

文章编号: 1004-7271(2003)04-0363-03

·研究简报·

四种紫菜自由丝状体基因组 DNA 提取及酶切

Extraction and restriction digestion of genomic DNA from free-living conchocelis of four species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta)

柳波, 花卫华, 马家海

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

LIU Bo, HUA Wei-hua, MA Jia-hai

(College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

关键词: 基因组 DNA; DNA 提取; 酶切; 自由丝状体; 紫菜

Key words: genomic DNA; DNA extraction; restriction digestion; free-living conchocelis; *Porphyra*

中图分类号: S917 文献标识码: A

绝大多数紫菜的生活史中都具有典型的世代交替现象,除了人们熟悉的叶状体(配子体)世代外,还有微小的丝状体(孢子体)世代。丝状体世代是二倍体世代,遗传性状稳定,是紫菜生产和研究中保种的重要形式^[1]。由于紫菜中海藻多糖含量较高,常用的植物基因组 DNA 提取方法不能完全去除多糖,高纯度紫菜基因组 DNA 的获得比较困难。Hong 等^[2-4]提出并改良了用于紫菜 DNA 提取的 LiCl 法,贾建航等^[5]用改进的 SDS 法提取紫菜丝状体基因组 DNA,并进行了 RAPD 分析,郭宝太等^[6]也对紫菜基因组 DNA 提取进行了报道。这些方法都需要大量的紫菜组织,实际研究中会遇到一些困难。刘必谦等^[7]报道了用 DNA 提取试剂盒提取紫菜基因组 DNA 的方法,所用材料为紫菜叶状体,紫菜叶状体和丝状体相比,不仅是紫菜生活史中两个不同世代,形态差异显著,细胞结构和组成也有较大差别。Shin 等^[8]报道了一种简便、快速提取几种紫菜丝状体基因组 DNA 的方法,并得到了一种紫菜的质粒状 DNA,但没有对其进行酶切处理。本文对条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)、坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)、甘紫菜(*Porphyra tenera*)和贝壳紫菜(*Porphyra tenuipedalis*)四种紫菜自由丝状体基因组 DNA 进行提取,并用限制性内切酶 EcoR I 进行酶切实验。以期为紫菜自由丝状体进一步的分子水平研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 紫菜自由丝状体材料

实验所用材料为条斑紫菜、坛紫菜、甘紫菜和贝壳紫菜自由丝状体,由上海水产大学海洋植物种苗

收稿日期: 2003-06-17

基金项目: 948 项目资助(编号 963088)

作者简介: 柳波(1978-),男,湖北随州人,上海水产大学 2000 级硕士研究生,专业方向为海洋植物种苗工程及增养殖, E-mail: cobbycxid@yahoo.com.cn

通讯作者: 马家海(1940-),男,教授,博士生导师,研究方向为海洋植物种苗工程及增养殖。Tel: 021-65710020

工程及增养殖学科点实验室保存和提供。

1.2 方法

1.2.1 丝状体基因组 DNA 提取

取自由丝状体材料 20~100mg(挤干水),加适量提取缓冲液(15%蔗糖、50mmol/L Tris-Hcl (pH8.0)、50mmol/L EDTA)于研钵中研成匀浆,转入 1.5mL 离心管中,3000r/min 离心 8min,弃上清液,向离心管中加入 70℃预热的 TE 缓冲液(20mmol/L Tris-Hcl (pH 8.0)、10mmol/L EDTA)500 μ L 和 10% SDS 80 μ L,混匀后 70℃温浴 15min,冰浴 30min。待融化后加 5mol/L NH₄Ac 500 μ L 并混匀,6000r/min 离心 10min,取出上清液转移到新离心管中,加入 0.6~1 倍体积 -20℃预冷的异丙醇,4℃静置 1~2h,见有白色 DNA 凝聚物漂出,即用 Tip 头挑出并以适量 70%乙醇清洗,在无菌风下吹干后加入适量 TE 缓冲液溶解,保存备用^[8]。

1.2.2 酶切反应

取基因组 DNA 约 3 μ g,加 EcoR I 30 单位,37℃温育 12h^[7]。

1.2.3 电泳检测及成像

基因组 DNA 和酶切产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳,50V 电泳 3h,电泳结果以 UVP 公司的 GDS7400 型凝胶成像仪进行观察并拍照^[7]。

2 结果

四种紫菜自由丝状体基因组 DNA 提取和 EcoR I 酶切的结果分别如下图 1 和图 2 所示。图 1 为基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果,M 为 λ DNA/Hind III Marker;1-4 分别为条斑紫菜、坛紫菜、甘紫菜和贝壳紫菜的自由丝状体基因组 DNA。图中基因组 DNA 条带清晰,点样孔中无残留,条带上下无拖尾现象,说明用这种方法提取的基因组 DNA 杂质少、无降解。

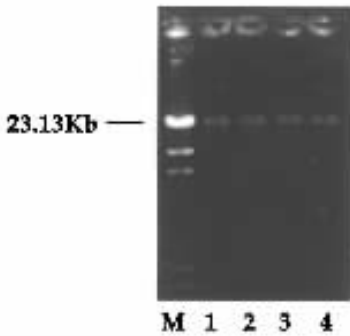


图 1 基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 Electrophoretic patterns of agarose gel showing genomic DNAs from *Porphyra*
M λ DNA/Hind III Marker;
1-4 分别为条斑紫菜、坛紫菜、甘紫菜和贝壳紫菜的自由丝状体基因组 DNA。

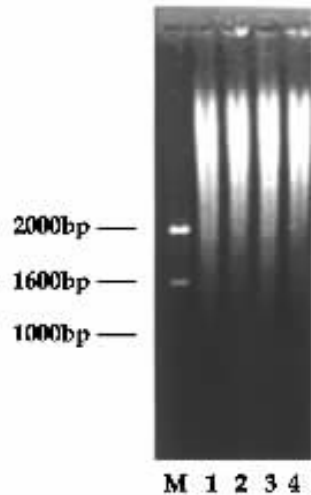


图 2 基因组 DNA EcoR I 酶切结果

Fig.2 Digestion patterns of genomic DNAs with EcoR I
M :DNA Marker DGL 2000 ;
1-4 分别为条斑紫菜、坛紫菜、甘紫菜和贝壳紫菜自由丝状体基因组 DNA 的 EcoR I 酶切结果。

图 2 为基因组 DNA EcoR I 酶切产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果,M 为 DNA Marker DGL 2000;1-4 分别为条斑紫菜、坛紫菜、甘紫菜和贝壳紫菜自由丝状体基因组 DNA 的 EcoR I 酶切结果。四种材料的

基因组 DNA 经 EcoR I 酶切后都均匀弥散分布,说明所得基因组 DNA 能够被 EcoR I 完全酶切,满足后续操作要求。

3 讨论

3.1 实验材料

本实验选取了三种最重要的栽培紫菜种类: 条斑紫菜、坛紫菜、甘紫菜和生活史特异的贝壳紫菜自由丝状体作为研究材料,具有一定代表性。其中,条斑紫菜和甘紫菜自由丝状体基因组 DNA 提取的结果与 Shin 等^[8]报道的相似。在此基础上,作者又用同样的方法专门对坛紫菜和生活史特异的贝壳紫菜自由丝状体基因组 DNA 进行了提取实验,从实验结果看,提取效果良好。

3.2 提取方法

基因组 DNA 提取是进一步进行分子水平研究的前提,但由于紫菜细胞中含大量海藻多糖,应用一般的植物基因组 DNA 提取方法很难去除多糖得到理想的 DNA。多年来,很多研究者试图以各种不同的办法提取紫菜基因组 DNA^[2-8]。相对于传统的植物基因组 DNA 提取方法,Shin 等^[8]报道的方法廉价、简便有效。提取过程中只需要极少量自由丝状体材料,使用的试剂都是实验室的常备试剂,不需要液氮、蛋白酶 K、巯基乙醇和 CTAB 的处理,也不需要经过酚、氯仿的反复抽提,所用仪器亦简便、廉价。

经过反复多次试验,作者发现在提取 DNA 过程中,紫菜丝状体材料过少时可能不能漂出 DNA 凝聚物,可以通过高速离心得到 DNA 沉淀,然后用 70% 乙醇清洗,溶于 TE 缓冲液保存;提取过程中 SDS 和 NH₄Ac 的用量也非常重要,可以根据具体情况适当调整,但 SDS 不宜过多, DNA 溶液中残留的 SDS 会抑制酶切反应等。

3.3 酶切反应

提取的基因组 DNA 要进行 PCR 和酶切等进一步分析,优质的 DNA 应该能满足各种下游操作的要求。酶切反应是进行杂交、RFLP 分析和 AFLP 分析等操作的基本前提,所以能否被限制性内切酶完全酶切成为衡量所得 DNA 质量的一个重要标准。Hong 等^[2-4]用 LiCl 法提取的紫菜基因组 DNA 可以被 Hind III 酶切,但 EcoR I 对其不起作用,他们因此认为紫菜基因组没有 EcoR I 的酶切位点,不能被 EcoR I 酶切。但是后来刘必谦等^[7]通过实验证明用试剂盒提取的紫菜叶状体基因组 DNA 可以被 EcoR I 完全酶切。并提出在 DNA 相同的情况下,Pst I、Mse I、Tag I 和 EcoR I 4 种酶中 EcoR I 对 DNA 纯度的要求最苛刻。因此本文选用了 EcoR I 对所提取的 4 种紫菜基因组 DNA 进行酶切实验,并且得到理想的酶切效果,证明用这种方法提取的紫菜基因组 DNA 质量较好。同时也和刘必谦等^[7]的结果吻合,说明紫菜基因组 DNA 具有 EcoR I 的酶切位点,能被 EcoR I 完全酶切。

参考文献:

- [1] 马家海,蔡守清. 条斑紫菜的栽培与加工[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [2] Hong H K, Coury D A, Polen-Fuller M, et al. Lithium chloride extraction of DNA from the seaweed *Porphyra perforata* (Rhodophyta) thallus[J]. J Phycol, 1992, 28(3): 717 - 720.
- [3] Hong H K, Kim S D, Polen-Fuller M, et al. DNA extraction condition from *Porphyra perforata* using LiCl[J]. J Appl Phycol, 1995, 7(1): 101 - 107.
- [4] Hong H K, Sohn C H, Lee K W, et al. Nucleic acid extraction from seaweed tissues for polymerase chain reactor[J]. J Mar Biotechnol, 1997, 5: 95 - 99.
- [5] 贾建航,王 萍,金德敏,等. RAPD 标记在紫菜遗传多样性检测和种质鉴定中的应用[J]. 植物学报, 2000, 42(4): 403 - 407.
- [6] 郭宝太,毕玉平,单 雷,等. 条斑紫菜高纯度总 DNA 及其质粒 DNA 的提取[J]. 海洋学报, 2000, 22(2): 87 - 91.
- [7] 刘必谦,周湘池,王亚军,等. 紫菜基因组 DNA 提取及酶切[J]. 中国水产科学, 2001, 8(2): 14 - 16.
- [8] Jong-Ahm Shin, Shigeto Kiyokawa, Yumi Kidachi, et al. A simple and rapid method for isolation of total DNA from free-living conchocelis of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. The Korean Journal of Phycology, 1995, 10(2): 117 - 119.