

## 2 种方法提取日本沼虾基因组 DNA

李艳和<sup>2</sup>, 陈宏权<sup>\*</sup>, 汪留全, 梁忠, 张司燕, 甘小伟, 胡王<sup>2</sup>

(1. 安徽农业大学, 安徽合肥 230036; 2. 安徽省农业科学院水产研究所, 安徽合肥 230036)

**摘要** 以日本沼虾的尾部肌肉为材料, 采用苯酚-氯仿法和氯化钠法提取日本沼虾基因组 DNA, 并对 2 种方法提取的结果进行了紫外分光光度、琼脂糖凝胶电泳、PCR 扩增等方法的鉴定。结果表明: 2 种方法提取的日本沼虾基因组 DNA 浓度分别为 3 165.8 和 396.5 ng/μl, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值分别为 1.76 和 1.63, 均能满足分子生物学研究的需要。

**关键词** 日本沼虾; 基因组 DNA; 提取方法

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)21-5487-02

### DNA Extraction Methods for *Macrobrachium nipponense* DNA

LI Yan-he et al (Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

**Abstract** Genomic DNA of *Macrobrachium nipponense* was extracted by means of two different methods of trichlorophenol-trichloroethane and sodium Chloride. The extraction DNA quality of the two methods was detected by means of Ultraviolet Spectrophotometry, agarose gel and PCR amplification. The results showed that the DNA sample obtained with the two methods got the highest purity (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> = 1.76, 1.63) and concentration (3 165.8, 396.5 ng/μl). The result of PCR indicated that the quality of the DNA isolated with the two methods could meet the requirements of *Macrobrachium nipponense* molecular biology manipulation.

**Key words** *Macrobrachium nipponense*; Genomic DNA; Extraction method

日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 又称青虾, 是经济价值较高的淡水虾类, 产于我国和日本的某些水域, 其肉味鲜美、营养丰富, 深受消费者喜爱; 又因其食性杂、生长快、适应能力强、易养殖而倍受养殖者青睐<sup>[1]</sup>。近年来, 随着对日本沼虾遗传育种研究的不断深入, 分子生物学技术将成为日本沼虾遗传分析和品种改良的有力工具之一。而提取高质量的日本沼虾基因组 DNA 是分子生物学深入研究(如 PCR, Southern 杂交, 构建 DNA 文库, 遗传多样性检测等)的基础和前提。笔者以日本沼虾的尾部肌肉为样品, 采用苯酚-氯仿法和氯化钠法提取基因组 DNA, 并对提取效果进行了比较和分析。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 日本沼虾采样于安徽省庐江县水产渔业科技示范园, 采样后将虾体清洗干净, 取其尾部肌肉直接抽提 DNA 或置 -20℃ 冰箱中保存备用。

### 1.2 DNA 提取方法

**1.2.1 苯酚-氯仿法。**取 50 ng 肌肉组织, 充分剪碎后放入 1.5 ml 离心管中, 加入 400 μl DNA 提取液 (10 mmol/L Tris-Cl, pH 值 8.0; 0.1 mmol/L EDTA, pH 值 8.0; 0.5% SDS; 20 μg/ml 胰 RNA 酶), 水浴 37℃ 保温 1 h 左右, 再加入 10 μl 蛋白酶 K, 置于 57℃ 水浴锅中轻摇过夜消化; 从水浴锅中取出离心管冷却至室温; 加入 300 μl TE, 600 μl Tris-饱和酚, 振荡混匀; 10 000 r/min, 离心 10 min; 取上清液, 加入等体积的 Tris-饱和酚、氯仿-异丙醇 (24:1), 振荡混匀; 10 000 r/min, 离心 10 min; 取上清液, 加入等体积的氯仿-异丙醇, 振荡混匀; 10 000 r/min, 离心 10 min; 取上清液, 加入 2~3 倍体积无水乙醇, 振荡混匀, 置冰箱中沉淀 30 min; 取出, 10 000 r/min, 离心 10 min; 倾溶液, 留沉淀; 用 70% 乙醇洗涤 2~3 次, 室温风干后加入适量 TE 溶解, 置于 4℃ 冰箱中保存备用。

**1.2.2 氯化钠法。**取 50 ng 同一样品的肌肉组织, 充分剪碎后放入 1.5 ml 离心管中, 加入 400 μl DNA 提取缓冲液 (0.4

mol/L NaCl; 10 mmol/L Tris-Cl, pH 值 8.0; 2 mmol/L EDTA, pH 值 8.0; 1% SDS; 20 μg/ml 胰 RNA 酶), 用电动匀浆器快速匀浆 10~15 s; 加入 10 μl 20 ng/ml 蛋白酶 K, 充分混匀后, 放入 55~65℃ 水浴锅中过夜消化; 加入 6 mmol/L NaCl 300 μl, 手摇充分混匀; 8 000 r/min, 离心 10 min; 取上清液, 加入等体积异丙醇混匀, 置 -20℃ 冰箱中 1 h; 取出, 8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液; 用 70% 乙醇洗涤沉淀 2~3 次, 干燥后加入适量 TE, 置于 4℃ 冰箱中保存。

**1.3 DNA 浓度及纯度检测** 取 15 μl 待测 DNA 溶液于 5 ml 离心管中, 用蒸馏水稀释 50 倍, 混匀; 在紫外分光光度计上分别测波长 260 和 280 nm 处 OD 值; 其中 DNA 浓度 (μg/ml) = OD<sub>260</sub> × 50 × 稀释倍数, DNA 纯度 = OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>。若 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值小于 1.4, 说明存在蛋白质或酚等杂质较多, 需重新抽提 DNA。

**1.4 琼脂糖凝胶电泳** 用 TBE 缓冲液配制 1% 的琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭 0.5 μg/ml), 取提取的基因组 DNA 样品 2 μl 点样, 置于 1 × TBE 电极缓冲液中, 电压 80~100 V, 室温下电泳约 40 min, 在凝胶成像系统分析仪上检测电泳结果并拍照。

**1.5 PCR 扩增检测** 将提取的总 DNA 作为模板, 用随机引物 S43 和 S236 (购自上海生工生物工程公司) 进行 PCR 扩增反应。反应体系为 25 μl, 其中包括: 10 × PCR Buffer 2.5 μl, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2 μl, 10 mmol/L dNTP 0.5 μl, 引物 1 μl, 模板 1 μl, Taq 酶 5 U (μl) 0.3 μl, 用双蒸水补足体积至 25 μl。反应循环参数为: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 36℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。反应结束后扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭 0.5 μg/ml) 在 80~100 V 电压下电泳 40 min, 紫外灯下观察结果, 并拍照。

## 2 结果与分析

**2.1 DNA 质量的紫外检测** 在提取 DNA 的紫外检测中, 测得苯酚-氯仿法和氯化钠法提取的 DNA 浓度分别为 3 165.8 和 396.5 ng/μl, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值分别为 1.76 和 1.63。一般 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值在 1.4~1.8 时, DNA 纯度较高, 尤其接近 1.8 最好; 若比值较高, 表明 RNA 没有除干净; 若比值较低, 说

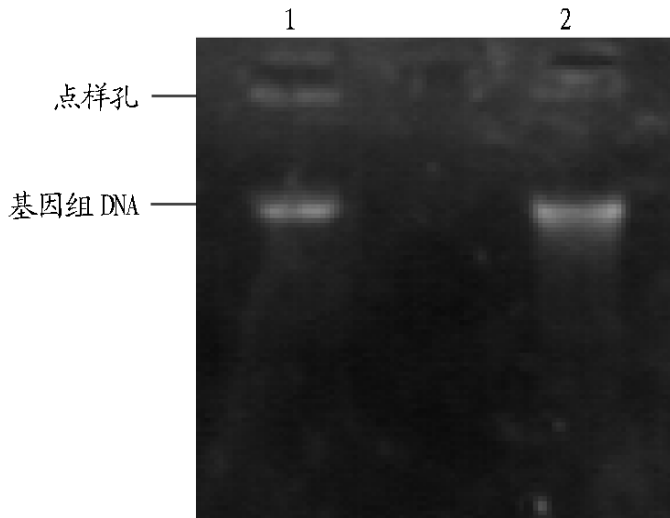
基金项目 安徽省财政厅成果推广项目。

作者简介 李艳和 (1976-), 女, 安徽定远人, 在读硕士, 助理研究员, 从事鱼类分子生物学研究。\* 通讯作者, 教授。

收稿日期 2006-09-18

明存在蛋白质或酚等杂质较多<sup>[2]</sup>。紫外检测结果表明:2 种方法提取的 DNA 纯度均较高。

**2.2 DNA 质量的琼脂糖凝胶电泳检测** 2 种方法提取的基因组 DNA 电泳图谱(图1)中,DNA 条带均较清晰、整齐、完整、几乎无拖尾。这说明提取的基因组 DNA 大分子较为完整,无降解;纯度较高,含杂质少,可用于 PCR 扩增和其他分子生物学研究。



注:1. 氯化钠法;2. 苯酚-氯仿法。

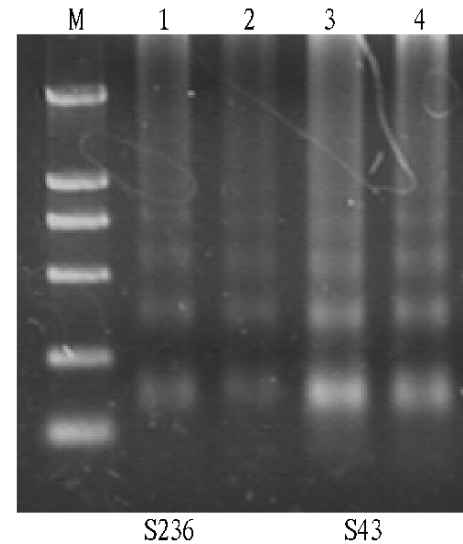
图1 日本沼虾基因组 DNA 电泳图谱

**2.3 DNA 质量的 PCR 检测** 笔者用 2 个随机引物,对同一样品的 2 种不同方法提取的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。结果(图2)表明:图谱条带基本清晰,有拖带现象,原因可能是 PCR 反应体系未进行优化;同一随机引物对 2 种方法提取的基因组 DNA 均检测到多态性位点,这说明采用 2 种方法提取的日本沼虾肌肉组织基因组 DNA 均符合分子生物学进一步试验的要求。

### 3 讨论

高质量 DNA 要求尽量保持核酸分子完整性,无明显降解现象;纯度高,尽量去除掉酚类等严重干扰酶作用的杂质;获取效率高,能够达到试验要求的浓度和数量;不同样品间绝无交叉污染。该试验中 2 种方法提取的 DNA 基本能够满足分子生物学对 DNA 的质量要求。

在提取基因组 DNA 过程中需注意: 保证水浴时间充足、温度适当、不时振荡以充分混匀溶液,使蛋白酶 K 发挥



注:1,3. 苯酚-氯仿法;2,4 氯化钠法;M:Marker(DL2000)。

图2 随机引物 PCR 扩增电泳图谱

最佳消化活性,破坏细胞膜使 DNA 完全释放到裂解缓冲液中,这一点关系到 DNA 的产量; 吸取上清液时,可使用大口径的 Tip 头(用剪刀将 Tip 头尖部剪掉),小心、谨慎,避免吸取两相界面的乳白层,去除蛋白质、RNA 等污染,这一点对所提取 DNA 的纯度很关键; 避免剧烈振荡离心管,以防止 DNA 的降解,保证基因组 DNA 的完整性。

在保证高质量的前提下,同时应兼顾低成本运作,操作简单。氯化钠法采用饱和氯化钠代替传统的酚和氯仿起抽提 DNA 的作用,从而降低了有毒物质的使用和 DNA 的提取成本。因此,它是一种切实可行的提取 DNA 方法。但氯化钠法抽提的基因组 DNA 也有弊端: DNA 的产量不大; DNA 提取缓冲液比常规酚氯法用的提取液成分复杂。

该试验中 2 种提取 DNA 方法提取的 DNA 的 OD 值均未达到 1.8,说明在提取 DNA 样品时可能仍然含有少量的杂蛋白或多酚等物质<sup>[3]</sup>,但通过琼脂糖凝胶电泳检测效果较好,并对随后的 PCR 影响不大,具体原因有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] 胡国宏,朱蕊成,张俊辉. 日本沼虾的人工繁殖与养殖试验[J]. 内陆水产,2000(12):31.
- [2] 谢友菊. 遗传工程概论[M]. 北京:北京农业大学出版社,1990:28-29.
- [3] 刘丹,刘太国,张敏,等. 小麦光腥黑粉菌冬孢子总 DNA 提取方法比较[J]. 植物保护,2006,32(2):93-95.