

# 猪肝基因组 DNA 提取与纯化的研究

韩芬霞 (河南科技学院动物科技学院, 河南新乡 453003)

**摘要** 对血液中提取基因组 DNA 的方法加以改进, 获得了一种提取猪肝组织中 DNA 的有效方法。试验表明, 利用 SDS 裂解, 氯仿、异戊醇抽提母猪肝脏中基因组 DNA, 得到了纯度较高的 DNA。

**关键词** 母猪; 肝脏; 基因组 DNA; 提取

中图分类号 Q781 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)16-3980-02

## Extraction and Purification of Genome DNA From Liver of Swine

HAN Fen-xia (Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003)

**Abstract** A very simple and fast method for extracting high quality genomic DNA from liver of swine was described. The experiment indicated that DNA was extracted from swine by means of the application of the agents of SDS, chloroform and iso amyl alcohol so that a great deal of DNA required was acquired. The quantity and quality of the DNA was high enough for many biology experiments, such as PCR amplification and RAPD analysis.

**Key words** Swine; Liver; Genome DNA; Extraction

分子标记, 如 RFLP 技术、RAPD 技术等, 在动物个体鉴定、家系分析、居群遗传、基因定位、连锁图构建、疾病诊断等方面有了广泛的应用, 而基因组 DNA 的提取是开展该方面研究的前提。不同物种所用的动物基因组 DNA 的提取方法有所差异<sup>[1-7]</sup>。该试验以血液中提取 DNA 的方法为基础<sup>[8]</sup>, 对母猪肝脏进行了基因组 DNA 的提取, 获得了一种从猪肝组织中获取 DNA 的有效方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品。**取自于河南新乡屠宰场刚屠宰的母猪肝脏, 用生理盐水除去肝脏表面的血渍, 超低温 (-70 °C) 冷冻保存。

**1.1.2 仪器。**高速冷冻离心机 (GL-20B 型, 上海安亭科学仪器有限公司); 超净工作台 (SW-CJ-1B, 苏州安泰空气技术有限公司); 旋涡混合器 (XW-80 型, 上海第一医院仪器厂); LENG GVANG 756 RT 紫外可见分光光度计 (上海金米科学仪器有限公司); 电热恒温水浴锅 (WSZ-133-65, 上海医疗器械三厂)。

**1.1.3 试剂<sup>[8]</sup>。**SSC 溶液: 氯化钠 8.77 g, 柠檬酸三钠 4.41 g, 溶于 800 ml 蒸馏水中, 调 pH 7.0, 定容至 1 000 ml; 0.25 mol/L 蔗糖柠檬酸液, 0.5 mol/L Tris-HCl, 25 % SDS, TE 缓冲液。试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 肝细胞浆细胞核的分离。**称取 5 g 冷冻的母猪肝脏, 剪碎, 加入 10 ml 预冷的 SSC 溶液, 将肝、研钵一同放入冰箱冷冻, 研磨, 再加入预冷的 SSC 溶液, 制成 1:6 肝匀浆, 用 2 层纱布过滤。滤液 3 000 r/min 离心 10 min, 用预冷的 1.5 % 柠檬酸液洗涤、沉淀 2 次, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 向沉淀中加 5 倍体积的 0.25 mol/L 蔗糖柠檬酸液, 搅匀; 另取离心管, 加入 0.88 mol/L 蔗糖柠檬酸液 9 ml, 将 0.25 mol/L 蔗糖柠檬酸液沿管壁轻轻铺在 0.88 mol/L 蔗糖柠檬酸液上层, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上层液, 沉淀即为肝细胞核。

**1.2.2 基因组 DNA 的提取。**将纯化的细胞核置于小烧杯内, 按每克肝脏加入 1~1.5 倍体积的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓

冲液, 搅拌并缓慢加入 25 % SDS 至最终浓度为 1.6 %, 加固体 NaCl 至最终浓度为 1 mol/L, 用玻璃棒连续搅拌 1 h, 溶液变得粘稠并略带透明, 使 DNA 与蛋白质分离。将上述溶液转入三角瓶, 按 1:1 体积加入预冷氯仿:异戊醇 24:1 溶液, 振荡 20 min, 转入离心管以 3 000 r/min 离心 25 min, 溶液分 3 层, 最下层是氯仿层, 中层是蛋白质, 上层是 DNA 抽提液。吸出上层液, 用 2 倍体积 95 % 冷冻乙醇沿管壁铺在抽提液上层, 静置 5 min, 摇动到 DNA 开始凝聚, 用 70 % 乙醇洗涤 DNA 数次, -20 °C 冷冻保存。

**1.2.3 基因组 DNA 的纯化。**将保存在 70 % 乙醇中的 DNA 15 000 r/min 离心 5 min 后, 弃去上清液, 向沉淀物中加 pH 8.0 TE 缓冲液 500  $\mu$ l, 常温下放置 12 h, 使其溶解, 取上清液 500  $\mu$ l 以 1:1 体积加 pH 8.0 苯酚, 混匀, 15 000 r/min 离心 5 min, 取上清液加同体积 25:24:1 的酚:氯仿:异戊醇溶液, 反复抽提, 取上清液并加入 3 mol/L 乙酸钠 (pH 5.4) 50  $\mu$ l、2.5 倍体积的冷乙醇后, 置于 -20 °C 保存 12~24 h, 融化后, 15 000 r/min 离心 5 min, 沉淀用 70 % 乙醇洗涤后, 在超净工作台上吹干, 加 TE 缓冲液溶解, -20 °C 保存备用。

**1.2.4 DNA 含量及纯度测定。**将样品稀释 10 倍, 以蒸馏水为空白, 分别在 260、280 nm 处用紫外可见分光光度计测定 DNA 稀释液的 OD 值。记录数据和曲线前, 均进行清除背景值的操作, 并且波长范围取 230~330 nm。通过式 (1), 确定 DNA 浓度或纯度。

$$[\text{DNA}] = 50 \times (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{310}) \times \text{稀释倍数} \quad (1)$$

DNA 样品的纯度判定方法: 当  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} > 1.8$ , 说明样品中存在 RNA;  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} < 1.6$ , 说明样品中存在蛋白质或酚;  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8$ , 说明样品中蛋白质含量低, DNA 纯度高。

**1.2.5 数据处理。**采用 dps 数据处理软件。

## 2 结果与分析

该试验对母猪肝脏进行了基因组 DNA 的提取与纯化, DNA 在 260 nm 和 280 nm 处吸收曲线见表 1 和图 1。

从表 1 可知,  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  的值为 1.70~1.80, DNA 产量约 200~450  $\mu$ g/ml, 说明提取的 DNA 无 RNA 和蛋白质或酚的污染, 纯度比较高, 满足分子生物学实验的要求。

## 3 讨论

肝脏组织基因组 DNA 的产量与肝脏组织 DNA 含量及

作者简介 韩芬霞 (1978-), 女, 河南新乡人, 助教, 从事遗传育种教学与科研工作。

收稿日期 2006-05-15

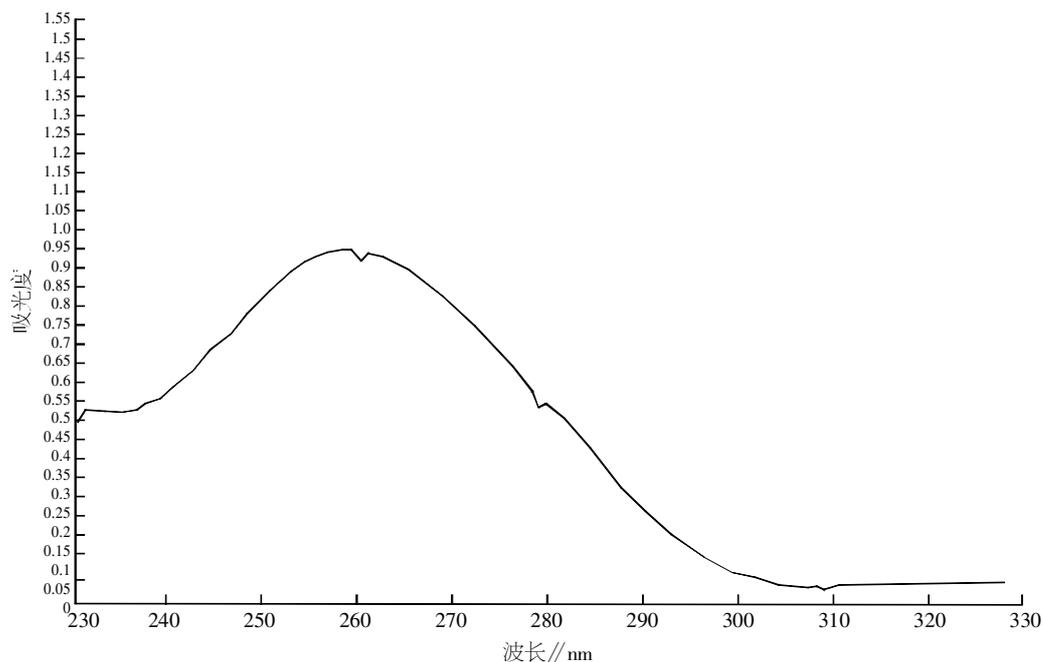


图1 肝脏 DNA 吸收曲线

表 1 提取基因组 DNA 的吸光度值

样号	肝重量//g	$A_{260nm}$	$A_{280nm}$	$A_{310nm}$	$A_{260nm}/A_{280nm}$	DNA 含量 $\mu\text{g/ml}$
1	5	0.408	0.237	0.015	1.72	196.5
2	7	0.570	0.326	0.015	1.75	278.5
3	9	0.701	0.399	0.013	1.76	344.5
4	11	0.876	0.502	0.012	1.75	430.5

样本数量相关,也与提取方法有关。提取基因组 DNA 要保证其 1 级结构的完整性,排除其他生物大分子(蛋白质、多糖、脂类等)以及 RNA 分子的污染,并且不存在过高浓度的有机溶剂和金属离子,以避免化学因素对核酸链中磷酸二酯键的破坏和对后续的酶反应产生抑制作用;同时,应尽量简化操作步骤,以减少提取过程中有害因素对核酸的破坏。该试验使用 SDS 破坏细胞膜、核膜,使蛋白质变性,有效去除核酸分子结合的蛋白质,从而游离出核酸,它主要用

来抑制核酸酶的活性,避免 DNA 被降解;加入氯仿也是为了使核蛋白变性,促使 DNA 分子释放,有效抑制核酸酶活性,去除带有 poly(A) 长链的 RNA。该试验所用试剂均为常见的化学试剂,不需要昂贵的生物试剂;试验仪器要求低,操作简单,完成一次提取过程仅需 5~6 h。

#### 参考文献

- [1] 袁玉荪.生物化学实验[M].北京:人民教育出版社,1979.
- [2] 高等医学院校协编.生物化学实验[M].贵州:贵州人民出版社,1988.
- [3] 袁玉苏,朱锋辉.生物化学实验[M].北京:高等教育出版社,1998.
- [4] 李永明,赵玉琪.实用分子生物学方法手册[M].北京:科学出版社,1998.
- [5] 张细权.动物遗传标记[M].北京:中国农业大学出版社,1997.
- [6] 汪永庆,王新国.一种动物基因组 DNA 提取方法的改进[J].动物学杂志,2001,36(1):27-29.
- [7] 奥斯伯 F,布伦特 R.精编分子生物学实验指南[M].颜子颖,王海林,译.北京:科学出版社,1998.
- [8] 樊武航,于小波.实用分子生物学手册[M].北京:科学出版社,1998.