

动物科学

3 种不同方法对标本基因组 DNA 固定和抽提效果研究*

黄 为, 赵元著, 唐安科

(重庆市动物生物学重点实验室 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 400047)

摘 要 利用常规基因组 DNA 抽提方法,对分别用甲醛、乙醇、聚乙二醇 3 种固定液固定的鲫(*Carassius auratus*)肌肉样品基因组 DNA 提取进行了比较研究。结果表明 5% 甲醛保存的样品很难提取到完整的基因组 DNA,乙醇 95% 和聚乙二醇(分子量为 600)保存的样品均能成功提取出基因组 DNA,并能成功地进行 18S rDNA 的扩增。同时探讨了不同固定方法对基因组 DNA 提取的影响。

关键词 DNA 提取 聚乙二醇 固定方法

中图分类号 Q33

文献标识码 A

文章编号 1672-6693(2008)02-0020-05

目前,分子系统学相关方法已经被广泛应用于物种的分类学研究之中^[1-10]。其利用获得的特定靶基因进行序列的分析并构建分子系统树,结合形态、生理等经典分类学研究方法,就可以从多个层面上研究物种的多样性和亲缘关系。分子系统学的研究首先必须获取含有足够遗传信息的生物样品和高质量的 DNA,所以利用活体样本作为提取 DNA 的材料是最理想的。然而,由于自然环境的变迁和人类的干扰,目前许多物种处于濒危的状态或被保护状态,这给获取新鲜标本造成困难。因此如何从馆藏固定标本中获得需要的遗传信息成为了分子系统学需要解决的问题。目前保存的动物馆藏标本绝大多数是福尔马林或乙醇浸泡,虽然福尔马林固定具有渗透力强、防腐杀菌效果好、固定速度快,能快速杀死生物细胞以固定生物大分子的优点,但很多研究表明,经福尔马林浸泡的样品,提取 DNA 都存在实验方法繁琐、重复性差、提取得到的基因组 DNA 片段较小等缺点,不利于后续进行的分子系统学研究^[11-16]。乙醇作为一种挥发性液体,在作为固定剂使用中需要人工定时添加,增加了标本保存的繁琐性。并且对标本完整形态也有一定的影响。因此,寻找一种既能够很完好地保存标本,又不影响其高质量 DNA 的提取,并且安全便利的固定剂,是目前动物馆藏标本保存所迫切需要解决的问题。

本实验室在改良传统标本的方法上,采用高分子水溶性塑料——聚乙二醇(PEG)作为标本固定剂,在前期系列研究中,已证明了其具有无毒、安全、便利等优点^[17-18],本研究利用不同保存方法下鲫肌肉样品基因组 DNA 提取的比较,旨在从分子层面验证聚乙二醇作为标本固定液的可行性,同时为馆藏样品保存工作探求一条更加便捷而经济的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用鲫采于重庆市沙坪坝市场。样本处理参见表 1。

表 1 不同保存液保存的样品

Table 1 Samples treated in different fixative

样品编号	材料	保存方法	保存时间
1	鲫肌肉	5% 甲醛溶液固定	1 年
2	鲫肌肉	95% 乙醇溶液固定	1 年
3	鲫肌肉	95% 乙醇固定转聚乙二醇浸泡	1 年
4	鲫肌肉	聚乙二醇(分子量 600)固定	1 年
5	鲫肌肉	新鲜组织	新鲜材料

1.2 DNA 的提取及测量

梯度稀释浸泡方法 a) 将 95% 乙醇保存和 5% 甲醛保存的标本样品取出,分别置于浓度梯度为 60%,30%,10% 的乙醇和灭菌纯水中浸泡(每个梯

* 收稿日期 2008-03-01

资助项目 重庆市市级动物学精品课程建设项目

作者简介 黄为(1982-),男,硕士生,研究方向为鱼类寄生虫学。通讯作者 赵元著,E-mail:zhao-yuanjun@hotmail.com

度浸泡 1h), 4℃ 过夜, 再将样品吸干^[16,19]。

b) 将聚乙二醇保存的样品, 置于浓度梯度为 60%, 30%, 10% 的聚乙二醇和灭菌纯水(每个梯度浸泡 1h), 4℃ 过夜, 再将样品吸干。

蒸馏水直接浸泡方法 将 95% 乙醇、5% 甲醛和聚乙二醇保存的标本样品分别使用灭菌纯水浸泡, 中途换水 1 次, 4℃ 过夜, 再将样品吸干。

上述方法处理过的标本放入 60℃ 温度的烘箱中彻底烘干, 之后分别破碎样品, 将其悬于 500 μ L 消化液 (100 mmol/L NaCl; 10mmol/L Tris-HCL, pH7.6; 10mmol/L EDTA; 0.2% SDS; 20mg/mL Proteinase K) 中于 55℃ 过夜。采用常规酚-氯仿法抽提 DNA, 按以下步骤进行:

1) 向裂解好的材料中加入 0.5mL 苯酚, 轻微翻转混合, 以 14000 转/ min 的转速离心 5 min。

2) 取上清液放入新的离心管, 然后加入 0.5mL 苯酚-氯仿-异丙醇(比例为 25:24:1) 混合液, 轻微翻转混合, 14000 转/ min 离心 5 min。

3) 取上清液放入新的离心管, 入 0.5mL 氯仿, 轻微翻转混合, 14000 转/ min 离心 5 min。

4) 取上清液加入 50 μ L 氯化锂 (LiCl) (5M) 和 1 mL 冷冻无水乙醇 (-20℃ 保存)。混匀后 4℃ 沉淀 DNA 2~3 h。14000 转/ min 离心 5 min。

5) 弃上清液。加入 500 μ L 70% 冷冻乙醇 (4℃) 清洗 DNA。DNA 干燥后加入 50 μ L 灭菌超纯水完全溶解, -20℃ 保存。

DNA 的检测使用 1% (m/m) 琼脂糖凝胶进行电泳, 并用 Hitachi 公司的 U-0080D 型号紫外分光光度计测定 260nm 和 280nm 处的吸收值, 计算 DNA 含量及 A_{260nm}/A_{280nm} 值。

1.3 引物和试剂

TaqDNA 聚合酶、扩增缓冲液及 dNTP 购自 Takara 公司, 采用通用引物 MX5 (5'-CTGCGGACG-GCTCAGTAAATCAGT-3') 和 MX3 (5'-CCAGGA-CATCTTAGGGCATCAC AGA-3')^[20] 对所获得的样本 DNA 进行 18S rDNA 的扩增。

1.4 PCR 扩增

PCR 反应体系包括 10 $\times$ buffer 5/ μ L, 引物各 20 μ mol/L, dNTPs 40 μ mol/L, 模板 DNA 100ng, DNA 聚合酶 (Takara) 1.5u, 然后用灭菌双蒸水补足至终体积 50 μ L, 反应混合物首先在 94℃ 变性 5min 后, 于以下参数先进行 5 个循环 94℃ 变性 1min, 56℃ 退火 2 min, 72℃ 延伸 2 min; 然后于以下参数进行 35 个循环 94℃ 变性 1 min, 53℃ 退火 2 min, 72℃ 延伸

2 min。最后于 72℃ 延伸 10 min。取 8 μ L 扩增产物于 1% 的琼脂糖凝胶电泳 (100V, 50 min) 分离, EB 染色, 凝胶成像系统检测、拍照。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

图 1 为不同固定液保存下鲫肌肉 DNA 提取后的电泳图, 可以明显看出利用 5% 甲醛保存的样品只提取出了少量的 DNA 小片段, 而其它固定液保存方法下鲫肌肉均可提取出所需 DNA, 但是均有不同程度的降解。证实应有大于 10 KB 以上的分子存在。图中, ABCD 为梯度稀释浸泡处理过的样品; abcd 为蒸馏水直接浸泡处理的样品。

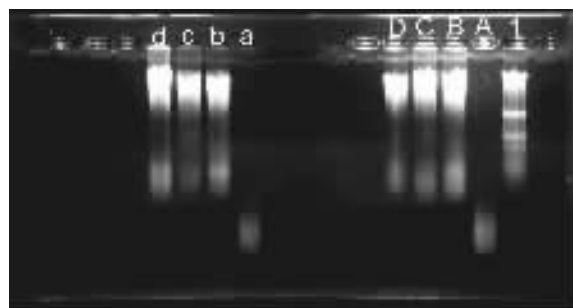


图 1 运用两种样品处理法从各种保存样品中提取的 DNA 电泳检测图

1 新鲜组织; A/a 5% 甲醛保存; B/b 酒精保存; C/c 酒精转聚乙二醇保存; D/d 聚乙二醇保存;

Fig. 1 Electrophoresis pattern of the DNA extracted from different kinds of samples with two kinds of pretreatment methods

1: fresh sample; A/a: 5% formaldehyde-fixed; B/b: alcohol-fixed; C/c: alcohol / polyethylene glycol-fixed; D/d: polyethylene glycol-fixed.

ABCD: pretreated samples with graded-marinate; abcd: samples immersed into distilled water directly.

2.2 不同保存方法的材料 DNA 提取量

通过对样品进行梯度浸泡后 DNA 提取的量, 数据均采用重复测量的数据方差分析, 所获结果表示为 ($\bar{X} \pm S$) (表 2)。固定材料与新鲜材料相比, 所提取的 DNA 量同等情况下偏少。固定样本中, 5% 甲醛保存样品所获 DNA 的量最低, 聚乙二醇保存的标本 DNA 提取量最高, 其次为 95% 乙醇保存的标本, 经乙醇转浸聚乙二醇的样品在转浸过程中 DNA 有少量损失。紫外分光光度计检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.41~1.54 左右。新鲜样本的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.61 左右。

表 3 为通过对样品进行蒸馏水直接浸泡后 DNA 提取的量, 数据处理同表 2。由表 3 可见, 直接

用蒸馏水浸泡样品后,DNA 提取量较梯度浸泡处理过的样品 DNA 提取量要少。紫外分光光度计检测 OD260/OD280 值在 1.32 ~ 1.44 左右。

表 2 梯度浸泡法处理后的标本 DNA 提取量

Table 2 The quantity of DNA extracted from samples by using graded-marinate pretreatment

样品编号	样品保存液	DNA 提取量/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OD260/OD280
1	5% 甲醛	78.8 ± 3	1.41 ± 0.02
2	95% 乙醇	163 ± 7.3	1.5 ± 0.05
3	95% 乙醇/聚乙二醇	160 ± 3.5	1.54 ± 0.11
4	聚乙二醇	173 ± 4.48	1.41 ± 0.02
5	新鲜材料	185.4 ± 1.38	1.61 ± 0.11

表 3 蒸馏水直接浸泡处理后的标本 DNA 提取量

Table3 The quantity of DNA extracted from samples immersed in distilled water

样品编号	样品保存液	DNA 提取量/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OD260 / OD280
1	5% 甲醛	59.5 ± 2.25	1.44 ± 0.05
2	95% 乙醇	145.6 ± 1.62	1.41 ± 0.01
3	95% 乙醇/聚乙二醇	137.8 ± 0.62	1.32 ± 0.07
4	聚乙二醇	146.5 ± 1.18	1.42 ± 0.06
5	新鲜材料	185.4 ± 1.38	1.61 ± 0.11

2.3 PCR 扩增结果

图 2 为不同保存方法样品提取的 DNA 的 PCR 扩增结果电泳图。在图 2 中,5% 甲醛所获 DNA 只有小分子的引物二聚体,没有目的条带,其余各样品均有明显目的条带,片段长度在 1500 bp 左右,但存在一定的弥散。

3 讨论

(1) 不同保存方法的样品及其前处理对 DNA 抽提量的影响。如何从各种保存方法保存的样本中,提取到足够的可供后续分子系统学研究的 DNA,一直是相关领域研究学者关注的技术课题。根据本研究结果,甲醛固定的样品提取的 DNA 均为小分子片段。这与已有的研究结果一致^[11-13]。以往的研究者认为,原因在于:甲醛在空气中易氧化成甲酸,而甲酸对 DNA 有较强的降解作用,因此稍有不慎,就会对标本的 DNA 分子造成严重的破坏;甲醛还能导致生物分子之间形成交联,影响蛋白酶 K 对蛋白质消化的效率,进而影响样本的 DNA 提取量,不利于后续进行的分子系统学研究^[11-16]。

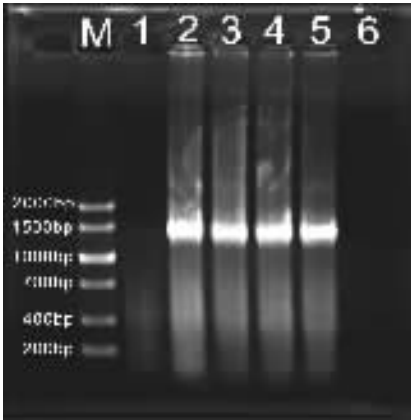


图 2 PCR 扩增结果电泳图

M Marker ; 1 : 5% 甲醛保存 ; 2 : 95% 乙醇保存 ;
3 : 95% 乙醇转聚乙二醇果 ; 4 : 聚乙二醇保存 ;
5 : 新鲜材料保存 ; 6 : 空白

Fig. 2 Electrophoresis pattern of PCR products from different kinds of samples

M : Marker ; 1 : 5% formaldehyde-fixed ; 2 : alcohol-fixed ;
3 : alcohol - polyethylene glycol - fixed ;
4 : polyethylene glycol - fixed ; 5 : fresh ; 6 : blank-control.

95% 乙醇固定的样品 DNA 抽提,则获得较好效果(表 2)。张海琪、薛良义等对不同保存方法的大黄鱼肌肉样品基因组 DNA 进行了提取比较,结果表明乙醇保存样品可提取较大量的 DNA 分子^[11]。这与本研究的结果相似。水溶性塑料聚乙二醇(分子量 600)固定标本 DNA 提取结果表明,能提取出大于 10KB 的 DNA 分子片段,且 DNA 提取的量($173 \pm 4.48 \mu\text{g}/\text{mL}$)较同等条件下 95% 乙醇保存的标本 DNA 提取量($163 \pm 7.3 \mu\text{g}/\text{mL}$)多,仅次于新鲜材料的提取结果。但从图 1 可见,存在一定的 DNA 分子降解现象,可能的原因有:1) 本实验采用的标本利用聚乙二醇固定后,暴露于常温环境下近一年,样本 DNA 分子可能受到 DNA 酶的影响而降解。2) 鉴于新鲜样品提取的 DNA 也出现部分弥散现象,则有可能是由于操作过程中的误差或机械损伤造成了 DNA 分子的断裂。

通过对不同保存方法保存的鲫肌肉样品基因组 DNA 提取获得量比较表明:甲醛保存下的样品难以提出完整的 DNA,利用 95% 乙醇固定的样品对 DNA 的提取量影响不大,且可获得较大分子的 DNA。方旅平等人对固定时间达到一年以上中华哲水蚤(*Calanus sinicus*)样品的研究结果认为:高浓度乙醇固定的样本对 DNA 提取量的影响很小。本研究结果与此点相同^[19]。本研究采用聚乙二醇保存的样品则可以提取出比 95% 乙醇固定的样品更多的

DNA。这表明聚乙二醇保存的标本不仅可以提取大分子的 DNA,而且还可以获得较大的 DNA 提取量。

研究还显示 在样本的处理方法上,通过梯度浸泡法处理后的样品 DNA 的提取量明显高于直接蒸馏水浸泡处理的样品 DNA 提取量(表 2、表 3)。张德华、周开亚等对乙醇保存的动物标本基因组 DNA 提取方法研究结果表明,直接用蒸馏水浸泡固定标本,会使标本组织大量吸水而造成细胞严重破裂,在换水时部分 DNA 随之丢失而影响 DNA 提取量。本研究结果也可证明此点^[21]。鉴于此,建议在固定样品的处理上,应以梯度浸泡法处理逐步除去样品中残留的固定剂,避免直接加水浸泡样品,以降低 DNA 的损失。

(2)不同保存方法样品 DNA 的 PCR 结果。利用通用引物(MX5 和 MX3)对不同方法保存的样本的 DNA 进行 18S rDNA 扩增,除甲醛保存下的样品仅见小分子的片段及引物二聚体之外,其余保存法的样本均有明亮的目的条带,片段长度为 1500 bp 左右,95%乙醇和聚乙二醇固定标本与新鲜样品扩增的目的条带明亮度差异不大,但扩增中出现了较明显的弥散。这可能是由于本研究采用的通用引物特异性不高的原因,也有可能是降解的 DNA 与引物结合造成的。本研究提取的 DNA 之 OD260/OD280 值在 1.32~1.61 左右,也说明提取的 DNA 中存在少量蛋白质的污染,但并不影响 PCR 扩增效果。综上,本次 PCR 扩增是有效扩增,证明了从 95%乙醇和聚乙二醇固定标本中提取的 DNA 都是可用于 PCR 扩增的。

4 结论

本工作利用一种能够完好地保存生物标本的固定液——聚乙二醇,探索了其对 DNA 提取质量的影响,这对于馆藏样品保存工作及后续的分子系统研究都是很有意义的。聚乙二醇作为固定剂不仅具有无毒、安全、便利、无虫害、无霉变等优点^[17-18],而且保存样本 DNA 的提取量也是 3 种固定方法中最大的。并且本研究通过 18S rDNA 扩增表明聚乙二醇作为固定剂也能够满足分子生物学研究的要求。综上,聚乙二醇可作为一种安全便利的、可替代乙醇且有良好发展前景的固定剂应用于生物标本的保存。

致谢 重庆师范大学生命科学学院 2008 届本科生高仁翠、李红参与了样本的处理及部分前期工

作,特此致谢。

参考文献:

- [1] 商慧敏,宋微波.利用 RAPD/RFLP 技术对三种盾纤类纤毛虫的研究[J].高技术通讯,2002(1):87-90.
- [2] SCHLEGEL M, LOM J, STECHMANN A, et al. Phylogenetic Analysis of Complete Small Subunit Ribosomal RNA Coding Region of *Myxidium lieberkuehni*: Evidence that Myxozoa are Metazoa and Related to the Bilateria [J]. Arch Protist, 1996, 147:1-9.
- [3] WHIPPS C M, KENT M L. Phylogeography of the Cosmopolitan Marine Parasite *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporae) [J]. J Eukaryot Microbiol, 2006, 53 (5):364-373.
- [4] 高世同,吴少庭,张仁利,等.恶性疟原虫红内期 SSUrDNA 编码基因的克隆与序列分析[J].中国热带医学,2006,24(3):317-321.
- [5] 谢珍玉,郑成木,单加林.海南部分野生菊科植物类缘关系的 RAPD 分析 [J]. 海南大学学报(自然科学版),2002,21:296-299.
- [6] 姜树坤,钟鸣,徐正进,等.基于 RAPD 标记进行水稻籼粳分类研究[J].沈阳农业大学学报,2006,37(4):639-641.
- [7] 侯大斌.黄连基因组 DNA 提取与 RAPD-PCR 体系的正交优化研究[J].西华师范大学学报(自然科学版),2006,27(3):248-252.
- [8] YANG Junbao, PENG Zhengsong, ZHAO Mei, et al. An Optimum and Rapid DNA Extraction Method from Dry Seeds of Wheat [J]. 西华师范大学学报(自然科学版),2006,27(1):48-52.
- [9] 陈瑜,吴夏,彭正松,等.四川黑熊 ND3、ND4L 和 tRNA2Arg 基因的克隆和序列分析[J].四川师范大学学报(自然科学版),2007,30(3):398-401.
- [10] 郝彦哲,杜玉杰,吴夏,等.亚洲黑熊四川亚种(*Ursus thibetanus mupinensis*)线粒体 ATP 合酶和亚基基因克隆及序列分析[J].重庆师范大学学报(自然科学版),2008,25(1):20-24.
- [11] 张海琪,薛良义,李明明,等.不同保存方法的大黄鱼肌肉样品基因组 DNA 提取及 RAPD 分析 [J]. 台湾海峡,2002,21:296-299.
- [12] 肖武汉,吴春花,宿兵,等.福尔马林固定云南鲃的 DNA 提取及其细胞色素 b 基因序列分析 [J]. 动物学研究,1997,18(3):242-252.
- [13] 夏颖哲,盛岩,陈宜瑜.福尔马林对固定标本 DNA 提取和扩增的影响 [J]. 四川动物,2006,25:662-665.
- [14] 许黎美,万秋红,王丁.福尔马林固定白豕豚标本 DNA 提取及其遗传多样性的初步研究[J].水生生物学报,2005(3):272-277.

- [15] 鲍宝龙,杨桂梅,龚小玲,等. 从福尔马林保存的牙鲆中克隆的 18S rDNA 进行系统发育分析的可靠性 [J]. 上海水产大学学报,2004, 13 (4) :193-197.
- [16] 徐来祥,张知彬,宋铭晶. 福尔马林保存的动物标本基因组 DNA 的提取方法 [J]. 动物学报,2002, 48 (2) : 264-269.
- [17] 唐安科. 绿色标本的塑化方法 [J]. 生物教学,2006 (4) :52.
- [18] 唐安科. 一种简易塑化动物标本的制作方法 [J]. 生物学通报,2006 (9) :56-57.
- [19] 方旅平,林元烧,曹文清. 不同保存条件下中华哲水蚤基因组 DNA 提取的比较 [J]. 海洋科学,2005, 29 (2) :1-4.
- [20] ANDREE K B, MACCONNELL E, HEDRICK R P. Nested Polymerase Chain Reaction for the Detection of Genomic DNA of *Myxobolus cerebralis* in Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1998 (34) :145-154.
- [21] 张德华,周开亚,孙红英. 乙醇保存的动物标本基因组 DNA 提取方法的比较 [J]. 生物学杂志,2004, 21 (6) :46-48.

Studies of the Influential Factors of Extraction of DNA from Fixed Samples Preserved with Three Different Kinds of Methods

HUANG Wei, ZHAO Yuan-jun, TANG An-ke

(Key Laboratory of Animal Biology of Chongqing, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract Genomic DNA extraction from muscle samples of the crucian carp, (*Carassius auratus*), preserved with 5% formaldehyde, 95% alcohol and polyethylene glycol (PEG) (molecular weight :600) are studied comparably in this paper. The results show that the genomic DNA can be extracted successfully from the samples preserved with 95% alcohol and polyethylene glycol (PEG) except the one with 5% formaldehyde by using commonly phenol/chloroform extracting genomic DNA method. The purified DNA, which are extracted from the samples fixed both with 95% alcohol and polyethylene glycol (PEG), can be also applied to do amplifications by using universal primers (MX5 and MX3) in 18S rDNA. Moreover, the influential factors of extraction of DNA from samples preserved with different kinds of methods are discussed, and the quantity (173 ± 4.48) of genomic DNA extracted from polyethylene glycol (PEG) and the one (160 ± 3.5) from 95% alcohol are analyzed. Consequently, it can be inferred that polyethylene glycol (PEG) should be available as a good fixative for sample-preserving.

Key words DNA extraction ; polyethylene glycol (PEG) ; fix method

(责任编辑 李若溪)