

# 一种改进的快速有效的裸藻 DNA 抽提方法\*

王江新 谢树莲 钟家钰 潘卉 施之新

(中国科学院水生生物学研究所, 武汉 430072)

## A MODIFIED RAPID EFFICIENT DNA EXTRACTION METHOD OF EUGLENOIDS

Wang Jiangxin, Xie Shulian, Zhong Jiayu, Pan hui and Shi Zhixin

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

**关键词** 裸藻, DNA 抽提方法, PCR

**Key words** Euglenoids, DNA extraction method, PCR

大多数裸藻为单细胞游动种类, 无细胞壁, 细胞质外层特化为表质, 部分种类 细胞具胶质的囊壳. 表质、囊壳的主要成分为蛋白质, 使之具有柔韧的类牛皮糖的特性, 给裸藻破细胞、DNA 抽提及进行下一步工作造成一定的难度. 本文在比较、改进的基础上, 得到一种快速有效的裸藻 DNA 抽提方法.

### 1 材料方法

#### 1.1 试剂

(1) DNA 抽提液 250mmol/L TrisHCl pH 8.0, 60mmol/L Na<sub>2</sub> EDTA, 4% SDS (W/V)

(2) TE 10mmol/L TrisHCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0

以上试剂在使用以前, 均经分装高压灭菌.

**1.2 实验材料** 纤细裸藻 (*Euglena gracilis* 48) 是裸藻类的一种典型代表, 与其他的裸藻类, 诸如螺旋裸藻 (*E. spirogyra*), 阿洛格裸藻 (*E. allogei*) 等相比, 纤细裸藻的破细胞是最困难的.

\* 国家自然科学基金项目 (No. 39570063)  
1999-08-02 收到; 1999-09-10 修回

**1.3 实验步骤** 取处在生长对数期的藻液,经离心而得新鲜湿藻 200mg,置于 1.5ml 离心管,室温下加入 600 $\mu$ L DNA 抽提液,震荡或搅拌使藻样悬浮完全,并不时轻轻颠倒,5-15min 之后,加入等体积酚抽提.抽提液在 4 $^{\circ}$ C, 5000r/min 离心 10min,取上清,用酚:氯仿:异戊醇(25/24/1)抽提一次.核酸用 2/3 体积冷异丙醇沉淀,在空气中干燥 5min.用 70%乙醇洗涤沉淀 2 次,干燥.沉淀用 600 $\mu$ L 溶解完全并加 RNase A (终浓度为 1 $\mu$ g/mL) 37 $^{\circ}$ C 温育 15min 处理去 RNA,然后氯仿:异戊醇(24/1)抽提一次.之后,核酸用 2 倍体积的冷乙醇(0.4 mol/L LiCl)沉淀,并在 600 $\mu$ L TE 中溶解.经过 65 $^{\circ}$ C 温育 20min 变性 DNase 之后,在 4 $^{\circ}$ C 下保存.

**1.4 纯度和浓度检测** 纯度用紫外线测定,算出 A260/A280;浓度则用电泳稀释法:即用一系列稀释浓度与标准浓度 Marker 亮度做比较,作出粗略的估算.

**1.5 限制性内切酶酶切** 总反应体积为 15 $\mu$ L:5 $\mu$ L 基因组 DNA,4 单位限制性内切酶,2 $\mu$ L 缓冲液,消化 8.5h.

**1.6 PCR 扩增** 随机引物扩增 PCR,选用 10 bp 引物 11 种(引物号为 S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9 S10 S11,为 Opern 公司提供).扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 3min 之后 35 个循环(94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 38 $^{\circ}$ C 复性 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90s),最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min.

**1.7 电泳条件** 常规琼脂糖凝胶电泳,TE 缓冲液,胶浓度 0.8%,溴化乙锭(5 $\mu$ g/mL).电泳之后在紫外灯下观察,照相.

## 2 结果与讨论

纯度的结果是 A260/A280 = 1.77 说明没有明显的蛋白质污染;浓度的检测结果是 50 $\mu$ g/ $\mu$ L,产率为 30 $\mu$ g/200 mg 鲜藻样.从图 1,2 可以看出,每 200mg 的藻样用此法制备的基因组 DNA 纯度为 A260/A280 = 1.77,产量为 30 $\mu$ g;经电泳后的基因组 DNA 用溴化乙锭染色条带清晰整齐,没有 RNA 拖尾现象;PCR 产物一般在 10 条以上,而且条带清晰可分,可用于亲缘性及系统分析.而酶切结果则发现 DNA 并没有被切断,作者认为很可能是存在着这三种酶的酶切位点.

这种方法主要是改进 Sambrook 等<sup>[1]</sup>及 Bozena Zakrys 等人的蛋白酶 K/酚抽提法<sup>[2]</sup>而得.其主要改进的地方是:(1)破细胞体系的组成 Sambrook, Bozena Zakrys 的体系当中,除 DNA 抽提液之外,需加入蛋白酶 K 并且在 37 $^{\circ}$ C 保温 4-24h,而作者在实验过程中发现,对一般的裸藻品系,直接加入 DNA 抽提液,在室温(20-30 $^{\circ}$ C)下温育 15min 即可达到 95%的破细胞率.延长温育时间并不会明显地增加破细胞的数量,反而,温育时间过长,抽提出的 DNA 含有较多的杂质,如多糖以及胡萝卜素等,可能会导致 PCR 酶切的失败.在实验过程就出现过电泳时,PCR 产物停滞在电泳槽里的情况,解决的方法是再纯化基因组 DNA 或重新抽提一次.(2)酚抽提次数 Sambrook 等, Bozena Zakrys 等人的体系需 3 次酚抽提,本法则一次抽提之后,蛋白质含量就已经很少了,再次酚抽提则中间界面已无可见蛋白质,多次抽提并无必要.这样,不仅节省了抽提时间,而且,由于抽提次数少了, DNA 在抽提过程中的损失也会减少,从而提高了 DNA 的产率.这对不易得到大量样品的裸藻类来说,能保证用少量的藻样得到足够研究用的 DNA,这点是非常重要的.(3) RNase A 的处理 Sambrook 等, Bozena Zakrys 等的体系中, RNase 处理在最后一次 DNA

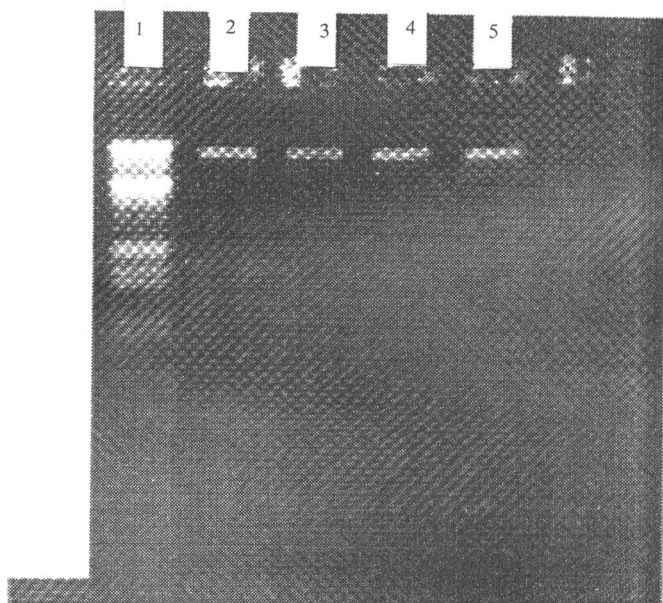


图 1 DNA 电泳与酶切结果(Lane 1 Marker( $\lambda$ DNA/Hind III), Lane 2 为基因组 DNA, Lane 3, 4, 5 分别为 BamH I, EcoR I, Hind III 酶切结果)

Fig.1 Electrophoregrams of genome DNA (lane 2) and its individuals digested by BamH I (lane 3), EcoR I (lane 4) and Hind III (lane 5), lane 1 is Marker( $\lambda$ DNA/Hind III)

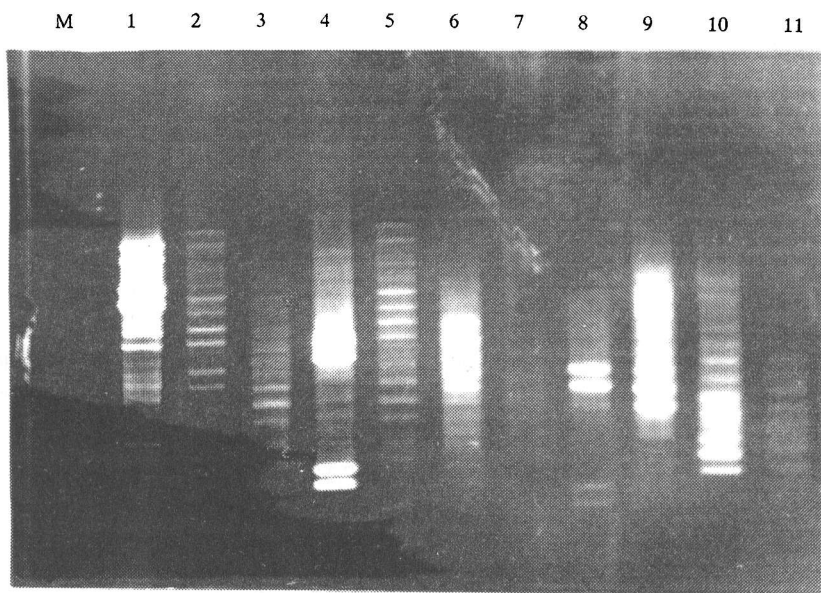


图 2 RAPD 电泳结果(Lane 1 PCR Marker, Lane 2 - 12 为以 S1 - S11 引物的 PCR 扩增产物)

Fig.2 Electrophoregrams of RAPD results (lane 1 is PCR Marker and lane 2 - 12 are the RAPD results from S1 - 11 primer respectively)

沉淀之前,此时 RNase A 的量虽然较少( $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ),可依然是一定量的蛋白质污染.这一步放在第一次粗 DNA 的溶解时候,一样可以去掉 RNA,而且,不会有不必要的蛋白质污染.

由于国内未见有裸藻 DNA 的抽提方法,加上裸藻细胞无细胞壁,可变形运动,又有叶绿素可进行光合作用,兼有动植物的双重特性<sup>[3]</sup>,因此,除改进 Sambrook 等, Bozena Zakrys 等的 DNA 蛋白酶 K/酚抽提体系之外,还对几种其他 DNA 抽提方法进行了试验,结果发现这几种方法都不很适合裸藻. Blin 和 Stafford(1976)的改进方法<sup>[4]</sup>适用于动物细胞,它的匀浆裂解体系对破裸藻细胞效果不明显,终产量不高;而一般提取高等植物 DNA 的方法<sup>[5]</sup>,尽管方法本身已经很成熟,可是此法所需样品为 0.5g 以上,对生长较为缓慢,不易得到大量藻样的裸藻类而言,提取 DNA 时所需藻样的多少就成了一个限制性因素;至于适用于蓝藻 DNA 抽提的 CTAB 法<sup>[6]</sup>,操作也比较方便简单,但其破细胞缓冲体系(TES + 50 mg/mL 的溶菌酶)对裸藻细胞的效率较低,要达到 95% 的破细胞,温育时间需 8h,这无疑增加了实验时间(同时,本法的缓冲体系对蓝藻的破细胞也有效);Saunders 的凝胶纯化提取红藻基因组 DNA 法<sup>[7]</sup>,由蛋白酶 K/酚抽提粗制 DNA 和凝胶纯化两部分组成,所需藻样少(100 - 200 mg),得到的 DNA 质量高(均可有效 PCR),缺点在于耗时长,95% 破细胞需 1h,胶纯化 3 - 4h,而且目前凝胶纯化 DNA 一般均需试剂盒,费用较贵,不太适用一般国内藻类实验室裸藻进行 DNA 分子系统学的研究工作.

总之,本文通过改进 Sambrook 等, Bozena Zakrys 等人的方法,建立的提纯微量裸藻基因组 DNA 的方法,既有快速简便的特点,又有需藻量少,产量高的优点,这对研究裸藻分子系统学,遗传学是个非常实用有效的方法,同时,此法对其他淡水微型藻 DNA 的抽提也具有一定的参考价值.

## 参 考 文 献

- [1] Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular Cloning. A laboratory manual. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989, 1120
- [2] Bozena Zakrys, Robert K., Irenenz M. Genetic and morphological variability among clones of *Euglena* *Pisciformis* based on RAPD and biometric analysis. *Algological studies*. 1996, 81:1 - 21
- [3] Leland P. Johnson. The Taxonomy, phylogeny, and evolution of the genus *Euglena*. The biology of *Euglena*. New York and London: Academic Press, 1968, 1 - 24
- [4] Blin N., Stafford D. W. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 1976, 3:2303
- [5] 戴思兰,陈俊愉等. DNA 提取方法对 9 种菊属植物 RAPD 的影响. *园艺学报*. 1996, 23:169 - 174
- [6] Dexter Chisholm. Miniprep of chromosomal DNA from *Synechocystis* 6803. *Cyanoneus*. 1990, 6(3):312
- [7] Gary W. Saunders. Gel purification of red algae genomic DNA: an inexpensive and rapid method for the isolation of polymerase chain reaction - friendly DNA. *J. Phycol.* 1993, 29:251 - 254