

2 种提取猪肝基因组 DNA 方法的比较

周春丽, 刘华, 李玉萍^{*} (江西科技师范学院生命科学学院, 江西南昌 330013)

摘要 [目的]对2种猪肝基因组DNA提取方法,进行比较研究。[方法]分别采用试剂盒法和常规的氯仿/异戊醇抽提法,提取新鲜猪肝基因组DNA,并对其进行分析。[结果]试剂盒方法得到的DNA浓度较低,其 OD_{260nm}/OD_{280nm} 比值达到2.05,虽然蛋白质除的较干净,但是含RNA较高;而氯仿/异戊醇抽提法得到的DNA浓度高,其 OD_{260nm}/OD_{280nm} 比值1.88,纯度较高,且成本低。[结论]氯仿/异戊醇法对猪肝基因组DNA提取效果优于试剂盒法。

关键词 猪肝;基因组DNA;氯仿/异戊醇抽提法;试剂盒法;比较

中图分类号 S828 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)18-08355-02

Comparison of Two Methods of Genomic DNA Extraction from Pork Liver

ZHOU Chun-li et al (School of Life Science, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang, Jiangxi 330013)

Abstract [Objective] The research aimed to compare the two extraction methods of genomic DNA from pork liver. [Method] kit method and chloroform/ isoamyl alcohol extraction method were adopted to extract genomic DNA from fresh pork liver. [Result] The results showed that the DNA extraction kit could obtain high purity genomic DNA with low density, and high concentration, good quality and relatively low cost by chloroform/ isoamyl alcohol method. [Conclusion] The chloroform/ isoamyl alcohol extraction of genomic DNA is a more effective method of promoting and using in molecular studies on fresh pork liver.

Key words Pork liver; Genomic DNA; The chloroform/ isoamyl alcohol extraction; kit method; Comparison

组织或血液中基因组DNA (genomic DNA, gDNA) 提取作为分子生物学试验的关键一步,是分子生物学研究的基础。另外,DNA的抽提还是分子标记如RFLP技术、RAPD技术等研究前提,而这些技术在动物个体鉴定、家系分析、居群遗传、基因定位连锁图构建、疾病诊断等方面都有广泛的应用。目前基因组DNA提取方法多种多样,主要包括酚/仿抽提法、甲酰胺解聚法、异丙醇沉淀法、试剂盒快速抽提法、SDS裂解法^[6-7]等,均能有效获得大分子基因组DNA。随着科技的不断发展,分子生物学方法也在不断改进,市场上涌现出各种DNA检测试剂盒,因此选择一个快速、简便、毒性小的DNA提取方法十分重要。同时,研究还表明不同物种的基因组DNA的最佳提取方法,也是不尽相同的^[1-5]。笔者尝试用试剂盒法和氯仿/异戊醇法,来对新鲜猪肝的基因组DNA进行抽提,以期找到最佳的提取方法。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器 新鲜猪肝;0.1 mol/L NaCl-0.05 mol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH=6.8);NaCl固体粉末;质量百分比浓度为95%的 C_2H_5OH ;质量百分比浓度为5%的SDS溶液; $V(CHCl_3):V(C_5H_{12}O)=20:1$;SORVALL Evolution RC型离心机;LAMBDA 35型紫外分光光度计;电子天平;匀浆器;Heraeus烘箱。

1.2 方法

1.2.1 氯仿/异戊醇抽提法。①称取猪肝1g,用匀浆器磨碎(冰浴),加入2ml 0.1 mol/L NaCl-0.05 mol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH=6.8),然后再研磨,直至细胞破碎,倒出匀浆物。在14 000 r/min下离心10 min,收集沉淀,加入3.12 ml 柠檬酸钠缓冲液,于4 000 r/min离心20 min,收集沉淀。②往沉淀中依次加入5 ml 0.1 mol/L NaCl-0.05 mol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH=6.8),2.5 ml $CHCl_3-C_5H_{12}O$ 混合液,0.5 ml 质量百分比浓度为5%的SDS溶液,使其终质量百分比浓度为0.41%。振荡20 min,缓慢加固体NaCl,使其终浓度为1 mol/L(约0.45 g)。将上述混合液在3 500 r/min,离心20 min,收集上清水相。③在上述上清水相加入等体积 $CHCl_3-C_5H_{12}O$ 混合液,8 000 r/min,离心5 min,收集上清水相。④向上述上清水相中加入等体积95%乙醇(冰),10 000 r/min,5 min,收集沉淀。⑤在上述沉淀中加入1 ml的无水 C_2H_5OH ,待自然挥发干乙醇,加入10 ml ddH₂O,测 OD_{260nm} 和 OD_{280nm} ,并计算 OD_{260nm}/OD_{280nm} 的比值。

1.2.2 试剂盒法。选用够于北京天为时代科技有限公司的TIAN amp Genomic DNA Kit 血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒,按照使用说明书的步骤进行。①取新鲜猪肝10 mg研磨成细胞悬液,然后10 000 r/min,离心1 min,除去上清,加入200 μ l 缓冲液GA,震荡至彻底悬浮。②加入20 μ l 蛋白酶K溶液,混匀,在56 $^{\circ}C$ 放置,直至组织溶解,简短离心以去除管盖内壁的水珠。③加220 μ l 缓冲液GB,充分颠倒混匀,70 $^{\circ}C$ 放置10 min,溶液应变清亮,简短离心以去除管盖内壁的水珠。④加220 μ l 无水乙醇,充分振荡混匀15 s,此时可能会出现絮状沉淀,简短离心以去除管盖内壁的水珠。⑤将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱 C_{BB} 中,12 000 r/min离心30 s,倒掉废液,将吸附柱 C_{BB} 放入收集管中。⑥向吸附柱 C_{BB} 加入500 μ l 去蛋白液GD,12 000 r/min,离心30 s,倒掉废液,将吸附柱 C_{BB} 放入收集管中。⑦向吸附柱 C_{BB} 中加入700 μ l 漂洗液PW,12 000 r/min,离心30 s,倒掉废液,将吸附柱 C_{BB} 放入收集管中。⑧向吸附柱 C_{BB} 中加入500 μ l 漂洗液PW,12 000 r/min,离心30 s,倒掉废液。⑨将吸附柱 C_{BB} 放回废液收集管中,12 000 r/min,离心2 min,目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除,将吸附柱 C_{BB} 置于室温或50 $^{\circ}C$ 烘箱放置数分钟,以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。⑩将吸附柱 C_{BB} 转入一个干净的离心管中,向吸附膜的中间部位悬空滴加50~220 μ l 经水浴预热的洗脱缓冲液TE,室温放置2~5 min,12 000 r/min,离心30 s。⑪向离心得

基金项目 江西科技师范学院院级项目(2006);江西省教育厅科技项目(赣教技字[2007]285号);江西科技师范学院博士科研启动基金(2005)。

作者简介 周春丽(1979-),女,河南周口人,在读硕士,讲师,从事功能性食品研究。* 通讯作者。

收稿日期 2009-03-18

到的溶液再加入吸附柱 C_{18} 中,室温放置 2 min,12 000 r/min,离心 2 min。②测 OD_{260nm} 和 OD_{280nm} ,并计算 OD_{260nm}/OD_{280nm} 的比值。

1.2 DNA 样品纯度及质量检测 将 2 种方法提取的 DNA 溶液稀释 4 倍,在 LAMBDA 35 型紫外分光光度计上直接测定,并记录 DNA 样品的浓度、光密度 OD_{260nm} 和 OD_{280nm} 。

表 1 新鲜组织基因组 DNA 的检测结果

Table 1 Testing results of genomic DNA from fresh tissue

提取方法	A_{260nm} (原液)	A_{280nm} (原液)	OD_{260nm}/OD_{280nm} (原液)	A_{260nm} (稀释 4 倍原液)	A_{280nm} (稀释 4 倍原液)	OD_{260nm}/OD_{280nm} (稀释 4 倍原液)
Extraction method	Original solution	Original solution	Original solution	Dilution four times original solution	Dilution four times original solution	Dilution four times original solution
氯仿/异戊醇抽提法						
Chloroform/isoamyl alcohol extraction method	3.010	1.858	1.62	1.793	0.951	1.88
试剂盒法 Kit method	1.539	0.882	1.74	0.491	0.239	2.05

3 结论与讨论

DNA 作为分子生物学研究的基础,其提取方法多种多样,包括酚/仿抽提法、甲酰胺解聚法、异丙醇沉淀法、试剂盒快速抽提法、SDS 裂解法^[6-7]等,均能有效获得大分子基因组 DNA。该试验中,采用试剂盒法和氯仿/异戊醇抽提法,来提取新鲜猪肝的基因组 DNA,2 种方法取材和研磨过程基本一致。试剂盒法优点是,不需要进行反复的抽提,操作简便,节省时间,但其缺点是样品取材少,DNA 获得率低,成本高,使用次数有限,不适合大样本量的提取试验。氯仿/异戊醇抽提法成本较低,在试验过程中,每隔 20 min 上下颠倒摇动几次,动作尽量轻柔,可以减少 DNA 断裂的机会。整个试验过程中,所用试剂种类少,操作简便,DNA 获得率高,适于大量提取。用 $V(CHCl_3):V(C_5H_{12}O)=20:1$ 溶液代替苯酚抽提,降低了苯酚残存对 DNA 质量的影响,避免了苯酚对人体的危害,用 $-20^{\circ}C$ 预冷的无水乙醇代替异丙醇沉淀 DNA,降低了成本,简化了操作。这种方法和韩芬霞^[8]在对猪肝基因组 DNA 提取方法有很多相同之处,所用试剂也基本一致。

提取基因组 DNA 是现代分子生物学研究开始的关键,提取 DNA 首要的是保证其一级结构的完整性,排除其它生物大分子的污染以及核酸分子之间的污染,尽量简化操作步

2 结果与分析

由表 1 可知,氯仿/异戊醇抽提法的 OD_{260nm}/OD_{280nm} 比值为 1.88,纯度较高,且浓度也高;试剂盒方法 OD_{260nm}/OD_{280nm} 比值达到 2.05,大大超过了 1.80,表明虽然蛋白质除的较干净,但含 RNA 较高,且浓度也较低。由此可见,在抽提猪肝 DNA 方法中,应该选择传统的氯仿/异戊醇抽提法。

骤,不但可节省时间,更重要的是,可减少提取过程中各种有害因素对核酸的破坏。因此,一个好的提取 DNA 的方法或试剂盒,应该是在保证 DNA 质量的前提下便捷而高效的。该试验中氯仿/异戊醇抽提法,所用试剂均为实验室常规化学试剂,不需购买昂贵的生物试剂,试验仪器要求也不高,完成一次提取过程仅需 4~5 h,省时省力,是一种简便、可行的提取动物组织 DNA 的方法。

参考文献

- [1] 赵帆,方刚,王咏梅.一种简单、快速的血和组织中的提取 DNA 方法[J].生命的化学,1994,14(4):26-27.
- [2] 霍金龙,罗古月,张娟,等.从猪血中提取高质量基因组 DNA 的研究[J].上海畜牧兽医通讯,2004(3):22-23.
- [3] 赵嘉惠,张华屏.外周血 DNA 提取方法的比较及改良[J].山西医科大学学报,2006,37(1):12-13.
- [4] SU B, WANG Y X, LAN H, et al. Phylogenetic study of complete cytochrome b genes in musk deer (genus Moschus) using museum samples[J]. Mol Phylog Evol, 1999, 12(3):141-249.
- [5] 蔡振媛,张同作,连新明,等.一种提取动物基因组总 DNA 的野外样品保存方法[J].四川动物,2006,25(3):473-477.
- [6] 范武江,王晓清,物品红,等.鱈鱼不同组织基因组 DNA 提取方法的探讨[J].南方水产,2007,3(2):44-47.
- [7] 萨姆布普克 J,拉塞尔 D W.分子克隆实验指南[M].3版.北京:科学出版社,2002:463-469.
- [8] 韩芬霞.对猪肝基因组 DNA 提取与纯化的研究[J].甘肃畜牧兽医,2006,36(6):18-20.

(上接第 8354 页)

活性显示由强变弱、再变强的趋势。这与陈禅友和刘磊的研究结果相似^[8]。香果树种子萌发过程中 SOD 同工酶出现这种变化规律可能是由于 SOD 作用在于清除植物体内的活性氧,在萌发初期的作用主要是清除种子休眠期产生的有害代谢产物,萌发后期主要是清除积累的代谢产物,而在种子正常萌发的条件下体内活性氧含量低,因此种子萌发中期 SOD 活性降低。

参考文献

- [1] 国家林业局国有林和林木种苗工作总站.中国木本植物种子[M].北京:中国林业出版社,2000:940-943.
- [2] 罗祖筠,杨成华.贵州珍贵稀有树种[M].贵阳:贵州人民出版社,1987:195-198.
- [3] 傅立国,金鉴明.中国植物红皮书——稀有濒危植物(第一册)[M].北京:科学出版社,1992:568-569.
- [4] 杨和平,程并辰.植物体细胞胚胎发生的生理生化研究进展[J].植物

学通报,1991,8(2):1-8.

- [5] 甘鹏,陈发菊,梁宏伟.珍稀濒危植物香果树种子萌发特性研究[J].种子,2006,25(5):27-34.
- [6] 顾玉红.文冠果体细胞胚胎发生及形态建成机理的研究[M].北京:北京林业大学,2005:46-49.
- [7] 何志效,张树政.电泳[M].北京:科学出版社,1999:284-286.
- [8] 陈禅友,刘磊.长豇豆种子萌发过程中生理生化指标动态变化[J].种子,2006,25(9):30-33.
- [9] 张帆,梁宏伟,熊丹.香果树种子萌发过程中生理生化变化的研究[J].种子,2007,26(10):21-23.
- [10] 赵会君,张怀刚,王海庆.抗旱性不同的春小麦品种籽粒萌发期 α -淀粉酶活性及其同工酶分析[J].麦类作物学,2008,28(4):633-637.
- [11] 陈爱国,陈进红.胚芽鞘的伸长机理和生理生态响应[J].山东农业大学学报:自然科学版,2002,33(4):438-441.
- [12] 张华,孙永刚,张帆,等.外源一氧化氮供体对渗透胁迫下小麦种子萌发和水解酶活性的影响[J].植物生理与分子生物学学报,2005,31(3):241-246.
- [13] CRAFTS-BRANDNER S J. Phosphorus nutrition influence on leaf senescence in soybean[J]. Plant Physiol,1992,98(3):1128-1132.