

鸡基因组 DNA 不同提取方法的比较研究

马新红, 亢娟娟, 康相涛*, 韩瑞丽, 孙桂荣, 潘军, 黄煌, 刘凯, 张立恒

(河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 实验用优化煮沸法提取鸡血液基因组 DNA, 经核酸蛋白定量仪检测, DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 达 1.77 ± 0.06 , 证明所提 DNA 质量较好, 用于 PCR 扩增, 可以得到满意的扩增效果。与酚-氯仿法相比, 优化煮沸法避免了用氯仿、酚等剧毒试剂, 且节约了时间和成本, 是一种较好的提取基因组 DNA 的方法。

关键词: 鸡; 基因组 DNA; PCR 扩增; 提取方法

中图分类号: S831.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-2286(2010)01-0181-04

A Comparative Study on Different Methods for Extraction of Gallus Genomic DNA

MA Xin-hong, KANG Juan-juan, KANG Xiang-tao*, HAN Rui-li, SUN Gui-rong, PAN Jun, HUANG Huang, LIU Kai, ZHANG Li-heng

(College of Animal Science And Veterinary Medicine, HAU Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The optimized cooking extraction method was used in this study to extract gallus genomic DNA. OD_{260}/OD_{280} was up to 1.77 ± 0.06 by the Smartspec™plus test. The result showed that the quality of DNA extracted by the optimized cooking extraction method was very good, clear and bright fragments were detected through PCR amplification. Compared with the Phenol-chloroform extraction method, The optimized cooking extraction method is free from chloroform, phenol and other toxic reagents, and saves time and costs, hence a good method for extracting genomic DNA.

Key words: gallus; genomic DNA; PCR amplification; extraction method

自 20 世纪 50 年代 Watson J D 和 Crick F 提出 DNA 双螺旋模型以来, 分子生物学在广度和深度上都获得了空前的发展。现代分子生物学技术已经渗透到生物学、医学、遗传学和动物学等各个方面^[1], 而基因组 DNA 的提取是分子生物学研究的一项基础技术, 是后续试验成功的关键。目前基因组 DNA 的提取方法较多, 试剂盒价格昂贵不适用于较大批量的提取 DNA, 而其它的一些方法主要是有机溶剂提取法, 费时且不经济。因此, 从实验的具体要求、样本量大小和经济等方面考虑, 寻找简便、安全、成本较低的方法很有必要。本研究在参考几种常用的 DNA 提取方法的基础上优化出了一种快速、简便、高效、经济的提取方法, 以便为进行禽类分子遗传学的相关研究奠定基础。

收稿日期: 2009-08-28 修回日期: 2009-11-09

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2006BDA01A09); 公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-039); 河南省杰出人才创新基金项目(074200510009)

作者简介: 马新红(1982-), 女, 主要从事家禽分子营养, E-mail: maxinhong421083@126.com; * 通讯作者: 康相涛, 教授, 博导, E-mail: xtkang2001@263.net。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

基因组 DNA 从固始鸡和安卡鸡 F₂ 代资源群血液中提取。引物由上海生工生物技术有限公司合成;蛋白酶 K、平衡酚等购自北京鼎国生物技术有限公司;Taq DNA 聚合酶、dNTPs 购自广州东盛生物有限公司。

1.2 基因组 DNA 提取

1.2.1 酚-氯仿法 取 80 μL 抗凝血于 1.5 mL 离心管中,加 500 μL TE 缓冲液,15 μL $\rho(\text{SDS}) = 25\%$ 和 15 μL 蛋白酶 K(10 mg/mL) 充分混匀,置 57.8 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中消化过夜;加入等体积 Tris 饱和酚,缓慢摇匀 10 min,离心 10 min(12 000 r/min);取上清液,转入另一离心管,再加 500 μL Tris 饱和酚,缓慢摇匀 10 min,离心 10 min(12 000 r/min);接着取上清液,转入另一离心管,加入($V_{\text{酚}}:V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}} = 24:23:1$)600 μL ,缓慢摇匀 10 min,离心 10 min(12 000 r/min);再取上清液,转入另一离心管,加入($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}} = 23:1$)600 μL ,缓慢摇匀 10 min,离心 10 min(12 000 r/min);最后再取上清液,转入另一离心管,加入 2 倍体积预冷至 -20 $^{\circ}\text{C}$ 的无水乙醇沉淀 DNA,缓慢摇匀 10 min,离心 10 min(12 000 r/min),小心弃去液体部分;加入体积分数 $\varphi(\text{乙醇}) = 70\%$ 冲洗,缓慢摇匀 10 min,离心 15 min(12 000 r/min);自然风干(倒置);加入 100 μL TE 溶解过夜(约 24 h)。

1.2.2 煮沸法 取 100 μL 抗凝血于 1.5 mL 离心管中,加 1 mL 双蒸水,充分混匀,冰浴 10 min 后 13 000 r/min 离心 1 min,弃上清,向下层沉淀中加入 100 μL 双蒸水使之充分悬浮,煮沸 5 min,立即冰浴 5 min,以 13 000 r/min 离心 10 min,取上清于另一离心管中即可用于 PCR 检测。

1.2.3 优化煮沸法 用 100 μL TE 替代煮沸法中的 100 μL 双蒸水。

1.3 引物设计

利用 primer 5 分析软件 根据鸡基因组序列中过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR α) 基因 (GenBank 登录号:NC_006088) 序列和 PPAR α 基因的 mRNA 序列 (GenBank 登录号:NM_001001464) 对鸡 PPAR α 基因的编码区序列(第二外显子)设计引物。引物由上海生物工程技术有限公司合成。其引物序列为:上游:5' - GTTGTGTTGTGGGTTTACG - 3';下游:5' - GCAACGTGATTTAGGCTCTT - 3'。

1.4 PCR 反应体系及扩增条件

1.4.1 PCR 反应体系 10 \times PCR 缓冲液,2.5 μL Taq DNA 聚合酶 (0.5 U/ μL) 0.3 μL ,dNTPs (10 mmol/mL)0.5 μL ,引物(10 pmol/L)各 0.5 μL ,DNA 模板(100 ng/ μL)1 μL ,最后加灭菌超纯水补足至 25 μL 。

1.4.2 PCR 反应程序 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 35 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,34 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2 结果与分析

2.1 核酸蛋白定量仪检测结果

由于 DNA 提取的质量和产量直接影响了 PCR 扩增,限制性内切酶的酶切反应以及单核苷酸多态性等试验的成败,所以对提取的 DNA 质量有较高要求。优质 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.7 ~ 2.0。核酸蛋白定量仪测定结果如表 1 所示,优化煮沸法和酚-氯仿法提取的 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值都在 1.7 ~ 2.0,然而煮沸法提取的 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值仅为 1.26;酚-氯仿法提取的 DNA 浓度最高,但缺点是耗时较长。

表 1 3 种方法提取 DNA 的浓度、纯度及血液需要量

Tab. 1 Concentration, purity and blood volume of extracted DNA by three kinds of method

提取方法 Extraction method	质量浓度/(ng \cdot μL^{-1}) Concentration	OD_{260}/OD_{280} Purity	血液需要量/ μL Blood volume
酚-氯仿法 Phenol-chloroform extraction	328.2 \pm 32.95	1.89 \pm 0.11	80
煮沸法 Cooking extraction method	165.6 \pm 15.62	1.26 \pm 0.10	100
优化煮沸法 Optimized cooking extraction method	204.7 \pm 18.13	1.77 \pm 0.06	100

2.2 基因组 DNA 抽提结果的检测

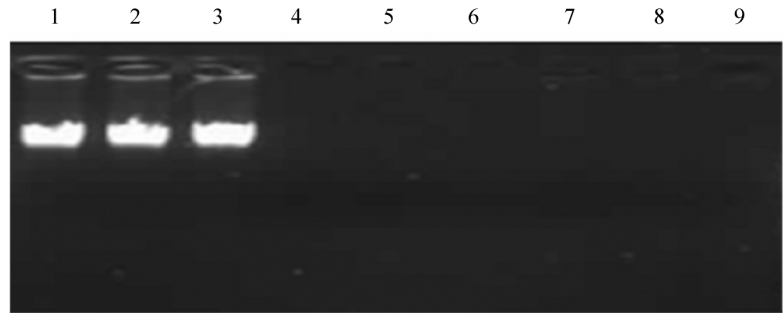
将酚-氯仿法获得的基因组 DNA、煮沸法提取的基因组 DNA 和优化煮沸法提取的基因组 DNA 同时进行琼脂糖凝胶电泳,检测的结果见图 1。结果显示,在 10 g/kg 的琼脂糖凝胶电泳条件下经过一段时间的电泳后酚-氯仿法得到的基因组 DNA 出现了整齐、清晰的单一条带,无拖尾现象,而煮沸法提取的基因组 DNA 未见条带。这可能是由于在热的条件下,小部分超螺旋 DNA 发生了不可逆变性而产生环状卷曲 DNA,且它在琼脂糖电泳中的迁移率为正常超螺旋 DNA 的两倍^[5],结果这种大的 DNA 复合体在电场中不能够穿过琼脂糖凝胶这一分子筛,而滞留在点样孔。

2.3 PCR 检测基因组 DNA 质量

为检测煮沸法提取的效果,同时对 3 种方法获得的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,产物经琼脂糖电泳检测后见图 2。结果表明 3 种方法提取的基因组 DNA 经 PCR 扩增,琼脂糖检测都可见一条清晰、致密的条带,与 DNA 分子量标准相比,与预期片段大小一致。可见所提取的 DNA 均已达到分子生物学实验的要求。

2.4 -20℃保存一个月后用相同的引物再次 PCR 检测基因组 DNA 质量

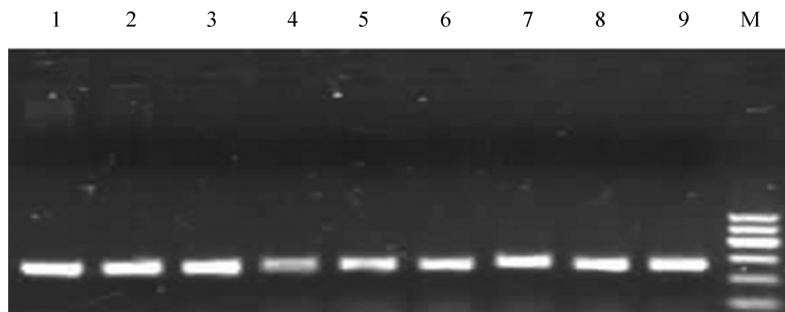
结果表明,酚-氯仿法和优化煮沸法提取的基因组 DNA 在保存 1 个月后都得到了相应清晰、明亮的目的条带,而煮沸法提取的基因组 DNA 所获得的目的条带变淡,提取的 DNA 质量降低。



1~3. 酚-氯仿抽提;4~6. 煮沸法;7~9. 优化煮沸法
1-3. phenol-chloroform extraction; 4-6. cooking extraction method; 7-9. optimized cooking extraction method.

图 1 比较三种方法提取的基因组

Fig. 1 Comparison of three genomic DNA extraction methods

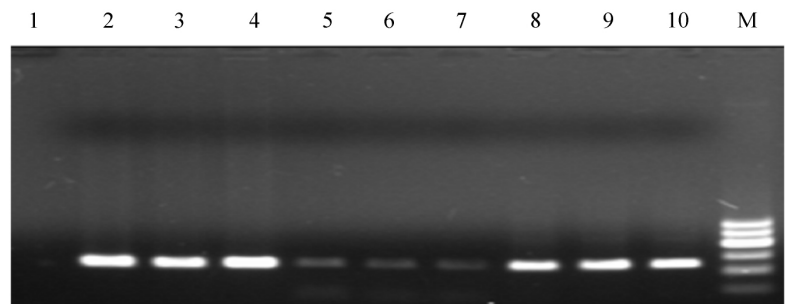


1~3. 酚-氯仿抽提;4~6. 煮沸法;7~9. 优化煮沸法;M. DNAmark1,最亮的条带为 400 kb。

1-3. Phenol-chloroform extraction; 4-6. cooking extraction method; 7-9. Optimized cooking extraction method; M. DNA marker 1, the lightest band is 400 kb.

图 2 PCR 扩增三种方法提取的基因组

Fig. 2 Comparison of three genomic DNA extraction methods



1. 阴性对照;2~4. 酚-氯仿抽提;5~7. 煮沸法;8~10. 优化煮沸法;M. DNAmark1,最亮的条带为 400 kb。

1. Negative control; 2-4. phenol-chloroform extraction; 5-7. cooking extraction method; 8-10. optimized cooking extraction method; M. DNA marker 1, The lightest band is 400 kb.

图 3 3 种方法提取基因组在 -20℃ 冻存 1 个月后的 PCR 扩增

Fig. 3 PCR results of three genomic DNA extraction methods after

being preserved for a month at -20℃

3 讨 论

(1) 选择快速、简便、高效、经济的方法是提取基因组 DNA 的重要条件。目前基因组 DNA 提取的方法较多,试剂盒价格昂贵不适用于大批量的提取 DNA,而其它的一些方法需采用蛋白酶 K 消化蛋白质,成本较高^[6]。本试验通过对基因组提取方法研究,摸索出了一种简洁的提取鸡基因组 DNA 的方法,本方法在试验中只是利用渗透压平衡原理,将细胞破碎,再通过热力学原理将染色体与破碎的膜结构等分离,同时使基因组 DNA 与组蛋白分离,最后离心取上清液即可获得基因组 DNA。

(2) 为了检验冷冻保存对基因组 DNA 的影响,在基因组 DNA 提取 1 个月后以相同的引物对 3 种方法提取的 DNA 进行了 PCR 扩增。结果表明,与酚-氯仿法一样,优化煮沸法提取的 DNA 也可以在冷冻状态下长期保存,但煮沸法提取的 DNA 在保存 1 个月后再次 PCR 扩增时,目的条带变淡,这可能是 DNA 综合纯度影响了 PCR 产物^[8]。虽然在试验中我们可以用灭菌双蒸水代替 TE 去提取基因组 DNA,但是 TE 成分中的 EDTA 可以中和溶液中的金属离子,使核酸酶无法起作用,保存的时间也更长,并且 TE 缓冲液的 pH 在 8 左右,此时 DNA 为盐离子状态,更容易溶于水,从而也可以获得更多 DNA。因此,应用基因组 DNA 去进行长期试验研究时最好是用 TE 去保存。

(3) 通过比较我们发现,常规的基因组 DNA 酚-氯仿法提取的模板质量最好,保存时间也长,但操作步骤繁杂,成本也高,而且酚和氯仿均有挥发毒性,对环境造成诸多危害,长期使用严重危害人体健康。煮沸法虽节省了实验时间和成本,但提取的 DNA 中蛋白质含量较高,能干扰 DNA 聚合酶的活性,不利于后期基因体外扩增。而优化煮沸法不仅节省了试验时间和成本,且提取的 DNA 质量高,保存时间也长,是一种快速简便的提取基因组 DNA 的方法。

参考文献:

- [1] 黄大鹏, 陈建华. 全血中 DNA 的 5 种不同提取方法比较研究[J]. 动物医学进展, 2006, 27(6): 96-99.
- [2] 程金华, 朱化彬, 王栋, 等. 牛基因组 DNA 两种提取方法的比较研究[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(9): 874-877.
- [3] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [4] Gustincich S G, Manfioletti G, Delsal D, et al. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood[J]. BioTechniques, 1991, 11(2): 298.
- [5] Vinograd J, Lebowitz J. Physical and topological properties of circular DNA[J]. Gen. physion, 1996, 49: 103-125.
- [6] 涂向东, 江清华, 兰风华. 三种简易提取全血基因组 DNA 方法的比较[J]. 中国实验诊断学, 2006, 10(3): 264-266.
- [7] 邵碧英, 陈彬, 汤敏英, 等. 沙门氏菌 DNA 提取及 PCR 反应条件的优化[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 331-334.
- [8] Gibb K, Radovan A. A DNA extraction method that allows reliable PCR amplification of MLO DNA from "difficult" plant host species[J]. Genome Res, 1994, 4: 56-58.
- [9] 张林琳, 李磊, 李翔, 等. 一种改良式质粒 DNA 提取方法的建立与应用[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2007, 28(1): 106-108.
- [10] 苗永旺, 霍金龙, 李莲军. 从鸡血中快速提取高质量基因组 DNA 方法的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005(12): 10-12.
- [11] 任时好, 张天星, 李春丽, 等. 不同 Tris·Cl 及 SDS 质量浓度对小鼠 DNA 提取的影响[J]. 河南农业大学学报, 2008, 42(2): 192-195.
- [12] 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): 23-25.
- [13] 董大跃, 伍新尧, 陆惠玲, 等. DNA 提取方法的比较及改良[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2003, 24(4): 411-412.
- [14] 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.