

研究简报

## 圆形碘泡虫孢子的分离纯化与裂解

鲁义善 吴英松 汪建国

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

### A METHOD FOR ISOLATION, PURIFICATION AND LYSIS OF *MYXOBOLUS* SPORES

LU Yishan, WU Ying song and WANG Jianruo

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

关键词: 圆形碘泡虫; 分离与纯化; 裂解

Key words: *Myxobolus rotundus*; Isolation; Purification; Lysis

中图分类号: S941.51 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2001)04-0431-02

近年来, 粘孢子虫的分子生物学及免疫学逐步发展<sup>[1, 2]</sup>, 在很多研究中都需以纯净的孢子为材料, 因此如何从鱼体分离出纯净的孢子就显得格外重要。另一方面, 粘孢子虫的孢子具坚韧的壳瓣, 在提取虫体基因组 DNA 时, 必须先使其裂解, 方法主要有常规裂解液裂解法、热裂解法、超声破碎法、液氮冷冻研磨法等几种方法, 本文对这几种方法进行比较后认为: 液氮冷冻研磨法既可使多数虫体裂解, 对 DNA 的破坏又比较小, 是较为行之有效的方法。

#### 1 材料和方法

1.1 材料 病鱼系武汉市鄂州收集的冻存标本, 其体表具有大量圆形碘泡虫(*Myxobolus rotundus* Nemeczek, 1911)孢囊。

1.2 粗孢子的分离 用镊子小心取下孢囊, 于研钵中磨碎, 用含 2% 盐酸( v/v) 的 2% 胰蛋白酶( w/v) 消化 1~3h, 然后经双层纱布过滤, 滤液 1000r/min 离心 10min, 弃上清。

1.3 孢子的提纯 沉淀加适量蒸馏水重悬, 并加等量乙醚, 剧烈振荡后 200r/min 低速离心, 吸出上层乙醚及中间层, 下层水相 1000r/min, 离心 10min, 沉淀用 0.1mol/L pH8.0 的 PBS 洗三次。

1.4 常规裂解法 将孢子( $2 \times 10^6$ )重悬于 500μL 裂解液(100mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris pH7.6, 10mmol/L EDTA, 0.2% SDS, 0.2mg/mL 蛋白酶 K), 37℃温育 16h。

收稿日期: 2000-11-102; 修订日期: 2001-01-28

基金项目: 中国科学院重大项目(KZ951-B1-111); 中国科学院生命科学与生物技术青年科学家小组项目(1999051); 中国科学院知识创新项目(KSCX2-1-04); 湖北省自然科学基金资助(98J019)

作者简介: 鲁义善(1974—), 男, 山东济南人, 硕士研究生, 研究方向: 寄生原生动物学。聂品研究员和王桂堂副研究员对本文提出宝贵意见, 一并致谢

通讯作者: 汪建国, Email: wangjg@ihb.ac.cn

- 1.5 热裂解法 参照文献<sup>[3]</sup>, 等量孢子置 800W 微波炉用中火加热 1min, 后按常规裂解法进行。
- 1.6 超声破碎法 参照文献<sup>[2]</sup>, 等量孢子先用 0.1mol/L pH8.0 PBS 稀释, 再超声破碎。
- 1.7 液氮冷冻研磨法 参照文献<sup>[4]</sup>, 等量孢子用 PBS 稍作稀释后。加到研钵中, 在研钵中倒入适量液氮, 待冷却后迅速研磨, 重复 3 次即可, 后按常规裂解法进行。
- 1.8 DNA 提取 将上述裂解好的孢子, 按常规酚-氯仿法抽提 DNA, 所得 DNA 溶于 20μL TE 缓冲液 (10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA), Beckman DU-600 蛋白核酸分析仪测 DNA 浓度。

## 2 结果与讨论

- 2.1 孢子的提取 经胰蛋白酶消化获得的粗孢子, 用乙醚处理后, 杂质聚集于乙醚与水的中间, 用吸管小心将其连同乙醚吸出弃掉, 下层经洗涤离心后, 在管底一乳白色团块即为纯净孢子。
- 2.2 孢子的裂解 显微镜下观察, 血球计数器计数, 裂解率由公式  $(1 - \text{完整孢子}/2 \times 10^6) \times 100\%$  得出, 结果发现, 常规裂解法仅能裂解 28.8% 的孢子, 热裂解法可裂解 53.5% 的孢子, 液氮冷冻研磨法可裂解 84.7% 的孢子, 而超声破碎法可使所有的孢子破碎。
- 2.3 DNA 提取 不同的裂解方法提取的 DNA 浓度有很大差异如下表 1。

表 1 不同裂解方法对 DNA 提取浓度的影响  
Tab. 1 Effect of different lysis methods to DNA concentration

Sample ID	吸光值 Absorbance 260.0nm	吸光值 Absorbance 280.0nm	260nm/280nm	核酸 Nucleic Acid (μg/μL)
常规裂解法 Common lysis	0.1295	0.0870	1.4367	4.4662
热裂解法 Heat lysis	0.5593	0.5258	1.2666	5.4762
超声破碎法 Ultrasonication	0.6295	0.6005	1.4017	3.7755
液氮冷冻研磨法 Ground while frozen under liquid nitrogen	0.3085	0.2059	1.4972	12.0091

方法学上的微小进步对研究来说, 都是至关重要的。本文所述方法简便易行, 遗憾是由于乙醚对蛋白质具潜在破坏作用, 所得虫体不能用于免疫学研究。孢子的裂解程度应与所得 DNA 浓度成正比, 但超声破碎却会破坏绝大多数 DNA, 因此虽则超声破碎法会使全部孢子裂解, 其 DNA 产量却最低, 这提示在提取虫体可溶性抗原时, 超声破碎可能是个较为理想的方法; 液氮冷冻研磨法由于在处理过程中避免了热变性这一环节, 对 DNA 的破坏比较小, 是获得 DNA 比较理想的一种方法。

## 参考文献:

- [1] 吴英松, 汪建国. 圆形碘泡虫免疫原性的研究 [J]. 水生生物学报, 2000, 24: 246—251
- [2] 陶增思. 鲤吉陶单极虫免疫原及基因组研究 [D]. 博士毕业论文, 1996
- [3] Andree K B, Gresoviac S J, Hedrick R P. Small subunit ribosomal RNA sequence unite alternate eactinosporean and myxosporean stages of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease in salmonid fish [J]. *J. Euk Microbiol.*, 1997, 64(3): 208—215
- [4] Siddall M E. The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic cnidaria [J]. *J. Parasitol* 1995, 81(6): 961—967