

文章编号:1005-8737(2001)02-0014-03

紫菜基因组 DNA 提取及酶切

刘必谦¹, 周湘池¹, 王亚军¹, 俞小燕²

(1. 宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211; 2. 绍兴市第一中学, 浙江 绍兴 312000)

摘要:利用两种市售的 DNA 提取试剂盒对几种紫菜进行基因组 DNA 提取。该方法需要的组织量少, 需时短, 获得的基因组 DNA 纯度高, 可被 AFLP 内切酶, 特别是 *EcoR* I 完全酶切, 完全满足 AFLP 研究的需要。不同的 DNA 提取方法及提取出的基因组 DNA 的质量对酶切效果及以后的实验结果有影响。

关键词:基因组 DNA; DNA 提取; 酶切; AFLP; 紫菜

中图分类号:Q349⁺.53; Q949.29⁺.2.1

文献标识码:A

AFLP (amplified fragment length polymorphism) 技术由于具有高度可重复性, 并且不需事先了解被研究对象的基因组知识, 研究只需微量 DNA, 因此被广泛应用于多种研究中^[1-6]。但 AFLP 技术要求高纯度的基因组 DNA 作为模板。大型海藻由于含大量的海藻多糖, 常用的基因组 DNA 提取方法(如 SDS 或 CTAB 法)不能完全除去多糖。Hong 等^[7-9]提出并改良了用于紫菜 DNA 提取的 LiCl 法; 郭宝太等^[10]也对紫菜基因组 DNA 提取进行了报道。这些方法对植物组织需求量较大, 不适用于个体体积小的紫菜(如圆紫菜、铁钉紫菜等)。本研究提取的高纯度紫菜基因组 DNA, 完全能满足 AFLP 技术的需要, 特别适合于个体体积很小的物种。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 紫菜 野生圆紫菜、铁钉紫菜采自浙江舟山普陀, 栽培坛紫菜采自宁波北仑紫菜养殖场。活体风干后置冰箱冷冻保存。

1.1.2 DNA 提取试剂盒 美国 Roche 公司的

DNA Isolation Kit for Cell and Tissue 和上海生工公司的 UNIQ-10 小量柱式基因组 DNA 提取试剂盒。

1.1.3 λ DNA 和内切酶 购自上海生工公司。

1.2 DNA 提取方法

几种紫菜分别称取 10~20 mg 叶片(圆紫菜和铁钉紫菜为整个个体), 液氮研磨。提取步骤分别按厂家的说明书进行(需另添加 RNase)。

1.3 酶切

酶切取 λ DNA 600 ng, 基因组 DNA 约 500 ng, 酶各 5 单位。*EcoR* I 和 *Pst* I 37℃ 温育 1 h; *Taq* I 和 *Tru* II 56℃ 温育 1 h。

1.4 电泳

酶切结果用 1.5% 琼脂糖电泳, 60 V 电泳 3 h。电泳结果在紫外分析仪上观察并摄影。

2 结果与分析

从紫菜基因组 DNA 琼脂糖电泳图(图 1)看。DNA 的纯度高, 无 RNA、蛋白质和多糖杂质。第 1 道加样量是其他道的 2 倍, 所以比其他道要亮。第 4 道是重量不足 10 mg 的圆紫菜, DNA 浓度比其他紫菜低。图 2 是紫菜基因组 DNA *EcoR* I 的酶切图, 第 1 道是没有酶切的紫菜基因组 DNA, 第 2 道是紫菜 DNA *EcoR* I 酶切结果, 第 3 道是没有酶切的 λ DNA, 第 4 道是 λ DNA *EcoR* I 酶切结果, M 为

收稿日期:2000-07-04

基金项目:国家自然科学基金资助项目(49976030), 浙江省自然科学基金资助项目(D9986101)

作者简介:刘必谦(1960-), 男, 副研究员, 博士, 从事分子遗传育种研究。

λ DNA/*EcoR* I。图 3 是 4 种内切酶的酶切图,第 1 道是没有酶切的 λ DNA,第 2、4、6 和 8 道分别是 λ DNA *Pst* I、*Mse* I、*Taq* I 和 *EcoR* I 的酶切结果,第 3、5、7 和 9 道分别为紫菜基因组 DNA *Pst*

I、*Mse* I、*Taq* I 和 *EcoR* I 的酶切结果。紫菜基因组 DNA 的 *Pst* I、*Mse* I 和 *EcoR* I 酶切片段较大, *Taq* I 的酶切片段基本覆盖整个泳道, smear 主要集中在阴极端,所以不如其他 3 种的亮。

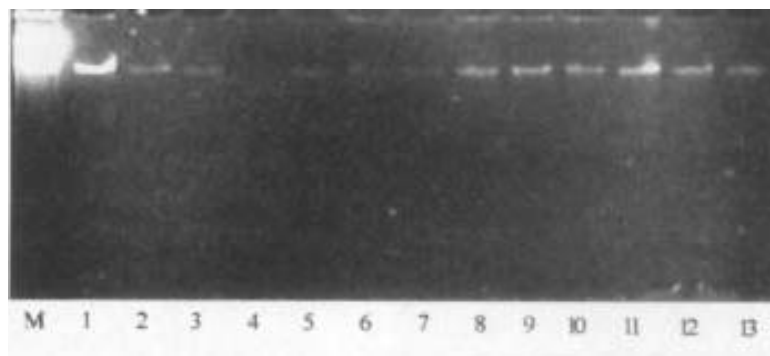


图 1 紫菜基因组 DNA 提取电泳图(M: λ DNA)

Fig.1 Photograph of extracted genomic DNA from *Propyria*

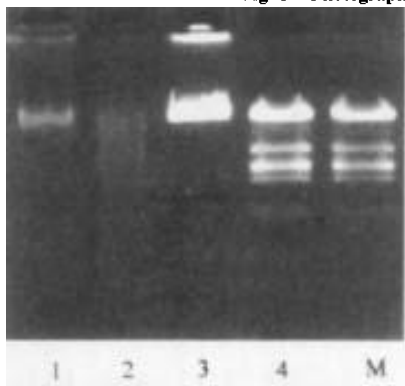


图 2 基因组 DNA *EcoR* I 酶切结果

Fig.2 Digestion patterns of genomic DNA with *EcoR* I (M: λ DNA/*EcoR* I)

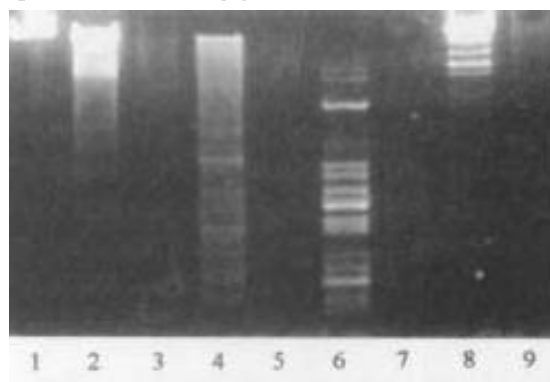


图 3 基因组 DNA 4 种内切酶酶切结果

Fig.3 Digestion patterns of genomic DNA with four endonucleases (Lane 3: *Pst* I; Lane 5: *Mse* I; Lane 7: *Taq* I; Lane 9: *EcoR* I)

3 讨论

(1)内切酶片段数与扩增的条带数成正比,扩增的带越多,提供的信息就越丰富,所以有必要对内切酶进行预选。*EcoR* I、*Mse* I 和 *Taq* I、*Pst* I 都是 AFLP 技术中常用的内切酶对。AFLP 内切酶对是针对陆生植物设计的,在陆生植物中,每对引物的扩增产物一般在 50 左右,但在海洋植物角叉菜中平均每对引物不到 16 条带^[5](*EcoR* I 和 *Mse* I 内切酶对);紫菜中,本试验也只观察到十几条带(*EcoR* I 和 *Mse* I 内切酶对)。 *Mse* I 和 *Taq* I 均为 4 碱

基内切酶,识别位点分别为 TTAA 和 TCGA。由图 3 可见,在紫菜基因组 DNA 中,后者的酶切位点要比前者丰富得多。我们在紫菜 RAPD 研究中发现,随机引物 CG 含量高,容易获得扩增结果, *Mse* I 和 *Taq* I 酶切结果的差异是否与紫菜基因组 DNA 的 CG 含量有关尚待进一步证实。

(2)Hong 等^[8]用 LiCl 方法提取的紫菜基因组 DNA 可以被 *Hind* III 酶切,但 *EcoR* I 对其不起作用,Hong 等^[7-9]认为紫菜基因组 DNA 不能被 *EcoR* I 所酶切。而本文所采用的两种试剂盒提取的紫菜基因组 DNA 如图 2、3 所示,都可以被 *EcoR* I 所完

全酶切。所以 *EcoR* I 不能酶切紫菜基因组 DNA, 并不是紫菜基因组 DNA 没有 *EcoR* I 的酶切位点, 而是 DNA 不纯(仍含有少量多糖)。在 DNA 相同的情况下, *Pst* I、*Mse* I、*EcoR* I 和 *Taq* I 4 种酶中, *EcoR* I 对 DNA 纯度的要求最苛刻。

(3) 为了得到高纯度的基因组 DNA, Hong 等^[8]对 DNA 粗提取物进行琼脂糖电泳分离纯化。郭宝太等^[10]则用 glassmilk 纯化, 费时较长, 步骤多, 也不经济。同时植物组织的用量较多。在种间或种群遗传多样性等研究中, 必须以个体为研究单位, 而有些类型的紫菜个体很小(圆紫菜的最大个体湿标本直径不超过 3 cm), 无法用上述方法提取 DNA。AFLP 研究中基因组 DNA 用量可以少到 0.1~1 ng^[3], 对于如圆紫菜这样的种类, 使用本实验方法, 整个过程仅需 1~2 h, DNA 在质量和数量上都可满足 AFLP 的技术要求。另外, 郭宝太等^[10]的方法中, DNA 提取前先用海螺酶游离出叶片细胞, 如果海螺酶为粗提物, 酶液中难免混有海螺细胞或海螺的 DNA, 这种方法提取的紫菜基因组 DNA 作为 PCR 反应中的模板物, 有可能影响实验的结果。

参考文献:

[1] Vos P, Hogers R, Bleek M, et al. AFLP: a new technique for

DNA fingerprinting[J]. Nucl Acids Res, 1995, 23: 4 407-4 414.

[2] Lin J J, Kou J, Ma J. A PCR - based DNA fingerprinting technique; AFLP for molecular typing of bacteria[J]. Nucl Acids Res, 1996, 24: 3 649-3 650.

[3] Rosendahl S, Taylor J W. Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLPTM[J]. Mol Ecol, 1996, 6: 821-829.

[4] Vos P, Kuiper M. AFLP analysis[A]. DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews [C]. New York: Wiley - VCH, 1998. 115-131.

[5] Donaldson S L, Chopin T. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) as a source of genetic markers for red algae[J]. J Appl Phycol, 1998, 10(3): 365-370.

[6] Virk P S, Newbury H J, Jackson M K, et al. Are mapped markers more useful for assessing genetic diversity? [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 607-613.

[7] Hong H K, Coury D A, Polne - Fuller M, et al. Lithium chloride extraction of DNA from the seaweed *Porphyra perforata* (Rhodophyta) thallus[J]. J Phycol, 1992, 28(3): 717-720.

[8] Hong H K, Kim S D, Polne - Fuller M, et al. DNA extraction condition from *Porphyra perforata* using LiCl[J]. J Appl Phycol, 1995, 7(1): 101-107.

[9] Hong H K, Sohn C H, Lee K W, et al. Nucleic acid extraction from seaweed tissues for polymerase chain reaction [J]. J Mar Biotechnol, 1997, 5: 95-99.

[10] 郭宝太, 毕玉平, 单 雷, 等. 条斑紫菜高纯度总 DNA 及其质粒 DNA 的提取[J]. 海洋学报, 2000, 22(2): 87-91.

Extraction and restriction digestion of genomic DNA from *Porphyra*

LIU Bi-qian¹, ZHOU Xiang-chi¹, WANG Ya-jun¹, YU Xiao-yan²

(1. Life Sciences & Biotechnology College, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. No. 1 Middle School of Shaoxing, Shaoxing 312000, China)

Abstract: High quality genomic DNA were extracted from *Porphyra* species with the DNA Isolation Kit for cell and Tissue (Roche). The results show this method is of special advantage to analyze the extraction from small sized samples. The genomic DNA extracted can be completely digested in AFLP research by the restriction endonucleases such as *EcoR* I, *Mse* I, *Taq* I and *Pst* I, et al, which is not the case reported that 'Porphyra genomic DNA could not be restricted by *EcoR* I'. The effects of model DNA quality on restriction digestion in AFLP and the problems in some other extracting methods previously reported are discussed also.

Key words: genomic DNA; DNA extraction; restriction digestion; AFLP; *Porphyra*