

3 种提取基因组 DNA 方法的比较分析

刘燕¹, 刘孟洲¹, 徐彦祥²

(1. 甘肃农业大学动物科技学院, 兰州 730070; 2. 兰州猪场, 榆中 730100)

摘要: 分别采用 3 种不同的方法提取基因组 DNA, 比较所提取的 DNA 的质量以及提取所需时间、费用, 以期选择一种高效、简洁快速、价格合理的提取方法。结果发现这 3 种方法提取的质量都能达到相关分子生物学试验的要求, 但在操作步骤、时间、价格等方面存在差异, 具体比较结果可为分子生物学试验选择提取方法提供依据。

关键词: DNA 提取; 血液; 组织; FTA 采样卡

中图分类号: Q503

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2008)04-0045-03

从血液、组织中提取基因组 DNA (genomic DNA, gDNA) 是分子生物学试验的第一步。虽然其方法早已成熟, 但由于分子生物学方法的不断改进和各种试剂盒的出现, 选择一个简便、快速、价格合理的 DNA 提取方法尤为重要。我们分别尝试用几种不同的方法进行大样本量提取 DNA, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 本研究试验动物为甘肃省 2 个地方猪种(合作猪、八眉猪), 2 个配套系(华特 A 系、B 系), 4 个纯种(长白、大约克、杜洛克、皮特兰)。采样在甘肃兰州润通原种猪场、甘肃兰州猪场、甘肃临泽新华种猪场完成。准备 ACD 抗凝剂(0.48% Citric Acid,

1.32% Sodium Citrate, 1.47% Glucose)、FTA 采样卡、耳号钳、装有 75% 酒精的 5 ml EP 管和酒精棉, Shanghai Generay Biotech 血液基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)。采颈静脉血每头 2 ml, 不加任何抗凝剂直接滴在 FTA 采样卡上, 晾干保存(注意在采血过程中, 不要污染 FTA 试纸)。陈旧血样(非肝素抗凝剂抗凝, -70℃ 保存 3~5 年)也可按照新鲜血样的方法滴在 FTA 采样卡上, 在干净的环境中避光晾干后室温保存备用。DNA 提取所用试剂 20mM NaOH, TE 缓冲液(10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0), 将这 2 种试剂高压灭菌后 4℃ 保存备用。FTA 采样卡, FTA 反应液由 Whatman (Whatman, Middlesex, UK) 公司生产。另用耳号钳采黄豆大小的耳组织样。本试验共对 8 个猪品种(品系)的 300 个个体进行活体采样, 样品置于 -20℃ 冷冻, 冷藏箱保存带回实验室, -70℃ 条件下保存备用。

1.2 方法

收稿日期: 2007-10-17

作者简介: 刘燕(1982-), 女, 河南人, 硕士, 研究方向: 猪遗传育种与分子生物技术。

通讯作者: 刘孟洲(1938-), 男, 陕西人, 教授, 博导, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。

Uncoupling Protein and Polymorphism Regulation the Energy Metabolism

WEN Sheng-ping¹, ZHANG Li-chun², CAO Zhen-hui¹, LI Qi-hua¹, TIAN Yun-bo³,
CHAI Yan¹, CHEN Bao-ding¹, GE Chang-rong¹, JIA Jun-jing¹

(1. The Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Honghe Animal Husbandry Institute in Yunnan Province, Mengzi 661100, China;
3. College of Life Science, Guangzhou Zhongkai Agricultural and Technology College,
Guangzhou 510225, China)

Abstract: The uncoupling proteins are now known to be mitochondrial inner membrane proteins. Recently, more than five family members have been identified including UCP1, UCP2, UCP3, UCP4 and UCP5 in the mitochondrial inner membrane of different tissues and organs of species, such as in human, mammals, poultry, fish and even in plants. UCPs regulate the energy metabolism, increase the fatty acids oxidation and the UCPs polymorphism are related to fat metabolism.

Key words: uncoupling proteins; mitochondria; polymorphism; energy metabolism

1.2.1 血液中提取 DNA ①将冷冻的血样在常温下解冻,取 1 ml 血样至 EP 管中,加入 500 μ l PBS 缓冲液,充分混匀 5~6 min,然后 12000 r/min, 4℃ 离心 10 min。②弃上清,再加 1 ml 血样,加 500 μ l PBS 缓冲液,充分混匀 5~6 min,12000 r/min, 4℃ 离心 10 min。③重复上述步骤 2 次,加 900 μ l PBS 缓冲液,使血样达到 2 ml,离心直至上清液透明,沉淀呈淡黄色。④加 500 μ l DNA 抽提缓冲液,混匀,使血细胞脱离离心管管壁。⑤加 10 μ l 蛋白酶 K,混匀,55℃ 水浴过夜。⑥将反应液冷却至室温,加 500 μ l Tris 饱和酚,温和摇动 20 min,充分混匀,12000 r/min, 4℃ 离心 10 min,取上清。⑦加入 500 μ l 的苯酚:氯仿:异戊醇(体积比为 25:24:1),均匀混合 20 min,12000 r/min, 4℃ 离心 10 min,取上清。⑧加入 250 μ l 的氯仿:异戊醇(体积比为 24:1),缓慢摇动 20 min,12000 r/min, 4℃ 离心 10 min,取上清。⑨加入 1 ml 无水冰乙醇,混合轻微摇晃后,12000 r/min,离心 1 min,倒掉乙醇。⑩加入 1 ml 70% 乙醇洗涤,12000 r/min,离心 1 min,倒掉乙醇,置于室温下自然干燥。⑪加入 100 μ l TE 溶液室温放置 24 h 以溶解 DNA, -20℃ 保存备用。

1.2.2 耳组织中提取 DNA ①称取耳组织样约 30 mg 装入 1.5 ml 的 EP 管中,用手术剪刀剪成粉末状。②加入 600 μ l 的组织裂解液,加入 RNA 酶 4.5 μ l,然后放入 37℃ 恒温箱中温浴 2.5 h。③加入蛋白酶 K 10 μ l,用封口膜封口后放入 55℃ 的水浴锅中 12 h(过夜,每隔 0.5 h 将样品取出,来回颠倒几次使样品充分混匀,若有样品黏滞在管底则用手指弹管底使其充分混匀)。将样品从水浴锅中取出后观察结果,除毛发以外的耳组织全部被消化,待样品冷却至室温后加入 600 μ l Tris 饱和酚,将样品插入泡沫板后缓慢颠倒摇晃 10 min,使溶液的两相充分混匀,然后 12000 r/min, 4℃ 离心 10 min。离心完吸取上清液到另一新的 1.5 ml EP 管中待用,下层混浊液丢弃(注意:吸取上清液时不要把中间那层乳白色的蛋白质吸上来,不要吸出两相界面)。④往上清液中加入 Tris 饱和酚 600 μ l,摇晃、离心、取上清液,步骤同 3。⑤往上清液中加入 Tris 饱和酚和氯仿:异戊醇(体积比为 24:1)各 300 μ l,摇晃、离心、取上清液,步骤同 3。⑥往上清液中加入氯仿:异戊醇(体积比为 24:1)600 μ l,摇晃、离心、取上清液,步骤同 3。⑦往上清液中加入 NaAc 60 μ l 和 -20℃ 充分预冷的无水冰乙醇 1000 μ l。盖上盖子轻微摇晃后即出现乳白色丝状 DNA 絮状沉淀浮在液

体中。将样品置于冰中 15 min,取出,12000 r/min, 4℃ 离心 10 min,使 DNA 沉淀于离心管底部。⑧倒出上清液,加入 75% 乙醇 1000 μ l,混匀漂洗以除去残留的盐。⑨12000 r/min, 4℃ 离心 2 min,倒出上清液,加入 75% 乙醇 1000 μ l,混匀漂洗以除去残留的盐。⑩12000 r/min, 4℃ 离心 2 min,小心倒掉乙醇,将离心管倒扣于滤纸上,置于室温下自然干燥。⑪待乙醇完全挥发,加入 200 μ l TE,室温放置 24 h 以溶解 DNA。最后 -20℃ 保存备用。

1.2.3 FTA 采样卡提取 DNA ①用取样器(punch)在 FTA 采样卡上取若干直径为 1.2 mm 的圆盘(disk),每个 PCR 管中放入一个 disk(注意:取样器及取样器下垫的玻璃平板在使用前要用 75% 的酒精消毒,等完全晾干后才可取样。为避免样品污染,在一样品取完后取另一样品时要在 FTA 采样纸的空白处操作 3 次,丢弃无样空白圆盘,进行下一样品的采样)。②在 PCR 管中加入 200 μ l 20 mM 的 NaOH 溶液,在室温下孵育裂解 25 min(陈旧血样则在 50℃ 下孵育 30 min),在孵育过程中可以翻转离心管,孵育结束后,弃去 NaOH 溶液。③在 PCR 管中加入 200 μ l 的 TE 缓冲液,静置洗涤 3 min,弃去 TE 溶液,室温下风干 disk 备用,每个 disk 含 DNA 约 50~100 ng。④用 FTA 反应液提取基因组 DNA,严格按照生产商提供的使用说明书进行。

1.2.4 试剂盒提取 DNA 按照 Shanghai Generay Biotech 血液基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)技术手册 No GRX008 操作。

1.3 检测

1.3.1 琼脂糖凝胶电泳检测 配制 0.8% 的琼脂糖凝胶,1 μ l 的 6×Loading Buffer 上样缓冲液,加入 3 μ l TE 溶解的 DNA 溶液,混合均匀后加入点样孔中,同时上样 DNA Marker1,与 DNA Marker 比较电泳条带的亮度、整齐度及位置,粗略估计其纯度及片段大小。100 V,电泳 15 min 左右。

1.3.2 紫外分光光度计检测 5 μ l DNA+95 μ l 双蒸水稀释,用紫外分光光度计进行定量分析。DNA 纯度 = OD_{260}/OD_{280} ,DNA 样品的 OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.8,质量较好的 DNA 其 OD_{260}/OD_{280} 比值应在 1.6~1.8 之间。若大于 1.8 则说明 RNA 尚未除净,若小于 1.6 则说明样品有蛋白或酚。

1.3.3 PCR 扩增产物分析 猪 PRKAG3 基因引物序列:上游 5'-AAATGTGCAGACAAGGATC-TCG-3';下游 5'-ACGAAGCTCTGCTTCTTGC-

3'。利用模板 DNA 对猪 PRKAG3 基因作 PCR 扩增反应。PCR 反应体系 ddH₂O 18.5 μl; 10×buffer (含 15 mM Mg²⁺) 2.5 μl; Mg²⁺ (25 mM) 1.5 μl; dNTPs (10 mM) 0.5 μl; 上、下游引物各 0.5 μl; 模板 (100 ng/μl) 0.5 μl; Taqase (2.5 U/μl) 0.5 μl。94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 59℃复性 30 s, 72℃延伸 30 s, 35 个循环; 72℃延伸 5 min, 4℃保存。产物用 1.5% 琼脂糖检测。

2 结果与分析

2.1 常规酚-氯仿抽提法 用时最长达 20~24 h, 但浓度高, 纯度好, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值可达 1.7~1.8, 提取效率达 98%, 完全适用于 PCR 反应, 是较为常用的稳定的提取方法。从电泳图可看出基因组条带较亮, 并且没有蛋白质杂质, 可以作为大样本量的试验。耳组织提取与血液提取相比较而言, 采集动物耳组织对动物机体应激较小而且操作简单, 不需要抗凝剂, 保存和运输携带方便。

2.2 FTA 采样卡提取 DNA 经过电泳检测, 采用优化的 NaOH-TE 法和 FTA 反应液法均可以扩增出明亮的目的条带。采用优化的 NaOH-TE 法, 在血样采集过程中可以避免添加抗凝剂、反复离心、低温保存等步骤, 可以大大减轻采集血样时携带大量设备, 且采集后血样体积小, 易存储, 只需保存在干净、干燥环境中即可, 无需低温冷冻。在基因组 DNA 提取时仅用两步, 且每步所用时间较短, 提取的 FTA 圆盘只需放置于灭菌 PCR 管内, 常温或 4℃保存即可, 对设备和试剂要求不高, 进行 PCR 反应时只需在管内加入反应液即可进行扩增。不同的 FTA 圆盘洗涤时间对 PCR 反应有明显影响, 对新鲜血样, 洗涤最佳时间为 25 min, 而对陈旧血样最佳洗涤时间为 30 min。提出的 DNA 吸附于所取的 disk 上, 无法检测所提取的 DNA 的质与量, 所以只

能在进行 PCR 后检测目的片段, 有时会造成一定的浪费。但总体而言, 这种方法成本较低、操作简单, 避免了 DNA 提取过程中可能造成的交叉污染, 省时省力且提取效率很高, 适用于常规 PCR、SSCP、克隆以及基因测序等目的 DNA 的提取, 是一种 DNA 提取的好方法。

2.3 试剂盒提取 用时达 6~7 h, 经电泳检测提取效率仅达 70%, 效果不理想, 并利用试剂盒反复提取 DNA, 结果始终如一。试剂盒价格较高, 使用次数有限, 不适合大样本量的提取试验, 而且试剂盒质量存在差异, 选购要谨慎。

3 讨论与小结

提取血液基因组 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。提取方法简便快速, 适用范围广, 对设备和试剂的要求不高, 得率和纯度都可以满足要求, 而且价格低廉是我们必须考虑的重要因素。

参 考 文 献

- 1 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993.
- 2 刘孟洲. 猪的配套系育种与甘肃猪种资源[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2007.
- 3 李士栋. 5 个绵羊群体 FecB 基因的连锁微卫星研究[D]. 甘肃农业大学硕士学位论文, 2007.
- 4 赵亚力, 马学斌, 韩为东. 分子生物学基本实验技术[M]. 北京: 清华大学出版社, 2006.
- 5 杨文平. 猪 H-FABP 基因分子遗传多态性及其与肌内脂肪含量的相关分析[D]. 山西农业大学博士研究生学位论文, 2005.

Comparison of Three Methods for Genomic DNA Extraction

LIU Yan¹, LIU Meng-zhou¹, XU Yan-xiang²

(1. Faculty of Animal Science & Technology, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China;

2. Lanzhou Swine Factory, Yuzhong 730100, China)

Abstract: We separately used several different method to extracted genomic DNA, compared with several methods as well as the time, the expense and the time to choose an efficient, simple fast, reasonably priced extraction methods. Finally, Several methods could achieve the quality of molecular biology experiments related requirements, but in the sequence of operation, the time and the price there exist differences. Specific results of this comparison to be possible to provide the basis for the molecular biology experiment selective extraction method.

Key words: DNA; extraction; blood; organizations; FTA sampling card