

# 紫菜丝状体 DNA 的提取

王 勇<sup>1</sup>, 裴鲁青<sup>1</sup>, 骆其君<sup>1</sup>, 刘必谦<sup>1</sup>, 费志清<sup>1</sup>, 薛庆中<sup>2</sup>

(1. 宁波大学 海洋生物工程实验室, 浙江 宁波 315211; 2. 浙江大学 华家池校区农业与生物技术学院, 浙江 杭州 310029)

**关键词:** 紫菜; 丝状体; LiCl; 总 DNA; RAPD-PCR

**中图分类号:** Q949.29      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-4193(2002)02-0146-03

## 1 引言

紫菜(*Porphyra* spp.) 是一种大型红藻, 它的孢子体世代是丝状体. 丝状体适于在常温条件下(20 ℃左右)长期保存和培养, 是筛选丝状体优良栽培品系, 利用光生物反应器进行紫菜育苗的理想材料. 紫菜细胞含有大量胞外多糖, 主要以硫酸基多糖和羧基多糖形式存在, 它们比陆生植物的中性多糖更易溶于水, 与 DNA 产生共沉淀, 从而影响限制性内切酶的消化和 PCR 扩增. 另外, 紫菜细胞 DNA 含量较少, DNA 酶含量却很高, 使紫菜 DNA 提取的得率不足<sup>[1]</sup>. RAPD 技术已用于紫菜的种质鉴定和遗传多样性研究<sup>[2-4]</sup>, 但是, 从紫菜丝状体中提取 DNA 的方法不够完善. 提取叶状体 DNA 方法如细胞法并不适用于丝状体, 限制了分子生物学在紫菜丝状体研究上的进一步应用. 本文报道一种从紫菜丝状体中方便提取 DNA 的方法, 提取的 DNA 用于紫菜丝状体的 RAPD-PCR 反应.

## 2 材料和方法

### 2.1 材料

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*) 6 个丝状体无性系 Z1, Z2, Z4, Z5, HZZ, HML, 由宁波大学海洋生物工程实验室保存. Z1, Z2, Z4, Z5 采自福建沿海; HML 和 HZZ 采自浙江沿海.

### 2.2 试剂

CTAB 购自华美生物工程公司, PVPP (polyvinylpyrrolidone), Sarcosyl (十二烷基肌氨酸钠) 等购自上海生工生物工程公司.

收稿日期: 2000-09-11; 修订日期: 2001-03-02.

基金项目: 国家海洋“863”计划资助项目(819-03-03); 浙江省自然科学基金资助项目(398233).

作者简介: 王 勇(1973-), 男, 吉林省吉林市人, 硕士, 从事藻类生物技术研究.

### 2.3 DNA 提取纯化方法

将丝状体用蒸馏水浸泡 30 min, 冲洗两次后用绢布挤干, 再用滤纸吸去剩余水分, 称取 0.1 g 丝状体, 用剪刀尽量剪碎, 置于 1.5 cm<sup>3</sup> eppendorf 管内, 加 1 cm<sup>3</sup> DNA 提取液 (0.8 mol/dm<sup>3</sup> LiCl, 0.6% Sarcosyl, 10 mmol/dm<sup>3</sup> EDTA, 0.2% PVPP, 5%  $\beta$ -巯基乙醇) 混匀. 55 ℃ 水浴温育 10 min 后, 于 4 ℃ 放置 1 h, 定时地轻轻混匀. 于 4 ℃, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液. 用酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和氯仿/异戊醇(24:1)各抽提 1 次. 上清液加蛋白酶 K 至终浓度为 100  $\mu$ g/cm<sup>3</sup>, 于 37 ℃ 处理 1 h. 用 5 mol/dm<sup>3</sup> NaCl 调节 DNA 溶液的 NaCl 终浓度至 0.7 mol/cm<sup>3</sup>, 加入 0.1 体积 65 ℃ 预热的 CTAB/NaCl 溶液(10% CTAB + 0.7 mol/cm<sup>3</sup> NaCl) 混匀后, 于 65 ℃ 温育 10 min. 加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)抽提, 上清液经 RNaseA(50  $\mu$ g/ml) 37 ℃ 处理 1 h, 再经酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和氯仿/异戊醇(24:1)各抽提 1 次. 上清液加入 0.1 体积 3 mol/dm<sup>3</sup> NaAc(pH 值 5.4)和 2 倍体积 -20 ℃ 预冷的 100% 乙醇, 4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min, 用 70% 的乙醇洗涤沉淀, 沉淀物通过冷冻干燥后, 溶于 20 mm<sup>3</sup> TE 缓冲液, 4 ℃ 保存.

### 2.4 DNA 纯度和浓度的测定

取 1 mm<sup>3</sup> 总 DNA 溶液, 在 0.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 用数码相机拍照, 图片输入计算机, 通过 Kodak-1D 软件分析, 测算 DNA 的分子量和相对含量. 在 Beckman DU 640 型紫外分光光度计上测 DNA 的纯度并估测 DNA 的浓度.

### 2.5 RAPD-PCR 扩增反应

反应总体积为 25 mm<sup>3</sup>, 含模板 DNA 10 ng, Tag 酶 1 U, Mg<sup>2+</sup> 2.5 mmol, dNTP 0.2 mmol, 1 $\times$  PCR 反应缓冲液, 随机引物 30 ng. 94 ℃ 预变性 5 min, 然后进入循环: 94 ℃ 10 s, 38 ℃ 60 s, 72 ℃ 120 s, 一共 45 个循环, 最后 72 ℃ 延长 10 min. 反应产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳检测.

## 3 结果和讨论

电泳显示提取的 DNA 呈一条清晰的约 23 kb 的 DNA 条带. 说明在提取过程中, 没有降解, DNA 带型完整, 其长度足够用于 PCR 扩增.

该法提取的基因组 DNA 的纯度 OD 260/280 达到 1.8, 随机引物 OPC-2 的 RAPD 扩增条带清晰, 条带之间无弥散. 这表明提取的 DNA 的大小和纯度均适合于在 PCR 等实验中作模板. 本提取方法的 DNA 得率约为 20  $\mu$ g/g 新鲜丝状体.

多糖是紫菜 DNA 提取的主要干扰物质, 采用传统方法需要将紫菜在液氮中研磨, 这样不仅会释放出 DNA, 可溶性酸性多糖也释放出来, 引起操作不便, 并且 DNA 得率低. 细胞法被认为是紫菜叶状体 DNA 提取的有效方法, 它通过海藻酶处理除去大部分细胞壁(含大量多糖), 排除了多糖对提取步骤的干扰, 但将其用于紫菜丝状体时, 由于无法完全降解细胞壁, 且细胞形状为长条型, 无法获得丝状体细胞的原生质体.

LiCl 法提取紫菜 DNA 最早由 Hong<sup>[5]</sup> 于 1992 年提出, 其原理是用 LiCl 软化紫菜组织, DNA 从松散的细胞壁和细胞膜之间释放出来, 避免液氮研磨造成的酸性多糖的释放, 减少了 DNA 纯化的困难. 但此法提取的 DNA 纯度不高, 效果也不稳定, 获得的基因组 DNA 仍需要琼脂糖电泳分离纯化<sup>[6]</sup>. 本实验中, 丝状体经 LiCl 提取液处理后, 加入 CTAB/NaCl 溶液

(10% CTAB + 0.7 mol/dm<sup>3</sup> NaCl) 去除提取液中的多糖成分<sup>[7]</sup>, 直接进入 DNA 纯化步骤, 从而使 DNA 的提取和纯化步骤结合起来, 提高紫菜丝状体 DNA 的提取效率. DNA 提取液中 PVPP 的作用为除去色素和结合多糖.

藻类的酸性多糖可抑制 PCR 扩增反应. 笔者在紫菜 RAPD-PCR 扩增实验中, 发现使用较低浓度的 DNA 模板, 可以提高结果的可靠性. 用 1 ng DNA 时结果较好, 用 100 ng 以上 DNA 做扩增模板时, 却没有任何结果, 原因可能是 DNA 提取时残留的酸性多糖抑制了扩增反应, 类似的结果在 *Hizikia fusiformis* 的 RAPD-PCR 扩增实验中也发现过, 该实验只使用了 0.35 ng 的 DNA 模板<sup>[8]</sup>.

本实验得到中国科学院发育研究所金振华研究员的悉心指导, 特此致谢.

### 参考文献:

- [1] SHIVJI M S, ROGERS S O, STANHOPE M J. Rapid isolation of high molecular weight DNA from marine macroalgae[J]. Mar Ecol Prog Ser, 1992, 84: 197~203.
- [2] SONG Lin-sheng, DUAN De-lin, LI Xiao-hong, et al. Use of RAPD for detecting and identifying *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 1998, 16(3): 237~242.
- [3] 贾建航, 王 萍, 金德敏, 等. RAPD 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.
- [4] 王 勇, 刘必谦, 骆其君, 等. RAPD 在坛紫菜遗传差异分析中的应用[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(2)II: 225~229.
- [5] HONG Yong-ki, COURRY Daniel A, MIRIAM Polne-Fuller, et al. Lithium chloride extraction of DNA from the seaweed *Porphyra perforata* (Rhodophyta)[J]. Journal of Phycology, 1992, 28: 717~720.
- [6] HONG Yong-ki, SOHN Chul Hyun, LEE Ki Wan, et al. Nucleic acid extraction from seaweed tissue for polymerase chain reaction[J]. Journal of Marine Biotechnology, 1997, 5: 95~99.
- [7] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯伯 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 39~40.
- [8] JI Won Park, YONG Chul Cho, Bo-Hye Nam, et al. RAPD identification of genetic variation in seaweed *Hizikia fusiformis* (Fucales, Phaeophyta)[J]. Journal of Marine Biotechnology, 1998, 6: 62~64.

## DNA extraction from *Porphyra conchocelis*

WANG Yong<sup>1</sup>, PEI Lu-qing<sup>1</sup>, LUO Qi-jun<sup>1</sup>, LIU Bi-qian<sup>1</sup>, FEI Zhi-qing<sup>1</sup>, XUE Qing-zhong<sup>2</sup>

(1. Marine Biotechnology Key Laboratory of Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Key words:** *Porphyra*; *conchocelis*; LiCl; total DNA; RAPD-PCR