

文章编号: 1674-5566(2013)02-0168-05

## 贝氏肩孔南极鱼基因组 DNA 提取方法改进的初步研究

顾铭悦<sup>1</sup>, 许强华<sup>1,2,3,4</sup>

(1. 上海海洋大学 海洋科学学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 大洋渔业资源可持续开发省部共建教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 农业部大洋渔业资源环境科学观测实验站, 上海 201306; 4. 国家远洋渔业工程技术研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 由于南极鱼的体内存在抗冻蛋白, 不同于一般鱼类, 常规基因组 DNA 的提取较为困难。为建立南极鱼基因组 DNA 提取的有效方法, 利用贝氏肩孔南极鱼 (*Trematomus bernacchii*) 为材料, 采用改进的酚-氯仿法提取基因组 DNA, 与传统酚-氯仿法和快速试剂盒抽提法作对比, 并通过琼脂糖凝胶电泳、紫外分光光度计测定、以及 PCR 扩增等手段进行基因组 DNA 质量的检测。结果表明: 利用改进的基因组 DNA 提取方法, 从贝氏肩孔南极鱼获得的基因组 DNA, 电泳条带整齐明亮,  $A_{260}/A_{280}$  值接近 1.80, 适合后续的 PCR 扩增实验, 可满足基于 PCR 技术的相关分子生物学实验需要。

**研究亮点:** 国内对贝氏肩孔南极鱼鲜有研究, 由于其体内富含抗冻蛋白, 常规基因组 DNA 提取较为困难。本文首次对贝氏肩孔南极鱼基因组 DNA 的提取方法进行了研究, 利用改进后的方法可以快速简便地得到高质量的基因组 DNA。该方法也可用于其他南极鱼类基因组 DNA 的提取, 从而为南极鱼的相关研究奠定基础。

**关键词:** 贝氏肩孔南极鱼; 基因组 DNA; 改进酚-氯仿法; 16S rRNA

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

贝氏肩孔南极鱼 (*Trematomus bernacchii*), 属鲈形目 (Perciformes), 南极鱼亚目 (Notothenioidei), 南极鱼科 (Notothenioid), 肩孔南极鱼属 (*Trematomus*), 分布于南极洲沿岸的海域内<sup>[1]</sup>。南极鱼科的鱼类依靠其体内抗冻糖蛋白的特殊作用, 能在低温环境下生存, 并在长期的进化过程中, 对极端寒冷天气产生了适应性。在南极海洋鱼类系统中, 南极鱼科鱼类的多样性和生物量均相当丰富。据估计, 大约有 100 种南极鱼科的鱼类生活在南大洋中, 南极鱼科鱼类在种类多样性 (76.6%)、丰度 (91.6%) 和生物量 (91.2%) 上都独占优势<sup>[2]</sup>。

众所周知, 获得高质量的基因组 DNA 是进行多种分子生物学实验 (如 PCR、构建基因组文库、遗传多样性检测等) 的前提。酚-氯仿法抽提 DNA 是最为经典, 也是一般实验室常用的方

法<sup>[3]</sup>。但是, 由于其体内丰富的抗冻蛋白, 基因组 DNA 的提取存在一定的困难<sup>[4]</sup>, 本实验室多次实验结果也显示: 运用传统酚-氯仿抽提法和快速试剂盒抽提法均无法从含有大量抗冻蛋白的鱼体组织中得到高质量基因组 DNA。

本实验方法在借鉴其他组织基因组 DNA 提取的基础上, 改进了反应体系和实验步骤, 可以快速、高效地从贝氏肩孔南极鱼肌肉组织中提取出高质量基因组 DNA。该方法同样适用于其它几种南极鱼基因组 DNA 的提取。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 材料来源

样本来自雪龙号第 27 次南极科考项目, 南极中山站外海生物调查取样的贝氏肩孔南极鱼

收稿日期: 2012-09-20 修回日期: 2012-11-24

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划培育项目(91131006)

作者简介: 顾铭悦(1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物遗传保护。E-mail: gmygmy001@yahoo.com.cn

通信作者: 许强华, E-mail: qhxu@shou.edu.cn

(*Trematomus bernacchii*), 对照组样本鲫 (*Carassius auratus*) 取样于上海临港新城滴水湖。

### 1.1.2 主要试剂及引物

主要试剂及引物包括 Tris-Cl、EDTA、NaCl、蛋白酶 K、Takara Ribonuclease A (RNase A)、Tris-饱和酚、氯仿、异戊醇、无水乙醇、PCR 扩增体系(引物、 $10 \times Taq$  buffer、去离子水 ddH<sub>2</sub>O、三磷酸脱氧核糖核苷 dNTP、*Taq* DNA 聚合酶)、琼脂糖等。用于扩增南极鱼 16S rRNA 的引物序列如下, P: 5'-CTCGTCCCTTTTGCATGATTTAGCCAG-3', R: 5'-GCCCTCGTTATGCCATTACATACAGGTCTC-3', 由上海杰李生物工程公司合成。

### 1.1.3 主要仪器

主要仪器包括 EPPENDORF 3417R 5407 离心机, EPPENDORF PCR 仪, BIO-RAD 电泳槽 PowerPac Basic 041BR, SHZ-A 水浴恒温振荡器, 海尔冰箱 BCD-196F, NanoDrop2000C 紫外分光光度计。

## 1.2 方法

利用改进酚-氯仿法、传统酚-氯仿法和快速试剂盒提取法对贝氏肩孔南极鱼和对照组鲫组织样本进行基因组提取。

### 1.2.1 利用改进酚-氯仿法提取基因组 DNA

取鱼尾部肌肉(去除鳞片)50 mg 仔细剪碎, 转入离心管中。然后加组织裂解液(10 mmol/L Tris-Cl pH 7.5, 100 mmol/L EDTA pH 8.0, 100 mmol/L NaCl)300  $\mu$ L, 10% 十二烷基磺酸钠 SDS 100  $\mu$ L, 蛋白酶 K(20 mg/ $\mu$ L)5  $\mu$ L, 充分混匀。56  $^{\circ}$ C 水浴消化 2~3 h 至澄清, 每隔半小时轻柔混匀几次, 加速消化过程。再向离心管中加入 NaCl 溶液(5 mol/L)80  $\mu$ L, 混匀会有白色絮状物析出, 再加入等体积抽提液 1 [ $V(\text{苯酚}): V(\text{氯仿}): V(\text{异戊醇}) = 25:24:1$ ], 手动轻微颠倒离心管充分混匀 10 min, 使蛋白质充分变性。12 000 r/min 离心 5 min。吸取上清, 加入等体积抽提液 2 [ $V(\text{氯仿}): V(\text{异戊醇}) = 24:1$ ] 再次抽提, 充分混匀。12 000 r/min 离心 5 min, 取上清。加入 2.0 倍上清液体积的预冷冰乙醇, 轻轻颠倒离心管, 混匀后使 DNA 形成絮状沉淀析出。10 000 r/min 离心 5 min, 使 DNA 沉淀。用 70% 的乙醇冲洗 DNA 沉淀, 真空干燥或自然凉干后, 加入 50  $\mu$ L TE (10 mmol/L Tris-Cl pH 7.5, 1 mmol/L EDTA pH 8.0) 溶解 DNA, 加入 RNase A 1  $\mu$ L (10

mg/mL), 37  $^{\circ}$ C 1 h。

### 1.2.2 使用传统酚-氯仿法提取基因组 DNA

酚-氯仿法: 参照 PAABO 和 WILSON<sup>[5]</sup> 及分子克隆指南的方法<sup>[6]</sup>。消化裂解 50 mg 尾部肌肉, 等体积饱和酚抽提 1 次,  $V(\text{饱和酚}): V(\text{氯仿}): V(\text{异戊醇}) = 25:24:1$  抽提 2 次,  $V(\text{氯仿}): V(\text{异戊醇}) = 24:1$  抽提 1 次, 加入 NaAc, 无水乙醇沉淀, -20  $^{\circ}$ C 1~2 h, 离心沉淀, 70% 的乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次, 干燥, 50  $\mu$ L TE 溶解, 加入 RNase A 1  $\mu$ L (10 mg/mL), 37  $^{\circ}$ C 1 h。

### 1.2.3 使用试剂盒提取基因组 DNA

使用组织基因组 DNA 快速提取试剂盒 DN07 (艾德莱生物科技有限公司, 北京) 消化 50 mg 尾部肌肉, 提取南极鱼类基因组 DNA。实验步骤同试剂盒使用手册。

### 1.2.4 琼脂糖凝胶电泳检测

用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测所提取的基因组 DNA, 电压 100 V, 室温下电泳 20 min, 用凝胶成像系统分析电泳结果, 并拍照保存。

### 1.2.5 分光光度法检测

吸取基因组 DNA 2  $\mu$ L, 以溶解 DNA 沉淀的 TE 为对照, 在 NanoDrop2000C 紫外分光光度计上检测其浓度和  $A_{260}/A_{280}$  值。检测数据采用 SPSS 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

### 1.2.6 16S rRNA PCR 扩增检测

我们使用 16S rRNA 引物对所提取的贝氏肩孔南极鱼基因组 DNA 质量进行验证。16S rRNA 基因具有高度的保守性和特异性, 应用该技术可以实现对物种进行准确简便地分类鉴定<sup>[7]</sup>。随着 GenBank 数据库的不断完善, 16S rRNA 基因检测技术已成为物种检测和鉴定的一种强有力工具。

PCR 扩增体系为:  $10 \times$  buffer 5  $\mu$ L, 4  $\mu$ L dNTP, 上、下游引物各 1.5  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), DNA 模板 2  $\mu$ L, *Taq* 酶 0.5  $\mu$ L, 加双蒸水至 50  $\mu$ L。

PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 45 s, 55  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35 次循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增完毕后, 取 2.5  $\mu$ L 的 PCR 产物在 1.0%~1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳检测扩增结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组 DNA 质量的琼脂糖凝胶电泳检测

由图 1a 可以看出, 改进方法提取的贝氏肩孔南极鱼 DNA 条带清晰明亮、整齐、无降解现象,

而图 1b 显示传统的酚-氯仿法提取的贝氏肩孔南极鱼 DNA 条带模糊不清,且有严重拖带现象,说明 DNA 提取质量不高,降解严重。图 1c 显示试剂盒法提取的贝氏肩孔南极鱼 DNA 无明显条带,且有拖尾,表明基因组 DNA 浓度很低,提取效率不高。3 种方法提取的鲫基因组 DNA 都清晰明亮,说明 3 种方法在常规鱼类样本中可以取得较好的效果,与之相比,贝氏肩孔南极鱼中仅有改进酚-氯仿法较好地提取到了基因组 DNA。贝氏南极鱼和鲫的对照实验可以说明改进的酚-氯仿法是一种成功、有效的提取方法。

## 2.2 基因组 DNA 质量的分光光度法检测

纯净 DNA 样品的  $A_{260}/A_{280}$  值应为 1.80,处于 1.70~1.85 之间属于正常,若高于 1.80,表明样品中可能含有 RNA,若低于 1.80,表明样品中可能含有蛋白质<sup>[8]</sup>。检测数据采用 SPSS 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。由表 1 可见,改进酚-氯仿法提取的贝氏肩孔南极鱼基因组 DNA 样品的  $A_{260}/A_{280}$  为  $1.78 \pm 0.05$ ,属于正常的范围,接近 1.80,与传统酚-氯仿法和快速试剂盒提取的南极鱼基因组都存在显著差异( $P < 0.05$ ),传统酚-氯仿法和快速试剂盒提取的贝氏肩孔南极鱼基因组 DNA 纯度  $A_{260}/A_{280}$  分别为  $1.69 \pm 0.07$  和  $1.96 \pm 0.12$ ,存在蛋白质和小分子 RNA 污染。改进酚-氯仿法提取的贝氏肩孔南极鱼基因组 DNA 浓度达到  $695.46 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,为 3 种方法

中浓度最高的,与另外两种方法提取的 DNA 浓度也存在显著差异( $P < 0.05$ )。对照组鲫数据显示 3 种方法都能提取到较为纯净的鲫基因组 DNA, DNA 纯度  $A_{260}/A_{280}$  无显著性差异( $P > 0.05$ ),改进酚-氯仿法提取的鲫基因组 DNA 浓度较高,仅次于快速试剂盒法(表 1)。

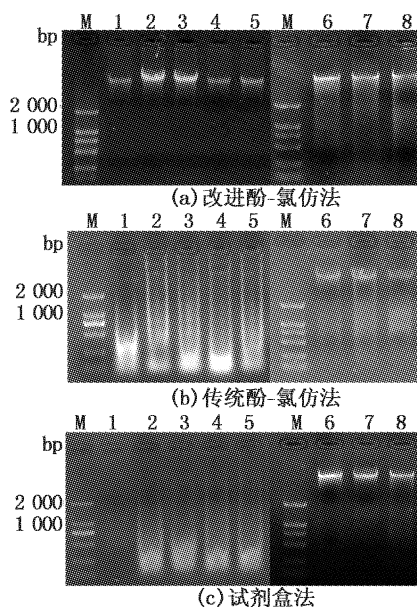


图 1 不同方法提取的 DNA 琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 1 Electrophoresis of DNA extracted by different methods

M. DL 2 000 marker; 1-5. 贝氏肩孔南极鱼基因组 DNA; 6-8. 鲫基因组 DNA。

表 1 不同方法提取基因组 DNA 的纯度和浓度

Tab. 1 Purity and concentration of genomic DNA extracted by different methods

提取方法	纯度 $A_{260}/A_{280}$		浓度/( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )	
	贝氏肩孔南极鱼	鲫(对照组)	贝氏肩孔南极鱼	鲫(对照组)
改进酚-氯仿法	$1.78 \pm 0.05^a$	$1.86 \pm 0.04^a$	$695.46 \pm 68.66^a$	$758.37 \pm 54.75^a$
传统酚-氯仿法	$1.69 \pm 0.07^b$	$1.88 \pm 0.09^a$	$234.10 \pm 63.32^b$	$508.00 \pm 45.44^b$
快速试剂盒法	$1.96 \pm 0.12^c$	$1.83 \pm 0.05^a$	$152.52 \pm 51.57^b$	$886.47 \pm 30.46^c$

注:表中数据为平均值  $\pm$  标准差,同列标有不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

## 2.3 基因组 DNA 质量的 PCR 检测

本研究利用 16S rRNA 引物对南极鱼类基因组 DNA 进行 PCR 扩增。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。结果见图 2a: 条带清晰明亮,可见基因组 DNA 均扩增出了 750 bp 左右的片段;图 2b: 条带不清晰,并且扩增成功较少;图 2c: 未成功扩增,检测不到条带的出现。因此,用改进酚-氯仿法提取的基因组 DNA 可以满足基于 PCR 技术的相关分子生物学实验需要。

## 3 讨论

基因组 DNA 提取是最常用的分子生物学技术,在多项分子生物科研实验中(如物种鉴定、构建基因组文库、遗传结构检测分析等)广泛使用<sup>[9]</sup>。其中,酚-氯仿法抽提 DNA 是最为经典也是最常用的方法<sup>[3]</sup>,常规的基因组提取试剂盒抽提法高效快速,使用方便,但在提取贝氏肩孔南极鱼时,这两种提取方法都不适用。南极鱼组织

中蛋白质含量较高<sup>[4]</sup>,提取出的 DNA 极易受蛋白质污染。使用传统酚-氯仿法提取的基因组 DNA 表现为拖带明显,点样孔较亮,说明基因组

DNA 降解严重,并且蛋白质含量较多。试剂盒提取的基因组 DNA 条带不明显,质量不高。

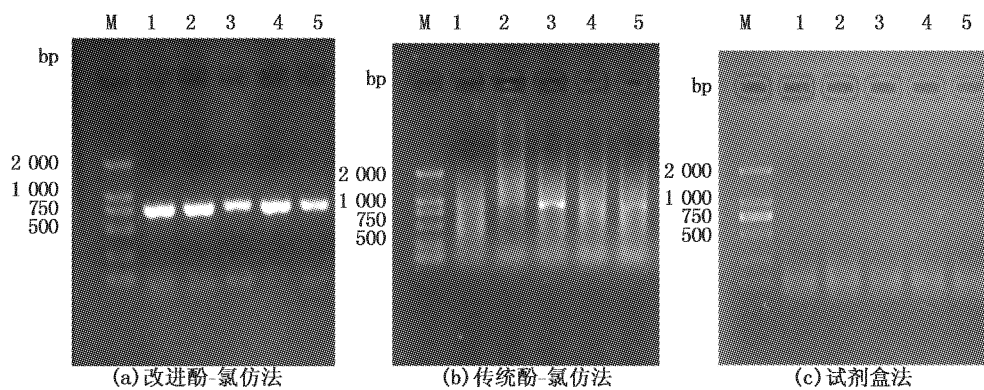


图 2 基因组 DNA 16S rRNA PCR 扩增电泳效果  
Fig. 2 Electrophoresis of 16S rRNA PCR products on agarose gel

M. DL 2 000 marker.

本研究中对传统的酚-氯仿法进行了改进,与其他方法相比,采用浓 NaCl 溶液(5 mol/L)使蛋白质反应变性,与核酸分离,减少了苯酚试剂的使用,防止 DNA 降解,加强了对基因组 DNA 的保护,并且经济实用;整个实验过程中只需要 2 次抽提,减少反复抽提摇匀导致的基因组 DNA 的机械断裂和损失;采用预冷的无水乙醇来增加基因组 DNA 沉淀形成的效果,无须  $-20^{\circ}\text{C}$  沉淀 1 ~ 2 h,并且不使用异丙醇,不影响后续实验<sup>[3]</sup>。

本研究中贝氏肩孔南极鱼和鲫的提取结果显示,传统酚-氯仿法操作繁琐,需时较长,提取效率不高,与刘哲等<sup>[10]</sup>利用传统酚-氯仿法提取冷水性虹鳟鱼基因组 DNA 及李明云和张海琪<sup>[11]</sup>利用酚-氯仿法提取大黄鱼基因组 DNA 的结果一致。试剂盒法提取贝氏肩孔南极鱼基因组 DNA 结果与范慧慧和李明云<sup>[12]</sup>香鱼基因组 DNA 结果一致,在提取蛋白含量较高的组织样本时,电泳条带弥散,DNA 浓度很低,有 RNA 污染残留。改进方法提取的基因组 DNA 条带清晰明亮,且  $A_{260}/A_{280}$  值为 1.78,接近纯净 DNA,蛋白质和小分子 RNA 污染少。贝氏肩孔南极鱼与鲫的对照实验说明,改进酚-氯仿法是一种提取效果和效率都较好的方法。

在 3 种方法中只有改进酚-氯仿法提取的基因组 DNA 能够进行 16S rRNA 基因的扩增,条带清晰明亮、无拖尾,充分验证了该方法提取的 DNA 确实能够满足后续实验要求,为进一步的南

极鱼相关研究奠定了基础。

综上所述,本研究的改进方法可以有效提取贝氏肩孔南极鱼的基因组 DNA,质量和含量明显高于传统的酚-氯仿法和试剂盒提取法,操作过程快速、简便,全过程 3 h 左右,成本较低,是提取南极鱼基因组 DNA 较好的方法。

#### 参考文献:

- [1] HOFMANN G E, BUCKLEY B A, AIRAKSINEN S, et al. Heat-shock protein expression is absent in the antarctic fish *Trematomus bernacchii* (family Nototheniidae) [J]. *Experimental Biology*, 2000, 203: 2331 - 2339.
- [2] KUHN K L, NEAR T J, JONES C D, et al. Aspects of the biology and population genetics of the Antarctic Nototheniid fish *Trematomus nicolai* [J]. *Copeia*, 2009, 2: 320 - 327.
- [3] 王继英,俞英,冯利霞,等. 利用改进的酚-氯仿法从猪毛鲷中提取基因组 DNA [J]. *遗传*, 2010, 32(7): 752 - 756.
- [4] CHENG C C, CHEN L B. Evolution of an antifreeze glycoprotein [J]. *Nature*, 1999, 401: 443 - 444.
- [5] PAABO S, WILSON A C. Polymerase chain reaction reveals cloning artifacts [J]. *Nature*, 1988, 334: 387 - 388.
- [6] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂,译. 北京:科学出版社, 2002: 463 - 476.
- [7] 曹波,杨红,许强华,等. 基于 16S rRNA 技术的长江口微生物分子生物学鉴定分析 [J]. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(2): 191 - 197.
- [8] 谢友菊. 遗传工程概论 [M]. 北京:北京农业大学出版社, 1990: 28 - 29.
- [9] 马洪雨,郭金峰,岳永生. 用改进的酚-氯仿法提取鱼类基因组 DNA 效果的分析 [J]. *家畜生态学报*, 2006, 27(2): 85 - 87.

- [10] 刘哲,康鹏天,柴文琼,等. 鱼类血液基因组 DNA 提取方法优化[J]. 水生态学杂志,2009,2(6): 102 - 106.
- [11] 李明云,张海琪. 大黄鱼高质量基因组 DNA 的简便提取方法[J]. 海洋科学,2002,26(10):15 - 17.
- [12] 范慧慧,李明云. 香鱼基因组 DNA 提取方法的优化[J]. 生物技术通报, 2012(5):158 - 162.

## Preliminary study on improved genomic DNA extraction method from *Trematomus bernacchii*

GU Ming-yue<sup>1</sup>, XU Qiang-hua<sup>1,2,3,4</sup>

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Scientific Observing and Experimental Station of Oceanic Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China; 4. National Distant-water Fisheries Engineering Research Center, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Since lots of antifreeze proteins exist in Antarctic fishes, it is quite difficult to acquire high quality genomic DNA by using normal genomic DNA extraction method. In order to establish an effective genomic DNA extraction technique for Antarctic fish, one kind of Antarctic fish, *Trematomus bernacchii*, was used as the experimental material, and three different kinds of genomic DNA extraction methods (the modified phenol-chloroform method, normal phenol-chloroform method and the genomic extraction kit method) were compared. The acquired genomic DNA was appraised by spectrophotometer, agarose gel electrophoresis, and PCR amplification. The results showed that we successfully obtained high quality genomic DNA from *T. bernacchii* by using our modified phenol-chloroform method. The gel bands were very neat and bright, the ratio of  $A_{260}/A_{280}$  was around 1.80, and the acquired genomic DNA was suitable for PCR experiments. In a word, the extracted genomic DNA by using our modified phenol-chloroform method, was in good quantity and suitable for the PCR-based molecular experiment.

**Key words:** *Trematomus bernacchii*; genomic DNA; modified phenol-chloroform; 16S rRNA