

牛基因组 DNA 两种提取方法的比较研究

程金华, 朱化彬*, 王 栋*, 郝海生, 杨 波

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094)

摘 要: 研究哺乳动物基因组 DNA 的水煮抽提法, 并将传统的酚仿抽提法和水煮法进行比较, 水煮法即通过对细胞的煮沸和冷却, 使细胞破裂、蛋白变性, 从而获得用于 PCR 扩增的模板 DNA 的方法。通过电泳分析和 PCR 扩增检测了所提取基因组 DNA 的完整性、可行性。检测时采用 3 对引物对 2 种方法提取的 DNA 进行了 PCR 扩增, 同时对冷冻保存的基因组 DNA 也进行了扩增检测。结果表明: 水煮法提取基因组 DNA 是一种快速、简便、经济、高效的方法。

关键词: 牛; 基因组 DNA; 提取; 酚仿抽提法; 水煮抽提法

中图分类号: S826.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)09-0874-04

Comparative Study of Two Cattle Genomic DNA Extraction Methods

CHENG Jin-hua, ZHU Hua-bin*, WANG Dong*, HAO Hai-sheng, YANG Bo

(*Institute of Animal Science,*

Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: The genomic DNA extraction method, cooking extraction method in water, was studied and the comparison with the traditional phenol and chloroform method was done. The cooking extraction method was the method from which genomic DNA was obtained when the cells were broken and proteins were denatured after the cells were cooked and cooled quickly. The feasibility and integrality of the extracted genomic DNA were detected through agrose gel electrophoresis and PCR amplification. During detection, the PCR amplification of the extracted genomic DNA was done with 3 pairs of primers and the genomic DNA was also amplified after preserved at -20°C . The analysis result indicated that cooking extraction method is a quick, simple, economic and efficient method for genomic DNA extraction.

Key words: bovine; genomic DNA; extraction; phenol and chloroform method; cooking extraction method

PCR 方法扩增目标基因已经成为分子生物学检测的一个重要环节, 基因组 DNA 的提取方法及 DNA 模板的质量对检测过程和检测效果有很大影响。同时对于遗传分析来说, 基因组 DNA 的提取是一个耗时、费力的过程, 一个完整的基因组 DNA 提取过程包括样品洗涤、蛋白酶消化、酚仿有机溶剂的抽提、DNA 的沉淀、重溶等步骤^[1], 其中一些苯

酚、氯仿等化学试剂还对试验人员的身体、环境有一定的伤害和污染。尤其是在法医鉴定等特殊行业中, 当样品来源很少、检测时间很紧张时, 高效、快速地提取血样(组织样)DNA 模板尤为重要。本研究对哺乳动物基因组的提取进行了探索, 摸索出一种新型的基因组 DNA 提取方法, 可以在血样、精液及组织样品很少量的情况下得到用于检测的足够的

收稿日期: 2005-12-23

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划专项经费资助(2001AA243011)

作者简介: 程金华(1967-), 安徽怀宁人, 硕士, 主要从事动物遗传繁育方面工作

* 通讯作者: 朱化彬, E-mail: huabinzhu@yahoo.com.cn; 王 栋, E-mail: dongwang@iascass.net.cn

DNA 模板,并且缩短了提取基因组 DNA 的时间,降低了成本,避免了伤害和污染,提高了工作效率。

1 材料与方法

1.1 血液样品的采集

颈静脉采集中国农业科学院北京畜牧兽医研究所试验牛场荷斯坦奶牛(2♂,2♀)血液样品 4 mL,ACD 抗凝,-20℃冻存备用。

1.2 PCR 扩增所用模板的制备

采用酚仿抽提法和水煮法两种方法制备血样 DNA 模板。

1.2.1 传统的酚仿抽提法制备牛血样 DNA 模板方法参照文献[1]。

1.2.2 水煮法提取奶牛血样 DNA 模板 取 100~120 μL 抗凝血于 1.5 mL 离心管中,加 1 mL 双蒸水,充分混匀,冰浴 5~10 min 后 12 000 r/min 离心 1 min,弃上清,向下层沉淀中加入 100 μL 双蒸水使之充分悬浮,煮沸 10 min,立即冰浴 5 min,以 12 000 r/min 离心 5 min,取上清于另一离心管中即可用于 PCR 检测,或于-20℃保存备用。

1.3 引物

采用奶牛 BOV97M 引物和牛微卫星 1.715 引物^[2],又根据 Zfy 序列[gi:17933058]设计了长扩增产物的引物 Zfy846。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

BOV97M 引物序列为:上游:5'-GATCAC-TATACATACACCACT-3';

下游:5'-GCTATGCTAACACAAATTCTG-3',扩增长度为 141 bp。

Bovine 1.715 引物序列为:上游:5'-TCGT-CAGAAACCGCACACTG-3';

下游:5'-TGGAAGCAAAGAACCCCGCT-3',扩增长度为 216 bp。

Zfy846 引物序列为:上游:5'-TTCCGTAAG-GTGTGTGAT-3';下游:5'-CTTTTTGGTAAG-GTGTCAG-3'。扩增长度为 846 bp

1.4 PCR 反应体系及扩增条件

采用 20 μL 的 PCR 反应体系,其中 *Taq* 酶 1.2 U(鼎国生物)、Tris-HCl 20 mmol/L、(NH₄)₂SO₄ 10 mmol/L、KCl 10 mmol/L、Triton X-100 0.1%、MgCl₂ 2 mmol/L、dNTP(华美)125 μmol/L、各引物浓度均为 120 pmol/L、模板 DNA 均为 2 μL。

PCR 反应循环程序:95℃预变性 4 min;94℃

变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,30 循环;72℃延伸 5 min,最后 4℃保存。

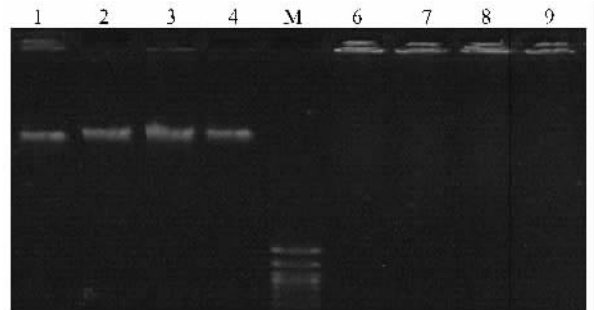
1.5 琼脂糖凝胶电泳检测

取两种方法提取到的基因组 DNA 样品每样品各 5 μL,加入 2 μL 琼脂糖上样缓冲液,在 0.7% 的琼脂糖凝胶同时上样电泳,分子量标记(鼎国 B003-2)5 μL,SYBRGreen I 荧光染料染色;PCR 扩增产物加入 5 μL,在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳,电泳缓冲液为 0.5×TBE,电压为 160V,电泳 20 min 后,紫外透射仪下观察 PCR 扩增结果。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 抽提结果的检测

传统的酚仿抽提法抽提到的基因组 DNA 和水煮法提取的基因组 DNA 同时进行琼脂糖凝胶电泳,检测的结果见图 1。



1~4. 酚仿抽提;6~9. 水煮法抽提;M. 分子量标记,最亮的条带为 1.5 kb

1-4. Phenole and chloroform extraction; 6-9. Results of cooking extraction method in water; M. DNA marker B003-2. The lightest band is 1.5 kb.

图 1 比较两种方法提取的基因组

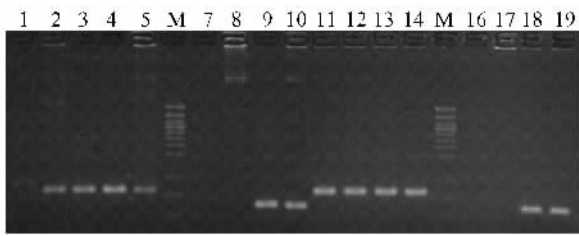
Fig. 1 Comparison of two genomic DNA extraction methods

结果显示,在 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳条件下,经过一段时间的电泳后,酚仿抽提法得到的基因组 DNA 已经在凝胶中走了很长一段距离,并出现了整齐的 DNA 条带,而水煮抽提法提取出的基因组 DNA 没有距离的改变,仍然停留在点样孔中,这可能是因为水煮法进行基因组 DNA 提取时,没有蛋白酶 K 的消化过程,基因组 DNA 没有与组蛋白等相关成分完全分离,使水煮法提取到的 DNA 不够彻底。结果这种大的 DNA 蛋白复合体在电场中不能够穿过琼脂糖凝胶这一分子筛,而滞留在点样孔中。但从染色结果可以看出点样孔中基因组 DNA

的存在。

2.2 PCR检测基因组DNA

为检测水煮提取法的效果,同时对两种方法获得的基因组DNA进行PCR扩增,见图2。



1. 阴性对照;2~5、7~10. 酚仿抽提基因组DNA;11~14、16~19. 水煮法抽提基因组DNA;其中2~5、11~14. 引物Bovine 1.715的扩增;7~10、16~19. 引物BOV97M的扩增;2、3、7、8、11、12、16、17. 母牛样品;4、5、9、10、13、14、18、19. 公牛样品;M. 分子量标记B003-2

1. Negative control;2-5,7-10. PCR results of genomic DNA from phenol extraction;11-14,16-19. Results of genomic DNA from cooking method in water;2-5,11-14. PCR results of primer Bovine 1.715;7-10,16-19. PCR results of primer BOV97M;2,3,7,8,11,12,16,17. Female samples;4,5,9,10,13,14,18,19. Male samples;M. DNA molecular marker

图2 PCR扩增两种方法提取的基因组

Fig. 2 PCR results of two genomic DNA extraction methods

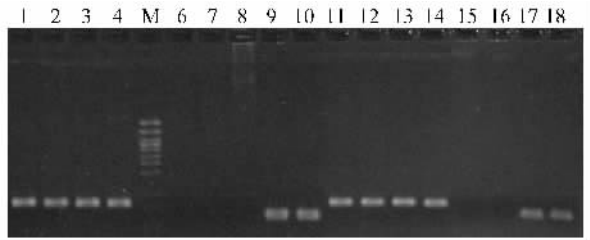
结果表明,两种方法提取的基因组DNA都得到了相应大小的PCR目标产物,两种抽提法的目标条带没有区别。酚仿抽提法得到的基因组DNA的扩增产物存在有一些非特异性产物,而水煮法抽提基因组DNA的PCR结果却没有非特异性产物。

2.3 两种方法提取的基因组DNA冻存后的扩增检测

将两种方法抽提到的基因组DNA在 -20°C 冷冻保存1个月以后,采用同样的引物进行PCR扩增检测,见图3。结果显示,2种方法提取的DNA扩增效果仍较好。说明像传统抽提法一样,水煮法提取到的基因组DNA也能够长期冷冻保存。

2.4 -20°C 冻存1月后两种方法提取的基因组DNA完整性的检测

为了检测所提取基因组DNA的完整性,根据公牛Zfy序列[gi:17933058]设计了长扩增产物引物Zfy846,对2种方法提取的基因组DNA进行了扩增检测。目标条带的长度为846 bp,见图4。结



1~10. 酚仿抽提基因组DNA;11~18. 水煮法抽提基因组DNA;其中1~4、11~14. 引物Bovine 1.715;6~10、15~18. 引物BOV97M;6. 阴性对照;1、2、7、8、11、12、15、16. 母牛样品;3、4、9、10、13、14、17、18. 公牛样品;M. 分子量标记B003-2

1-10. PCR results of genomic DNA from phenol extraction;11-18. Results of genomic DNA from cooking method in water;1-4,11-14. PCR results of primer Bovine 1.715;6-10,15-18. PCR results of primer BOV97M;6. Negative control;1,2,7,8,11,12,15,16. Female samples;3,4,9,10,13,14,17,18. Male samples;M. DNA molecular marker B003-2.

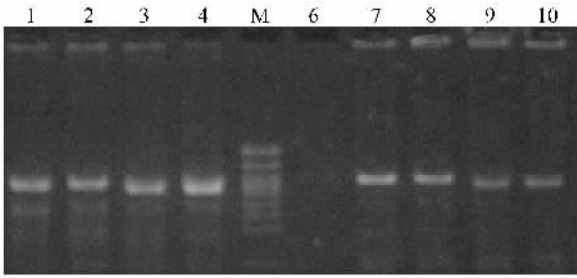
图3 两种方法提取基因组在 -20°C 冻存1月后的PCR扩增

Fig. 3 PCR results of two genomic DNA extraction methods after being preserved for a month at -20°C

果表明,两种方法提取到的基因组DNA都能实现长扩增产物的检测分析,都扩增出了相应大小的目标产物,但酚仿抽提法扩增产物中有一些非特异扩增产物,而水煮法却没有这一现象。水煮法提取的基因组DNA在 -20°C 冻存1月后仍可以扩增到大片段产物,说明水煮法提取的基因组DNA冻存后仍具有较好的完整性。

3 讨论

3.1 关于基因组的提取,不论是传统的抽提方法还是近来改进的抽提方法都采用了蛋白酶K对血液或组织样品进行蛋白质的消化^[1],整个过程要经历酚仿抽提,乙醇沉淀等操作步骤,需要的血样及组织样较多,而其操作过程长,每一步操作过程中都有很多的DNA被损失,特别是对于微量的血样及组织样很难获得较高的DNA回收率^[3,4]。对此方法进行了改进,在微量的组织样品中加入特定的样品裂解液,在 65°C 经短暂的裂解后不经过酚仿抽提就可用于PCR检测。抽提时间缩短到55 min,且DNA回收率较高^[5,6]。本试验对基因组提取方法进行了研究,并摸索出一种更简洁的DNA抽提方法,本方法在提取前不需配置任何溶液,试验中也不需要任



1~4. 酚仿提取的公牛基因组 DNA; M. DNA 分子质量标准 B003-2; 6. 阴性对照; 7~10. 水煮法提取的公牛基因组 DNA

1~4. PCR results of male genomic DNA from phenol extraction; 6. Negative control; 7~10. Results of male genomic DNA from cooking method in water; M. DNA molecular marker

图 4 对两种方法提取的长片段基因组 PCR 扩增

Fig. 4 PCR results of two genomic DNA extraction methods for long PCR amplification product

何特殊仪器,只是利用渗透压平衡原理,将细胞破碎,再通过热力学原理将染色体与破碎的膜结构等分离、同时使基因组 DNA 与组蛋白分离,释放出基因组 DNA。这期间也可能 DNA 与组蛋白不是彻底分离的,但这都不会对后续的扩增反应有任何影响。本方法没有引入任何离子、有机溶剂等,只是发生了一次染色体由细胞内到细胞外的移位和变性过程, DNA 扩增反应就会迅速高效地进行。

3.2 为了检验冷冻保存对基因组 DNA 的影响,在基因组 DNA 提取一个月后以相同的引物对两种方法提取的 DNA 进行了 PCR 扩增,结果依然良好。这说明象传统的酚仿抽提法一样,水煮法提取的 DNA 也可以在冷冻状态下长期保存(本研究只检测了保存 1 个月后的效果)。同时,本研究设计的长片段扩增引物对冻存后基因组 DNA 的检测结果表明,水煮法提取的基因组 DNA 冻存 1 月以后仍具有较好的完整性。表明本方法提取的基因组 DNA

可以长期冷冻保存。

3.3 用水煮法提取 DNA,不经过震荡,不会有机械损伤,减少了中间环节,基因组的完整性更好。没有经过繁杂的抽提过程,回收率更高。同时水煮法仅用不到 30 min 的时间就可提取到基因组 DNA,取样少量牛胚胎细胞用水煮法进行基因组提取,鉴别牛早期胚胎性别^[7,8]。这种快速、简便的优点,在遗传分析研究中具有较大的应用前景,同时在法医鉴定及其他一些现场操作等方面更具有重要的实际意义。

参考文献:

- [1] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning [M]. Third edition. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- [2] 金东雁,黎孟枫译.分子生物学试验指南[M].第 2 版.北京:科学出版社,1999.
- [3] 徐艳春,马立新,白素英,等.应用 PCR 方法通过毛发进行哺乳动物性别鉴定[J].东北林业大学学报,2000,28(6):72~77.
- [4] 余 舰,刘从勇,皱继初,等. PCR 技术鉴定毛发、陈旧血迹的性别[J].遵义医学院学报,1995,1:21~22.
- [5] 赵春江,李 宁.一种从毛发中提取基因组 DNA 的简易方法[J].遗传,2003,25(1):69~70.
- [6] Park J H, Lee J H, Choi K M, *et al.* Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied blastomere[J]. Theriogenology, 2001,55:1 843~1 853.
- [7] 王宗礼,王 栋,程金华,等.鉴别牛早期胚胎性别 PCR 方法引物的设计与筛选[J].畜牧兽医学报,2005,36(2):116~120.
- [8] 朱化彬,王 栋,程金华,等.牛早期胚胎性别快速鉴别的研究[J].畜牧兽医学报,2005,36(12):1 270~1 274.