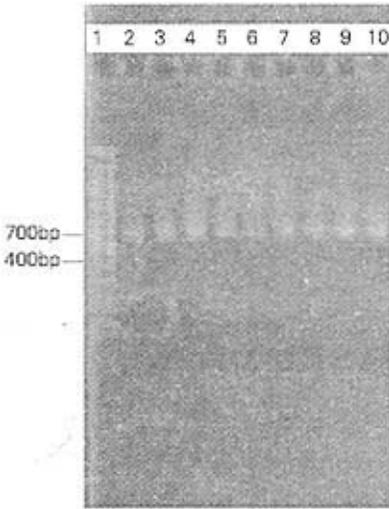


图2 PCR扩增产物回收电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis diagram of purified PCR products

1泳道:DNA标记(GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus); 2~4泳道:TE(-80 °C)保存; 5~7泳道:95%乙醇(4 °C)保存(2001年12月固定); 8~10泳道:100%乙醇(4 °C)保存(2003年1月固定)

Lane 1: DNA marker(GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus); lane 2~4: samples preserved in TE solution(-80 °C); 5~7: preserved in 95% ethanol(fixed in Dec, 2001); 8~10: preserved in 100% ethanol(fixed in Jan, 2003)

素有以下几种可能:一是没有将样品中的甲醛去除干净,甲醛抑制了蛋白酶K的活性;二是由于该样品已被福尔马林固定1a以上,固定样品的DNA分子产生交联作用, DNA抽提与蛋白质等产生共沉淀进入酚相;三是甲醛氧化后形成的甲酸对DNA有较强的降解作用^[1]。

采用一般的方法难以有效地提取福尔马林保存样本的基因组DNA,因此在以后的实验中应针对其干扰因素改进DNA提取方法特别是固定后样品提取前的处理方法及破壁消化方法尤为重要。例如徐来祥等人^[2]成功提取了福尔马林保存的动物标本基因组DNA,认为:提取标本基因组DNA之前的预处理,目的在于去除标本组织中的福尔马林的各种成分,该步骤是提取标本DNA成败的关键。因此该文作者先取浸泡于福尔马林中的大鼠肝脏或日本鳗鲡肌肉适量,用PBS溶液冲洗,放在灭菌的吸水纸上将其擦干,在超净工作台用无菌剪刀将材料剪成小块,放入PBS液浸泡12~24h;然后转入70%的乙醇中处理12~

24h。依次进行梯度乙醇中处理:80%乙醇,2h,重复一次;90%乙醇,2h,重复一次;95%乙醇,2h,重复一次;100%乙醇,1h,重复一次。然后将材料放入1/2倍的PBS溶液中浸泡12h,其间更换一次溶液。此外在消化过程中还提到视样品的消化效果可以重复加入标准量的1/2倍蛋白酶K进行消化。不过,提高蛋白酶K的浓度是否有效还有待研究,因为在王义权等^[3]对蛇的研究中曾尝试延长浸泡时间和采用双倍蛋白酶K的用量,都没有取得满意结果。由于本实验及刘保忠等、王义权等的实验中在浸泡时所采取的都仅是利用灭菌纯水浸泡,且只通过将浸泡时间延长等方法,因此刘来祥等人的实验中所采取的特别的预处理方法值得注意及采纳应用。通过较好的预处理后,徐来祥等人的基因组DNA的提取方法为参考 Sambrook 等人^[4]的方法的一种改进的酚氯仿抽提法,酚氯仿抽提最后一次的上清液移入透析袋中透析; -20 °C环境中沉淀DNA基因组20 min为宜。但是由于实验对象不同(如个体大小差异,样品生化组成差异,等等),因此,刘来祥等人的实验方法还有待于进一步的探索应用,以达到在海洋浮游动物特别是桡足类研究中获得满意的实验效果。

此外,另两种固定液保存方法[TE溶液保存, -80 °C存放;高浓度乙醇(95%, 100%保存), 4 °C存放]如果单从条带的亮度来判断,通过TE溶液保存和高浓度乙醇保存后所提取的DNA的量相差不多,但其中以95%乙醇4 °C保存的效果最好。而同种保存方法提取出来的DNA条带的亮度也并不完全一致,如泳道1~3为TE溶液浸泡, -80 °C保存, 2号明显比其他的亮,这是因为样品保存时有多种不确定的干扰因素,如个体大小,个体是否完整,每单位固定液体中存有的样本个体数量等等,并且在提取过程中也不可避免的存在操作上的误差。

再以同种固定液(高浓度乙醇)两种保存时间长度来看,固定1a以上的样本与短期固定的样本所提取的DNA量相差不多,而且固定一年以上的样本提取量反而稍多一些。这种结果的出现除了上述的影响因素以外,95%的乙醇是否较之100%乙醇更适合于固定样本及后续实验的进行还有待于进一步的实验证明。高浓度乙醇保存作为野外工作最方便、最常用的较为经济的保存方法,是适合于本实验的一种保存方法。刘保忠等人^[1]的实验结果中也提出乙醇固定的样品完全可以得到质量很好的DNA样品。关键在

于固定样品时要小心操作,不要使桡足类个体破损,保证足够的乙醇用量,并要定期更换固定液。这样有利于之后 DNA 的提取。

总的来说,除了福尔马林保存,其余三种保存方法对 DNA 基因组的提取影响差异不大,均能通过相应引物扩增出所需的基因片段。有关该基因片段序列及其分析将另文报道。

参考文献:

[1] 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 - 52.

[2] 徐来祥,张知彬,宋铭晶,等. 福尔马林保存的动物标本基因组 DNA 的提取方法[J]. 动物学报,2002, 48 (2): 264 - 269.

[3] 王义权,周开亚,徐珞珊,等. 不同固定剂保存动物组织标本对 RAPD 反应的影响[J]. 动物学杂志, 1999, 34 (1): 33 - 37.

[4] Sambrook J, Fritsch E F, Mains T. 金冬雁,黎孟枫译. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京:科学出版社,1999.

Genomic DNA extraction of *Calanus sinicus* different preservations

FANG Lu - ping, LIN Yuan - shao, CAO Wen - qing

(College of Oceanography and Environment Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Sep., 26, 2003

Key words: *Calanus sinicus*; genomic DNA extraction; preservation

Abstract: Extraction of genomic DNA from preserved specimen is a key step to study phylogeny and molecular genetics of zooplankton. This paper compared the effect of different preservations on extraction of genomic DNA adopted a small crustacean copepod, *Calanus sinicus*, collected from Xiamen waters. Except the specimen fixed in 5% of formalin solution, genomic DNA was well extracted by using the specimen fixed in 95% ethanol and placed at 4 °C, 100% ethanol at 4 °C and TE solution at - 80 °C. The genomic DNA can be used as a template for PCR process of mtCOI gene fragment.

(本文编辑:刘珊珊)