

保存温度与时间对动物组织 DNA 提取质量的影响

王敏强, 王斌, 刘晓玲 (山东烟台大学化学生物理工学院, 山东烟台 264005)

摘要 [目的]研究不同保存温度、不同保存时间对蟹肉总 DNA 提取质量的影响,为同类研究提供借鉴。[方法]将样品在 4、-20 和 -40 °C 下分别保存 4、8 和 15 d,提取蟹足内肌肉总 DNA,测定总 DNA 的紫外吸收值,并设计引物扩增其 mtDNA *ND6* 基因,采用琼脂糖凝胶电泳分别对提取的总 DNA 及 PCR 结果进行检测。[结果]由鲜活蟹组织提取的 DNA A_{260} 与 A_{280} 的比值因蛋白污染而较低;15 d 内 4 °C 与 -40 °C 条件下保存的 DNA 提取率和条带检出率均无明显差异,而 -20 °C 下的保存效果受时间影响明显。各处理组合总 DNA 的 A_{260} 与 A_{280} 比值在 1.79 ~ 2.00;利用上述 DNA 作模板,扩增其特定基因 mtDNA *ND6* 均可获得预期长度的 PCR 条带。[结论]短期保存组织宜选择 4 °C,若需较长时间保存时则宜选择 -40 °C 以下的低温。

关键词 三疣梭子蟹;肌肉组织;DNA 提取;保存条件

中图分类号 S813 文献标识码 A 文章编号 0517 - 6611(2009)33 - 16407 - 03

Influences of Storage Time and Temperature on the Quality of DNA Extracted from Preserved Animal Tissues

WANG Min-qiang et al (College of Chemistry and Biology, Yantai University, Yantai, Shandong 264005)

Abstract [Objective]The study is to examine the influence of storage time and temperature on DNA extracted from preserved animal tissue, in order to provide reference for later similar studies. [Method]The total genomic DNA was extracted from the cheliped muscle of *Portunus trituberculatus*, which were preserved in 4, -20 and -40 °C for 4, 8 and 15 days. The DNA was checked by ultraviolet absorption measurement. The gene of mtDNA *ND6* was amplified. The extracted DNA and the PCR product of *ND6* fragment were detected by use of agarose gel electrophoresis(AGE). [Result]The ratio of DNA $A_{260}:A_{280}$ of fresh muscle is lower because of the protein contamination. The effects of the muscular tissue under Preservation conditions of 4 °C and -40 °C are not different in both the DNA contents and the bands checked out within 15 days, but significantly better than -20 °C; Ratios of A_{260}/A_{280} of the DNAs extracted from the all treatments among 1.79 - 2.00, and using them as templates in PCR for amplifying the specific gene mtDNA *ND6*. The expected band length was obtained. [Conclusion]The tissue being used for extract DNA in 4 days, it was better to be preserved it at 4 °C, and if preserved for longer time, it was suggested to keep it under the temperature lower than -40 °C.

Key words *Portunus trituberculatus*; Muscle tissue; DNA extraction; Preservation conditions

核酸分子生物学研究中 DNA 的制备是最基本也是最关键的一步,样品制备的质量直接关系到后续 DNA 分析能否顺利进行。高质量的 DNA 有许多要求,如尽量保持核酸分子完整性、高分子量、无明显降解现象;高纯度,尽量去除酚类、糖类等严重干扰酶作用的杂质;高获取效率等。就样本而言,由鲜活样本提取 DNA 最理想。但多数情况下,研究者需从非鲜活样本中提取 DNA。作为整个试验的起始,对样本的保存处理通常会影响到 DNA 的提取质量,成为试验的瓶颈。目前对陆生动物组织 DNA 保存与提取的方法研究较多,技术也较成熟^[1-4]。近年来,对海洋生物资源的开发利用和保护已列为国家发展战略,分子生物学方法已渗透到许多海洋经济类动物的起源进化、育种繁殖、病害检测中。海洋来源动物由于其不同于陆生生物的组织结构和细胞结构特点,合适的保存方法能提高由其组织中提取 DNA 的质量。有关这方面研究报道较少,且主要集中在用何种化学试剂(如福尔马林、乙醇及 EDTA)保存海洋动物组织上^[5-7]。该试验以三疣梭子蟹为例,采用常规琼脂糖凝胶电泳及 PCR 技术,对原样不加任何试剂处理,研究不同保存温度、不同保存时间对蟹肉 DNA 提取质量的影响,旨在提取高质量海洋动物组织样 DNA,以供同类研究借鉴。

1 材料与与方法

1.1 供试材料 从烟台大学附近市场购买鲜活三疣梭子蟹,带回实验室后迅速取出肌肉组织,用蒸馏水冲洗数次,分为 4 份,其中 1 份为鲜蟹肉样,用于阳性对照试验,其余 3 份

分别放置于 -40、-20 和 4 °C 保存备用,每份设 5 个重复。

DNA 提取主要试剂(裂解液)的配制:浓度 0.5 mol/L EDTA 40 ml,浓度 0.5 mol/L Tris · HCl 4 ml,浓度 10% SDS 10 ml,定容至 200 ml,终浓度为 0.1 mol/L EDTA, 10.0 mmol/L Tris · HCl, 0.5% SDS。

1.2 总 DNA 提取 采用经典的酚-氯仿法抽提组织 DNA,在具体操作上稍作改动,步骤如下:①称取约 100 ~ 150 mg 蟹肌肉组织,置于已加入 750 μl 预温的裂解液的 1.5 ml 离心管(EP 管)中,迅速研碎组织,操作时间越短越好。②加 10 μl 蛋白酶 K(20 mg/ml),颠倒混匀,37 °C 预温 30 min;50 °C 恒温水浴过夜消化,期间轻缓颠倒离心管混匀数次。③加等体积酚-氯仿-异戊醇(25:24:1),轻缓颠倒混匀 10 min(低温下操作),室温 10 000 r/min 离心 10 min,分层。用去尖黄枪头吸取上清液移至新的 1.5 ml EP 中。④重复步骤③ 1 次。再加入等体积氯仿-异戊醇(24:1),颠倒混匀放置 20 min,室温 12 000 r/min 离心 5 min,分层。⑤用去尖黄枪头吸取上层水相移至新的 1.5 ml EP 管中,加入 0.1 ~ 0.2 倍体积浓度 10 mol/L 的 NH₄Ac 溶液,再加入 1 ml -20 °C 预冷的无水乙醇,颠倒混匀,-20 °C 保存约 30 min。⑥取出沉淀 DNA 的 EP 管,室温 12 000 r/min 离心 3 min。倾去无水乙醇,加入 0.75 ml 浓度 70% 的乙醇中(室温),轻轻吹打,使沉淀泛起,轻缓颠倒数次,瞬时离心。取出离心管,倾去上部液体,残留乙醇用白枪头吸除。⑦将离心管风干至无乙醇味(30 min 以上)。⑧视沉淀量加入 150 ~ 300 μl TE 溶解沉淀,用枪头轻轻吹打数次后在 65 °C 恒温水浴锅内放置 2 ~ 3 h,或室温过夜至 DNA 完全溶解。

1.3 DNA 鉴定方法

1.3.1 紫外检测。用紫外分光光度计测定在 260 及 280 nm

基金项目 山东省科技厅自然科学基金项目(Y2008D02)。

作者简介 王敏强(1957-),男,陕西渭南人,博士,副教授,从事动物分子遗传标记与育种研究。

收稿日期 2009-07-24

波长处光吸收值,计算 DNA 浓度,并根据 A_{260}/A_{280} 判断 DNA 的纯度。取 6 μl DNA 样进行浓度 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,检测总 DNA 有无降解并记录条带检出数,用 F 检验确定差异显著性。

1.3.2 PCR 扩增 mtDNA ND6 基因。自行设计并由上海生工合成特异性引物扩增 ND6 基因。PCR 体系为 20 μl :2.5 μl 10 \times PCR 缓冲液(含浓度 25 mmol/L Mg^{2+}),1.5 μl dNTPs (浓度 10 mmol/L),引物均为 0.8 μl (浓度 10 pmol/ μl),0.25 μl Taq DNA 聚合酶(浓度 2 U/ μl),0.8 μl DNA 模板(浓度

50 ~ 100 ng/ μl)。扩增反应在 PCR 仪(TC-XP)上进行。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,59 $^{\circ}\text{C}$ 复性 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸 8 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 PCR 产物 6 μl 用浓度 2% 琼脂糖凝胶电泳(0.5 \times TBE 缓冲条件),检测并记录条带检出数,用 F 检验确定差异显著性。

2 结果与分析

2.1 紫外分光光度计检测结果 以鲜样为对照,各处理 A_{260} 与 A_{280} 的比值及总 DNA 的提取结果见表 1。

表 1 基因组总 DNA 紫外吸收检测

Table 1 Ultraviolet absorption detection of extracted genomic DNA

| 保存时间//d | 保存温度// $^{\circ}\text{C}$ | A_{260} | A_{260}/A_{280} | DNA 提取率// $\mu\text{g}/\text{mg}$ |
|-------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------|
| Preservation time | Preservation temperature | A_{260} | A_{260}/A_{280} | DNA extraction rate |
| 鲜样 Fresh samples | 室温 Room temperature | 0.121 \pm 0.010 | 1.58 \pm 0.06 | 263.6 \pm 7.32 |
| 4 | -40 | 0.272 \pm 0.030 | 1.88 \pm 0.10 | 350.2 \pm 80.42 |
| | -20 | 0.109 \pm 0.040 | 1.94 \pm 0.09 | 174.4 \pm 38.60 |
| | 4 | 0.230 \pm 0.040 | 2.00 \pm 0.03 | 308.8 \pm 35.08 |
| 8 | -40 | 0.205 \pm 0.090 | 1.79 \pm 0.11 | 262.4 \pm 104.23 |
| | -20 | 0.289 \pm 0.080 | 1.95 \pm 0.05 | 323.0 \pm 92.04 |
| | 4 | 0.253 \pm 0.050 | 1.92 \pm 0.06 | 313.0 \pm 48.02 |
| 15 | -40 | 0.369 \pm 0.140 | 1.79 \pm 0.14 | 444.2 \pm 159.01 |
| | -20 | 0.382 \pm 0.100 | 1.84 \pm 0.10 | 458.4 \pm 99.13 |
| | 4 | 0.265 \pm 0.040 | 1.85 \pm 0.14 | 333.4 \pm 72.22 |

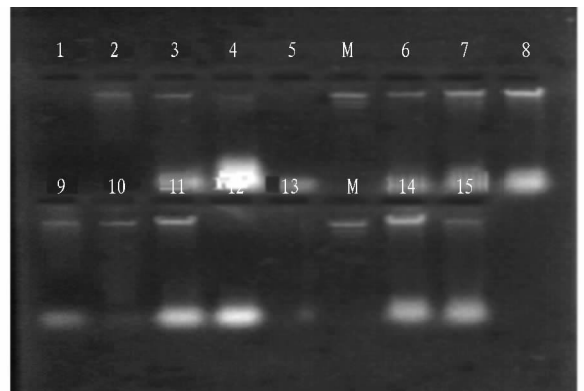
据报道,DNA 纯品的 A_{260}/A_{280} 在 1.8 左右,高于 1.8 说明可能含有 RNA,而低于 1.8 说明可能含有蛋白、酚类等污染^[1]。由表 1 可见, A_{260}/A_{280} 除在鲜样中较低外,保存 4、8 和 15 d 后,其比值在 1.79 ~ 2.00。鲜样 A_{260}/A_{280} 较低的原因与蟹肉富含蛋白质(15% ~ 20%),组织结构松软,蛋白较难除净有关;在保存过程中,由于肽类分子降解,蛋白质变性,有助于去污剂和有机溶剂酚、氯仿等的作用,使 A_{260}/A_{280} 比值升高;另外, A_{260}/A_{280} 有随保存温度升高而升高的趋势,可能是因温度升高加速核酸降解,增强了短波吸收。

对 DNA 的提取率(每毫克组织样中所含 DNA 的微克数)进行 F 检验,结果显示,相同温度条件下,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存的 3 个时间段 DNA 提取率变异较 -20 $^{\circ}\text{C}$ 和 -40 $^{\circ}\text{C}$ 小;-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存组织似乎随时间延长 DNA 得率提高;-40 $^{\circ}\text{C}$ 与 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 4 d 结果差异不明显,但均较 -20 $^{\circ}\text{C}$ 好($P < 0.01$);-40 $^{\circ}\text{C}$ 和 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 15 d 后 DNA 提取率显著高于 4 $^{\circ}\text{C}$ ($P < 0.01$)。

2.2 总 DNA 及 PCR 产物电泳结果

2.2.1 总 DNA 的检测。对各处理提取的总 DNA 用浓度 0.8% 琼脂糖凝胶电泳条带检出率进行小样本频率检验,结果表明不同处理受时间和温度的影响均不明显($P > 0.05$)。以保存 8 d 后各保存温度条件下提取的三疣梭子蟹肉总 DNA 凝胶电泳结果为例(图 1)可见,电泳主条带清晰且均在 20 kb 左右,为总 DNA 的特征。该试验未加 RNaseA,前沿条带主要为 RNA 以及部分 DNA 降解产物。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存样本 8 d、特别是 15 d 所提 DNA 电泳条带拖尾明显,降解较为严重。

2.2.2 PCR 产物的检测。以所提 DNA 作模板进行 PCR,扩增其 mtDNA ND6 基因,用浓度 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,显示 PCR 电泳条带均在 1 kb 左右,为预期 PCR



注:1 ~ 5 为 -40 $^{\circ}\text{C}$ 保存;9 ~ 13 为 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存;6,7,8,14,15 为 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存;Marker 为 λ DNA/Hind III。

Note:1 - 5, preserved at -40 $^{\circ}\text{C}$; 9 - 13, preserved at -20 $^{\circ}\text{C}$; 6, 7, 8, 14 and 15, preserved at 4 $^{\circ}\text{C}$; Marker stands for λ DNA/Hind III.

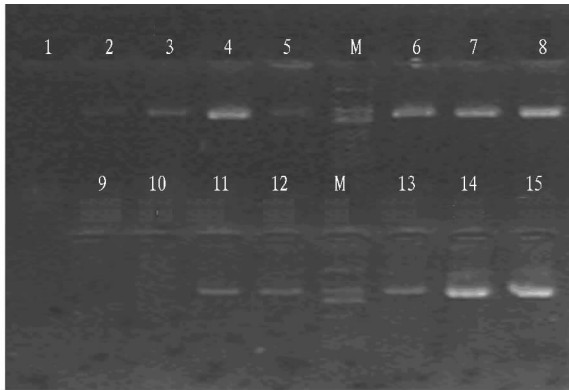
图 1 总 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis results of extracted genomic DNA

产物的长度。对不同组合处理(分别保存在 -40、-20 和 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 4,8 和 15 d 提取的蟹肉 DNA 作模板进行 PCR 扩增)的 PCR 条带检出数进行小样本频率检验,结果表明,不同保存时间和保存温度对 PCR 结果影响不明显($P > 0.05$)。保存 8 d 样本提取 DNA 作模板进行 PCR 产物 2.0% 琼脂糖凝胶电泳的结果见图 2。虽然各处理组合在条带检出率方面无差异,但由条带清晰度可见,以 4 $^{\circ}\text{C}$ 效果最好,-20 $^{\circ}\text{C}$ 效果较差。

3 结论与讨论

在分子生物学研究中,从不同来源的组织中提取 DNA 的原理大致相似,其一是裂解,其二是纯化。裂解是使样品



注:1~5 为 -40°C 保存;9~13 为 -20°C 保存;6,7,8,14 和 15 为 4°C 保存;Marker 为 DL2000。

Note:1~5, preserved at -40°C ; 9~13, preserved at -20°C ; 6,7,8,14 and 15, preserved at 4°C ; Marker, DL2000.

图 2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 The agarose gel electrophoresis of PCR products

中的核酸游离在裂解体系中的过程,纯化则是使核酸与裂解体系中的其他成分如蛋白质、盐及其他杂质彻底分离的过程。为了提高 DNA 的纯度和得率,需要对不同组织来源的理化特性有一定了解。研究结果提示,新鲜蟹肉蛋白质含量较高,提取 DNA 时应提高蛋白酶 K 和裂解液中 SDS 的含量,以便充分裂解组织细胞,使蛋白质变性。对保存 4,8 和 15 d 的样本,采用前述的 DNA 提取步骤,所提 DNA 纯度符合一般分子生物学试验操作要求。从活体组织取样以及将组织样研磨或者匀浆过程要尽量减少 DNA 降解,一方面保持在低温下操作,另一方面操作要迅速。

DNA 提取质量会受到诸多因素影响,组织保存时间和温度是常见的 2 个重要因素。低温能使细胞内核酸酶的活性降低,有利于保持 DNA 的完整性和得率。在排除提取 DNA

(上接第 16391 页)

测间接血凝试剂,对青海地区绵羊和山羊感染情况进行血清学调查。结果 1 160 份羊血清中阳性数为 335 份,阳性率为 28.8%。这个结果与 2007 年张琳对青海地区贵南黑山羊进行的 MO 血清学调查结果(26.5%)很接近^[11],但均比何存利等 2005 年报道的宁夏地区 MO 阳性率要高,说明青海地区 MO 感染率偏高。

(2)该研究结果显示青海地区绵羊阳性率为 30.4%,明显高于山羊(19.7%),提示绵羊对绵羊肺炎支原体的易感性要高于山羊。这表明不同品种羊对 MO 的易感性不同,这与有关资料报道相一致^[12]。

(3)从不同年份采集血清检测结果看,2006~2008 年,绵羊的血清阳性率呈明显的逐年上升趋势。这表明随着养羊业的发展,养羊数量逐年增加,MO 在青海地区日趋流行。从血清采集的季节看,冬春季的 MO 感染率明显要高于夏秋季节。原因可能是冬春季节天气比较严寒,羊群容多拥挤在一起,接触机会增多所致。

(4)调查地区中 2 个规模养殖场山羊血清的阳性率分别为 7.8% 和 6.6%,远低于平均阳性率。这与何存利等报道规模化养羊场 MO 阳性率偏高不符。这可能与这 2 个养殖

过程中系统误差的情况下,从总 DNA 提取率考虑,如果采集鲜活样本后在短时间(4 d 内)开始试验时,仅将样本置于 4°C 保存即可;需要在 4 d 以后开始试验,最好将样本保存在更低温度下(-40°C)。这与吴晓黎等对全血样保存条件的研究结果是一致的^[2]。在试验过程中,发现 4°C 保存样本在 8 d,特别是 15 d 时,外观成糊状,变质严重,所以导致所提 DNA 有明显的拖尾现象,降解严重。保存在 -20°C 效果较差,推测在该冷冻温度保存过程中,对细胞结构破坏严重、抑制细胞内核酸酶活性比 -40°C 以下效果差。

PCR 结果显示各处理组合的 PCR 条带检出率无差异,这与 PCR 的灵敏度有关,因为在理论上只要有一条完整模板 DNA 存在便能实现扩增。这与以往诸多研究结果一致^[5-7],但从 PCR 条带的判读性方面考虑,以 4°C 和 -40°C 保存样品较 -20°C 效果好。

参考文献

- [1] SAMBROOK J, FRIETCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning; a laboratory manual [M], 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:463-468.
- [2] 吴晓黎, 何燕, 陈菁, 等. 存放全血温度及时间对提取 DNA 质量的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2000, 25(3): 232-234.
- [3] 沈剑敏, 周桂花. 动物组织中 DNA 提取方法的优化[J]. 中国现代教育装备, 2009(2): 71-73.
- [4] 王敏强, 曹俊辉, 刘晓玲. 3 种禽血抗凝剂效果及其对 DNA 提取质量的影响[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(23): 6124-6125.
- [5] 刘保忠, 宋林生, 相建海. 海湾扇贝不同保存条件下 DNA 的提取及 RAPD 扩增比较[J]. 海洋科学, 2001, 25(3): 51-53.
- [6] 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): 296-300.
- [7] 方旅平, 林元烧, 曹文清. 不同保存条件下中华水蚤基因组 DNA 提取的比较[J]. 海洋科学, 2005, 29(2): 1-4.
- [8] SHI K M, ZHOU Y F. An improved method of extracting *Artemisia abrotanum* genomic DNA[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2): 36-38.

场的饲养管理不同有关,良好的饲养管理可以有效降低山羊感染 MO 的机会。

参考文献

- [1] CARMICHAEL L E T, GEORGE T D, SULLIVAN N D, et al. Isolation, propagation, and characterization studies of an ovine *Mycoplasma* responsible for proliferative interstitial pneumonia[J]. Cornell Vet, 1972, 62(4): 654-679.
- [2] 储岳峰, 赵萍, 高鹏程, 等. 绵羊和山羊霉形体病研究概述[J]. 畜牧兽医科技信息, 2008, (6): 8-10.
- [3] LIVINGSTON C W JR, GAUER B B. Isolation of *Mycoplasma ovipneumoniae* from Spanish and Angora goats[J]. Am J Vet Res 1979, 40(3): 407-408.
- [4] 王栋, 张瑞婷. 我国山羊传染性胸膜肺炎病原的鉴定[J]. 兽医药品通讯, 1988(2): 11-13.
- [5] 邓光明, 赵焯, 梁桂香, 等. 类山羊传染性胸膜肺炎诊断于防治的研究——病原诊断[J]. 中国兽医科技, 1991(6): 5-8.
- [6] 刘少华, 徐天菊, 吕增顺, 等. 云南曲靖市羊肺炎支原体病的调查[J]. 中国人畜共患病杂志, 2000, 20(5): 108-109.
- [7] 逯忠新, 邓光明, 梁桂香, 等. 羊肺炎支原体病调查[J]. 中国兽医科技, 1993, 23(9): 15-16.
- [8] 何存利, 鲍嘉铭, 郑丽侠. 绵羊肺炎霉形体病原分离及血清学调查[J]. 宁夏农林科技, 2005(3): 12-13.
- [9] 张莉, 王作艳, 孙继国, 等. 绵羊肺炎支原体的微生物学特性的研究[J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(3): 221-224.
- [10] 赵萍, 逯忠新, 储岳峰, 等. 绵羊肺炎支原体间接血凝诊断方法的建立[J]. 甘肃农业大学学报, 2008, 2(1): 29-32.