

文章编号:1005-8737(2000)04-0116-03

·研究简报·

乙醇固定中华绒螯蟹组织的DNA提取方法

A method for obtaining DNA from ethanol-fixed tissues of *Eriocheir sinensis*

魏育红¹, 薛仁宇¹, 曹广力¹, 贡成良¹, 陈伟刚², 吕梅良²

(1. 苏州大学 基因工程实验室, 江苏 苏州, 215151; 2. 吴县市水产局, 江苏 苏州 215100)

WEI Yu-hong¹, XUE Ren-yu¹, CAO Guang-li¹, GONG Cheng-liang¹, CHEN Wei-gang², LU Mei-liang²

(1. Gene Engineering Lab of Suzhou University, Suzhou, 215151, China; 2. Wuxian Fisheries Bureau, Suzhou 215100, China)

关键词: 中华绒螯蟹; 乙醇固定; DNA提取

Key words: *Eriocheir sinensis*; ethanol-fixed tissue; extraction of DNA

中图分类号: Q523; Q959.223

文献标识码: A

由于 RAPD 技术简单、灵敏度高、设备要求不高、工作成本低和研究周期短等优点, 已经在生物、医学领域被广泛地使用。张德春等^[1]曾提出可用于 RAPD 分析的鱼类血样乙醇保存方法。考虑到乙醇固定标本应用范围广, 且乙醇对 DNA 的保护作用明显、时间长等优点, 笔者直接采用 75% 的乙醇固定中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*, 河蟹) 肌肉组织, 初步研究了如何经乙醇固定的河蟹肌肉组织中提取 DNA 的方法, 作为进一步在分子水平研究河蟹基因的基本参考。以往未见有关这方面的研究报道。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

1.1.1 材料 中华绒螯蟹采自吴县阳澄湖大闸蟹养殖示范区。用 75% 乙醇固定 16 个月以上。

1.1.2 试剂 Protease K、Taq DNA、4 dNTPs 为宝灵曼公司产品, 随机引物由浙江博联中心提供, 其余 3 mol/L NaAc、0.5% SDS+1 mol/L NaCl(下为 SDS+NaCl)、TE(pH 8.0)、TE(pH 8.0)+0.5% SDS(下为 SDS+TE)、饱和酚等按常规方法制备^[2]。

1.2 方法

1.2.1 预处理 取经乙醇固定的河蟹肌肉组织, 用滤纸吸去乙醇, 加入双蒸水充分研磨后以 500 μ l/管分装到各 1.5 ml 离心管中, 4℃ 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 再加双蒸水, 悬浮细胞, 重复离心弃上清, 以尽量洗去乙醇。必要时可

重复。

1.2.2 总体提取方案筛选 分别以 SDS+NaCl、SDS+TE、TE 系统, 加 Protease K 55℃ 保温 1 h 进行裂解比较, 方案见表 1。去蛋白按常规进行^[2]。分别用加 3 mol/L NaAc 和不加 3 mol/L NaAc 直接用 2 倍体积 95% 的冷乙醇沉淀核酸, 经 75% 乙醇洗盐、干燥后溶于 40 μ l 双蒸水中。在表 1 试验结果的基础上, 初步筛选出一个总体提取方案, 再分别进行进一步的比较试验。

表 1 细胞裂解液的各种组成方案

Table 1 Composition of cell lytic solution μ l

序号 No	SDS+ NaCl	SDS+ TE	NaCl	TE	Protease K	沉淀用 NaAc
A	470				30	
B	250	220			30	
C	167	303			30	
D		387	83		30	
E		420	50		30	
F			83	387	30	
G			50	420	30	
H	500					
I	250	250				
J	167	333				
K		417	83			
L		450	50			
M			83	417		
N			450	50		
O		500				44
P		500				80
Q				500		44
R				500		80
S	500					44
T		417	83			44

收稿日期: 2000-04-25

基金项目: 江苏省教委资助项目(99KJB240001); 苏州市科委资助项目(SNZ-9831-1)

作者简介: 魏育红(1959-), 女, 苏州大学水产学院讲师, 从事水产生物学教学和研究。

1.2.3 不同 Protease K 浓度裂解效果比较 取湿重 0.268 0 g 河蟹肌肉组织磨碎后平均加到 4 个 1.5 ml 离心管中,经上述预处理后,分别加入不同比例的 Protease K 和 SDS+NaCl 进行比较。

1.2.4 不同稀释倍数的沉淀效果比较 将湿重 0.272 0 g 固定的肌肉组织预处理后加 1 000 μ l SDS+NaCl 和 Protease K 40 μ l 经 55℃ 保温 1 h 后抽提 DNA,然后将样品平均分装到 5 个 1.5 ml 离心管中,分别加不同量的双蒸水稀释后再加总体积 2 倍的 95% 冷乙醇进行沉淀,其中 3、4、5 号各分 2 管沉淀,干燥后再溶解合并。总体积为 20 μ l。

1.2.5 RAPD 反应 参考邱涛^[3]反应设计为:10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ l, 25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μ l, 4 dNTPs 1 μ l, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ l, 引物 1 μ l, 模板 DNA 1 μ l, 双蒸水 17.5 μ l。93℃ 预变性 7 min 后,按 93℃ 45 s, 38℃ 60 s, 72℃ 90 s 扩增 40 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。

2 结果

2.1 总体提取方案的确定

图 1 显示总体筛选提取方案的结果。用 SDS+NaCl 加 Protease K 裂解细胞,不加 NaAc 直接用冷乙醇沉淀,可以获得比较满意的 DNA,而用通常新鲜或冰冻组织提取核酸的方法^[2],则检测不到 DNA。加 NaAc 沉淀核酸效果更差。由此确定,选用 SDS+NaCl 系统加 Protease K 组成裂解液来提取经乙醇固定组织的 DNA,加入双蒸水稀释后直接沉淀这一方案。

2.2 加 Protease K 后的裂解结果

用 SDS+NaCl 加 Protease K 来裂解细胞,最后得到的 DNA 通过紫外扫描结果见表 2。其中,3 号样品 DNA 含量最高,2 号样品 DNA 纯度较好。

表 2 不同 Protease K 裂解后得到的 DNA 紫外扫描结果

Table 2 Result of DNA ultraviolet spectrum with different Protease K

试剂 Solvent	样品号 Sample			
	1	2	3	4
Protease K/ μ l	0	10	20	30
5% SDS+NaCl/ μ l	500	490	480	470
260 nm	0.039 2	0.173 0	0.195 8	0.085 2
280 nm	0.012 8	0.092 7	0.115 7	0.046 8
260/280	1.82	1.69	1.87	3.06
稀释倍数 Diluted times	58.69	38.50	58.69	58.69
DNA 浓度/((μ g· μ l ⁻¹))	0.115 0	0.333 0	0.574 5	0.250 0

2.3 稀释沉淀的结果

提取的 DNA 水相经不同稀释后再沉淀,紫外扫描图谱见图 2,紫外分析结果见表 3。其中,3 号纯度最高;2 号浓度最高,表明经适当地稀释直接用冷乙醇来沉淀效果显著,稀释倍数控制在 3 倍左右。用 2 号样品作为 DNA 模板,随机选用 B2、B6、B14、O13、O14、M14 随机引物进行 RAPD 扩增,

结果见图 3。

表 3 经不同稀释处理后紫外扫描结果

Table 3 Result of DNA ultraviolet spectrum with different dilution

项目 Item	样品号 Sample				
	1	2	3	4	5
样品总体积 Volume	265	265	265	265	265
加双蒸水 Double distilled water	0	135	335	535	735
总体积 Total volume	265	400	600	800	1 000
稀释倍数 Diluted times	0	0.509	1.264	2.018	2.773
260 nm	0.628 2	0.958 5	0.622 7	0.610 0	0.622 9
280 nm	0.238 7	0.427 3	0.349 4	0.330 9	0.269 9
260/280	2.631 8	2.243 1	1.782 1	1.842 1	2.037 8
DNA 浓度/((μ g· μ l ⁻¹))	0.314 1	0.479 2	0.311 3	0.305 0	0.311 4

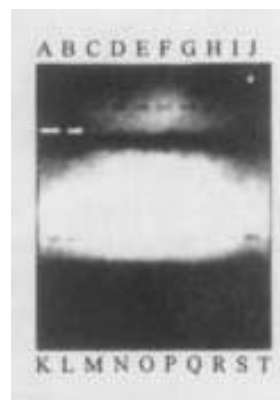


图 1 用不同细胞裂解液提到的 DNA 电泳结果

Fig.1 Result of DNA with different cell lytic solution

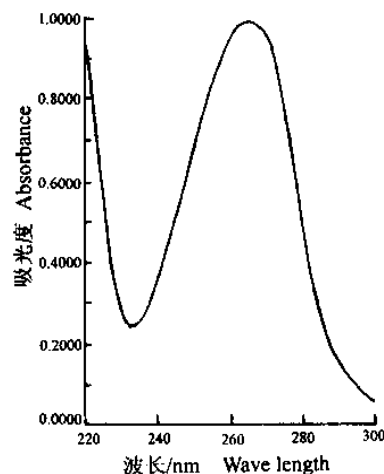


图 2 DNA 样品紫外扫描曲线

Fig.2 Ultraviolet curve of DNA sample

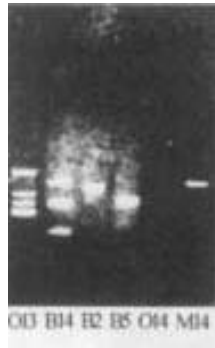


图3 RAPD 结果

Fig.3 RAPD result

因此,使用 SDS + NaCl 480 μ l 再加 20 μ l Protease K 来裂解乙醇固定的细胞,并将稀释后的水相 DNA 再用冷乙醇沉淀,得到的 DNA 质量完全符合进行 RAPD 分析的要求。

3 讨论

(1)本研究中,河蟹组织中的蛋白质已被乙醇固定,时间较长,而用通常新鲜或冰冻组织的提取方法,细胞核比较难被破裂,且在细胞核内的 DNA 一经离心很容易沉淀到离心管底,就难以被提到。采用 SDS + NaCl 加 Protease K 裂解细胞,增加蛋白酶 K 的浓度,由于盐的浓度被调整在 DNA 溶解度较大的浓度上,一方面增加了 DNA 的溶解,另一方面由于盐的渗透压作用增强了核膜破裂作用,使 DNA 的得率有

较大的提高。溶解在水相中的 DNA 往往跟蛋白质或细胞碎片缠在一起,加入浓度较大的蛋白酶 K 可以有效地分解蛋白质,特别是已被长期固定的蛋白质,从而减少了 DNA 缠在蛋白质上的量。

(2)DNA 最易沉淀时的 NaCl 浓度为 0.2 mol/L。用 SDS + NaCl 裂解细胞,因在裂解细胞时已经有了一定的盐浓度,如果最后再加入 NaAc 后用冷乙醇来沉淀,由于过高的盐浓度,反而使 DNA 不易沉淀。采用稀释待沉淀的水相 DNA 是为了调整 NaCl 沉淀 DNA 的浓度,在调低 NaCl 浓度后, DNA 的溶解度下降,同时 RNA 的溶解度上升,从而达到提高 DNA 纯度的目的。在 NaCl 溶液中,稀释倍数主要依据调整使待沉淀的 DNA 溶液中 NaCl 的浓度接近 0.2 mol/L,并在操作中视具体情况而定。从所提到的 DNA 样品来分析, DNA 的纯度主要受 RNA 含量的影响,如有必要可酌情加入 RNA 酶来降解样品中的 RNA。

综上所述,乙醇保存河蟹组织对河蟹 DNA 的保护作用明显,即用 SDS + NaCl 加 Protease K 来裂解细胞,经常规去蛋白,再进行适当稀释后直接用冷乙醇来沉淀的整个 DNA 提取方法是可靠的。

参考文献:

- [1] 张德春,杨代淑,李晓迎,等.用于 RAPD 分析鱼类血样乙醇保存方法研究[J].淡水渔业,1998,28(2):9-11.
- [2] 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯.分子克隆实验指南[M].第2版.北京:科学出版社,1995.463-468,921-928.
- [3] 邱涛,陆仁后,项超美,等.用 RAPD 技术识别中华绒螯蟹性别差异[J].水产学报,1998,22(2):175-177.