

研究简报

# 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. allogaei*)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℃, 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℃ 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℃ 温育 20min 变性 DNase 之后, 在 4℃ 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℃ 3min 之后 35 个循环(94℃ 变性 30s, 38℃ 复性 30s, 72℃ 延伸 90s), 最后在 72℃ 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, 作者认为很可能是不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℃ 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℃)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

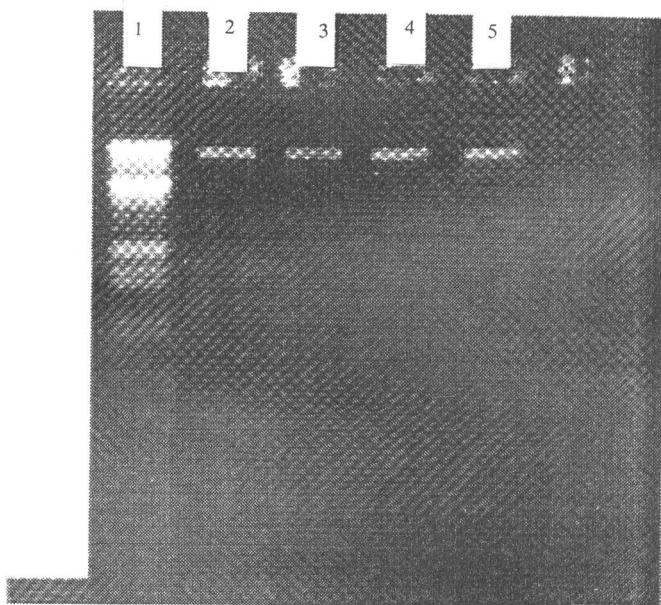


图 1 DNA 电泳与酶切结果(Lane 1 Marker( $\lambda$ DNA/Hind III), Lane 2 为基因组 DNA, Lane 3, 4, 5 分别为 BamH I, EcoR I, Hind III 酶切结果)

Fig. 1 Electroporegrams of genome DNA (lane 2) and its individuals digested by BamH I(lane 3), EcoR I(lane 4) and Hind III(lane5), lane 1 is Marker( $\lambda$ DNA/Hind III)

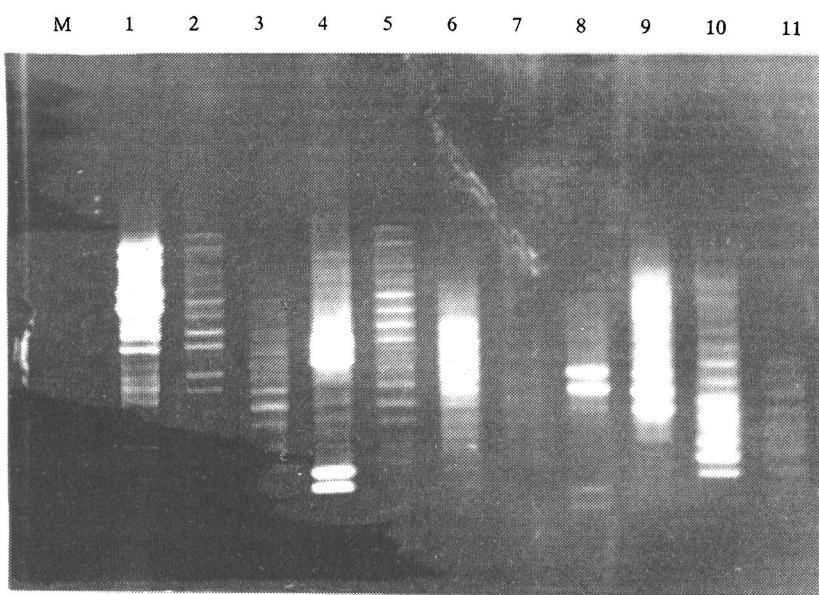


图 2 RAPD 电泳结果(Lane 1 PCR Marker, Lane2 – 12 为以 S1 – S11 引物的 PCR 扩增产物)

Fig. 2 Electroporegrams 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, Bozenna 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, Bozenna 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] Bozenna Zakrys, Robert K., Irenenz M. Genetic and morphological variability among clones of Euglena Pisciformis based on RAPD and biometric analysis. *Algalogical studies*. 1996, 81:1 – 21
- [3] Leland P. Johnson. The Taxonomy, phylogeny, and evolution og 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, 陈俊渝等. 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. *Cyanonews*. 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