

一种简便分离高质量家蚕基因组 DNA 的方法*

陈冬妹 林 英 王艳霞 杨 瑜 代方银 夏庆友

(西南大学生物技术学院 蚕学与系统生物学研究所 重庆 400716)

摘 要 本研究对传统的家蚕基因组提取方法进行了改进。改进方法无需研钵和液氮,将 RNase 与蛋白酶 K 同时加入剪碎的家蚕样品中消化处理,并利用旋转振荡培养箱旋转混匀和培育每步的样品。该方法减少了基因组 DNA 的损失,提高了工作效率,节约了成本。利用改进后的方法对不同家蚕品种的基因组 DNA 进行了提取和 PCR 扩增验证,结果表明提取的基因组 DNA 的质量、获得率、重复性都更好,能够满足家蚕分子生物学研究的需要。

关键词 家蚕 基因组 DNA 分离 方法

分子生物学中许多研究都需要从大量的动物组织中分离基因组 DNA,例如转基因动物或敲除(knock-out)基因的分析等,因此 DNA 的分离纯化已成为所有 DNA 重组技术和许多分子生物学研究中的一个重要环节。目前所采用的从家蚕组织中分离纯化基因组 DNA 主要是 Nagaraja et al (1995)、夏庆友等(1996)建立的方法^[1-2],这些方法基本上都是先将材料经过液氮研磨,然后应用离子型去污剂(SDS)及蛋白酶 K 去除样品中的蛋白质,再用苯酚、氯仿进行多次抽提,用 RNase 消化其中的 RNA,然后再用苯酚、氯仿进行多次抽提纯化,最后用乙醇沉淀,从而获得基因组 DNA。本研究在这些常规方法的基础上进行了改进,建立了从家蚕组织中进行基因组 DNA 提取的一种改进方法,该法具有便捷、可重复性强、DNA 的获得率和质量高等优点,优化了家蚕基因组提取的传统方法,为家蚕分子生物学研究提供了重要参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

不同品种的家蚕蛹或蛾由西南大学家蚕基因资源库提供。材料尽量保证新鲜,若不能立即提取,应放于 -20℃ 或 -80℃ 保存备用。

1.2 方 法

1.2.1 家蚕基因组 DNA 的提取

(1)称取 0.1g 左右的蚕蛹或蛾,放入 5mL 离心管中,,加入 1mL 抽提缓冲液(10mmol/L Tris - Cl (pH8.0),0.1mol/L EDTA(pH8.0),0.5% SDS),用干净的小剪刀将组织尽量剪碎;

(2)加入蛋白酶 K 至终浓度为 400 ~ 500μg/mL,同时加入 RNase 至终浓度为 50μg/mL,轻轻混匀,然后放入旋转振荡培养箱中,50℃ 旋转 5h 以上或过夜;

(3)取出裂解消化后的组织悬液,加入等体积(1mL)的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)混合液,放入旋转振荡培养箱中,常温下缓慢旋转振荡 30min;

* 资助项目:973 计划(2005CB121000)、863 计划(2006AA10A118)、重庆市院士基金。

作者简介:陈冬妹(1981-),女,福建人,硕士生。

- (4) 12000rpm 离心 10min, 用去尖的枪头小心移出上层水相至另一新离心管中;
- (5) 加入等体积(1mL)的酚/氯仿(1:1)混合液, 放入旋转振荡培养箱中, 常温下缓慢旋转振荡 20min;
- (6) 12000rpm 离心 10min, 小心移出上层水相至另一新离心管中;
- (7) 加等体积(1mL)的氯仿, 放入旋转振荡培养箱中, 常温下缓慢旋转振荡 20min, 进一步萃取溶液中剩余的苯酚;
- (8) 12000rpm 离心 10min, 取出上层水相至另一新离心管中;
- (9) 加入 2~2.5 倍体积(2~2.5mL) 预冷的无水乙醇, 小心旋转混匀即可看到絮状的 DNA 沉淀产生; 也可以加入适量(0.1mL) 3M NaAC (pH5.2), 置 -20℃ 冰箱中冰冻 10~20min, 促进沉淀形成;
- (10) 12000rpm 离心 10min, 沉淀 DNA, 并弃去上清;
- (11) 用 1mL 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 然后尽量弃去乙醇, 自然晾干, 使乙醇挥发殆尽, 但不能使沉淀过于干燥, 否则很难溶解;
- (12) 加入适量(200~300 μ L) 的 TE 溶液(10mmol/L Tris - Cl (pH8.0), 1mmol/L EDTA (pH8.0)) 或灭菌双蒸水, 溶解沉淀 2h 以上或 4℃ 过夜, -20℃ 保存备用。

1.2.2 基因组 DNA 的检测

- (1) 取 1 μ L DNA 溶液与适量上样缓冲液(6 \times Loading buffer) 混合, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段的大小及质量;
- (2) 用紫外分光光度计法检测 260nm 的 OD 值, 计算 DNA 含量, 记录 A260/A280 的比值, 判断 DNA 的纯度^[3]。

1.2.3 PCR 扩增验证 DNA 的质量

根据紫外分光光度法测得的浓度对样品 DNA 溶液进行稀释, 使浓度调整在 50~100ng/ μ L, 并以此作为 PCR 模板, 同时设立以传统方法提取的基因组 DNA 为模板的阳性对照, 以水代替模板 DNA 的阴性对照; 用 P25 基因的特异引物为扩增引物, 反应体系为 25 μ L, 即 10 \times Taq buffer 2.5 μ L, 25mmol/L MgCl₂ 2 μ L, 2.5mmol/L dNTP 1 μ L, 10 μ mol/L 上游引物 1 μ L, 10 μ mol/L 下游引物 1 μ L, 50~100ng/ μ L 模板 DNA 1 μ L, Taq 酶(5U/ μ L) 0.2 μ L, 灭菌水 16.3 μ L; 反应条件为 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 30s, 58℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min, 进行 35 个循环; 最后 72℃ 继续延伸 10min, 4℃ 保存。PCR 结束后, 取 2 μ L 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

2 结果与分析

2.1 电泳和紫外分光光度计检测家蚕基因组 DNA

采用改进的方法提取的家蚕基因组 DNA, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测显示(图 1), 所提的家蚕基因组 DNA 的电泳条带位置与 23kb 分子量标准条带处于同一水平排列, 很多样品无拖带或拖带微弱, 说明所提 DNA 分子量大小较完整, 断裂情况较少, 初步可以推断 DNA 的质量较好。

将所提基因组 DNA 进行紫外分光光度计检测浓度和纯度(结果见表 1), A260 与 A280 的比值基本上在 1.6~1.9 之间, 浓度也在 100~400 μ g/mL 的水平, 进一步表明了所提 DNA 质

量较好,浓度及 DNA 含量也都能满足进一步的分子生物学实验要求。

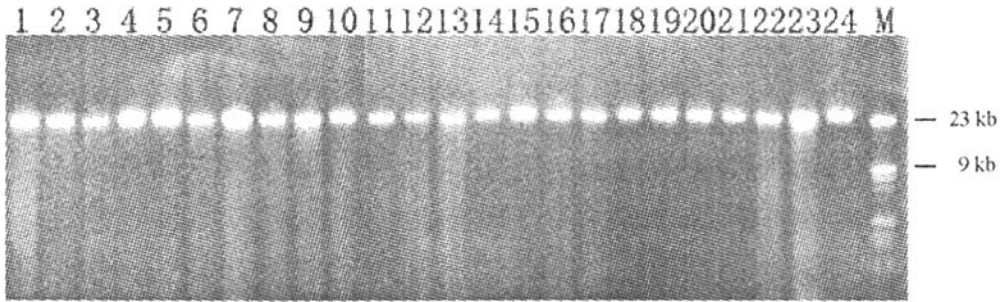


图1 家蚕基因组 DNA 0.8% 琼脂糖凝胶电泳结果

1~24:不同品种家蚕的基因组 DNA; M:ADNA/Hind III 分子量标准 marker

表1 数据显示,有个别样品的 DNA 浓度较低(如碧莲蚕),这可能与材料的质量有关。因为有些材料在保存过程中冻融次数增多, DNA 可能会发生一定降解,从而影响 DNA 的浓度和质量。林万华等人^[4]提出,用 75% 酒精常温浸泡密封保存昆虫样品数周后进行全基因组 DNA 提取可以防止基因组的降解,为我们提供了保存用于基因组提取的材料的新方法。

表1 不同品种家蚕基因组 DNA 提取情况

品种	A260 /A280	浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	DNA 含量(μg) /100mg 组织	品种	A260 /A280	浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	DNA 含量(μg) /100mg 组织
V ¹ M ⁴	1.772	253	50.6	松花蚕姬	1.745	205	41.0
02-210	1.889	170	34.0	小石丸	1.83	220	44.0
邳县	1.762	93	18.6	BT924	1.743	159	31.8
土种	1.674	225	45.0	C108	1.786	250	50.0
大造	1.917	173	34.6	印度三眠	1.932	148	29.6
15-001	1.794	153	30.6	余杭	1.824	233	46.6
碧莲	1.778	83	18.6	D12	1.725	345	69.0
Mch010	1.776	220	44.0	307	1.903	210	42.0
二眠蚕	1.887	250	50.0	ZT000	1.861	168	33.6
C-4	1.735	268	53.6	宿迁	1.773	333	66.6
07-060	1.794	153	30.6	ZT920	1.766	283	56.6
ZT200	1.588	258	51.6	松花形吴	1.841	203	40.6

2.2 PCR 扩增检测模板 DNA 质量

通过对其中的样品基因组 DNA 进行抽样 PCR 反应,以进一步鉴定所提基因组 DNA 质量(图2),结果发现,所提基因组 DNA 均能很好地扩增出清晰的的目的基因片段,且与传统方法提取的 DNA 所扩增的片段大小、亮度基本无差异,表明用本研究建立的方法所提基因组 DNA 完全可以用于 PCR 等分子生物学实验。

3 讨论

随着家蚕基因组测序工作的完成,家蚕分子生物学的研究也越来越深入,而分子生物学研

究大多是以获得高质量的样品基因组 DNA 为基础,因此提取基因组 DNA 的质量和效率显得非常重要。目前很多研究者采用的基因组 DNA 提取方法主要是 1996 年由夏庆友等人所建立^[2]。虽然 Chomczynski 等人^[5](1997)曾提出用 DNAzol 试剂快速提取基因组 DNA,但该法适合于小量组织和细胞基因组 DNA 的提取,而对于 100mg 左右的组织基因组 DNA 的提取,我们通过实验比较发现,该方法还没有本研究建立起来的方法提取效果好、成本低。莫红丽等人(2001)也建立了一种蚕卵基因组 DNA 快速提取的方法^[6],为 RAPD 分析奠定了基础。但传统的提取方法基本都需要用液氮对组织进行研磨,抽提过程中多次使用酚氯仿提取,又使用人力振摇抽提,费时费力,且很难均衡地控制力度,结果导致基因组 DNA 获得率减少,完整性降低,对进一步的分子生物学实验造成了不同程度的影响。

本研究是在前人建立的方法基础上进行的改进,主要差别和优势体现在以下几个方面:(1)将液氮研磨步骤改为直接将组织剪碎,无需准备研钵和液氮,节省了大量人力和物力;(2)增大了蛋白酶 K 的用量以使组织在更大程度上进行消化,并将 RNase 与蛋白酶 K 同时加入一起进行消化,节省了 RNase 单独消化所耗费的时间;(3)本研究引入旋转振荡培养箱旋转混匀的手段,不仅降低了 DNA 发生断裂的几率,而且节省了传统方法抽提过程所需要的人力。利用改进的方法,我们已经提取了大量家蚕样品的基因组 DNA,且实验证明所有样品 DNA 质量都很高,说明本法具有重复性好、可操作性、省时省力、获得率高、质量好等优点,不但完全满足了家蚕分子生物学研究的基本需要,同时也为其它昆虫基因组 DNA 的提取提供了新的思路和参考。

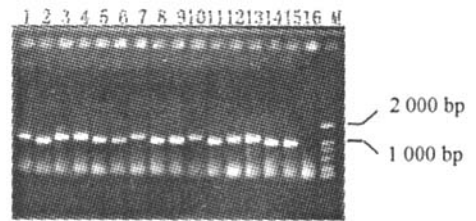


图2 PCR 产物的电泳检测

1~14. 不同品种家蚕的基因组 DNA 的 PCR 产物; 15. 阳性对照(即传统提取法的 DNA 作为模板的 PCR 产物); 16. 阴性对照(即未加基因组 DNA); M. DL2000 分子量标准 marker

参 考 文 献

- 1 Nagaraja G. and Nagaraju M. Genome fingerprinting in silkworm, *Bombyx mori* using random arbitrary primers [J]. *Electrophoresis*. 1995,16:1633-1638
- 2 夏庆友,周泽扬,鲁成,等. 家蚕 RAPD 的扩增条件、重复性及遗传模型研究[J]. *蚕业科学*,1996,22(1):20-25
- 3 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,1999
- 4 林万华,黎宗展,陈振鹏,等. 昆虫全基因组 DNA 的保存及提取[J]. *广西师范大学学报自然科学版*,2006,24(2):86-88
- 5 Chomczynski P, Mackey K, Drews R, Wilfinger W. DNAzol: A reagent for the rapid isolation of Genomic DNA [J]. *BioTechniques* 1997,22:550-553
- 6 莫红丽,廖富蒞,林健荣,等. 适用于 RAPD 分析的蚕卵基因组 DNA 快速提取方法的探讨[J]. *农业生物技术学报*,2004,9(4):395-399

A simple method of isolating high quality Genomic dna from the silkworm

CHEN Dong - Mei LIN Ying WANG Yan - Xia
YANG Yu DAI Fang - Yin XIA Qing - You

(College of Biotechnology, Institute of sericulture and system biology,
Southwest University, Chongqing 400716, China)

ABSTRACT

This study improved the conventional method for extracting genomic DNA from silkworm. The improved method does not need mortars and liquid nitrogen. Silkworm tissues pieces by scissors is digested in lysis buffer with RNase and proteinaseK, and mix and incubate every step by revolving and shaking incubator. It decrease the loss of genomic DNAs, and improve work efficiency, reduce cost. Genomic DNA was isolated from silkworms of different strains by this improved method, and was amplified by PCR. Results indicated that this improved method is more recovered rate, repeatability, quality than conventional method. This will suffice to research of silkworm in molecular biology.

Key words silkworm (*Bombyx mori*) genomic DNA isolation method

向仲怀院士荣获“重庆直辖 10 周年建设功臣”称号

2007 年 6 月 18 日举行的重庆直辖 10 周年庆祝大会上,128 名披着绶带、胸挂奖章的功臣坐在了重庆市人民大礼堂堂座的前 3 排。他们被重庆市委、市政府授予“重庆直辖 10 周年建设功臣”称号。18 日上午,向仲怀院士作为这个优秀的群体的代表之一,在重庆市人民大礼堂接受了表彰。

重庆市委、市政府的表彰决定中说,直辖

10 年建设发展取得的巨大成就,是千千万万劳动者在各条战线共同创造的,为了树立典型,表彰先进,市委、市政府决定,授予向仲怀院士等 128 名同志“重庆直辖 10 周年建设功臣”荣誉称号。他们用自己的辛勤劳动创造了不平凡的业绩,以自己的实际行动赢得了社会的广泛认可,是我市 3 100 万人民的优秀代表。