

牦牛乳中 DNA 提取方法的建立与优化

崔艳华¹, 马 莺¹, 曲晓军², 李海梅¹, 何胜华¹

(1. 哈尔滨工业大学 食品科学与工程学院, 150090 哈尔滨, maying@hit.edu.cn;

2. 黑龙江省科学院微生物研究所, 150010 哈尔滨)

摘 要: 为加速牦牛重要基因的挖掘和功能鉴定, 以牦牛乳作为试验材料, 建立简便的牦牛基因组 DNA 提取方法. 采用常规离心法, 从牦牛乳中获得体细胞, 进而提取基因组 DNA. 研究不同去除蛋白方法、不同 DNA 沉淀剂、不同贮藏条件对牦牛乳中 DNA 提取质量的影响. DNA 质量通过 PCR 评价. 结果表明: 高盐法与酚/氯仿法去除蛋白效果相当. 高盐法简便快速, 且避免了酚、氯仿等有机试剂对人们健康的影响. 异丙醇和无水乙醇的沉淀 DNA 效果相近, 而乙二醇丁醚效果最差. 牦牛乳贮藏条件对 DNA 质量影响很大, 4 ℃ 下短时间保存或在 -20 ℃ 下长期保存, 均可获得理想的 DNA. 采用高盐法从牦牛乳中提取 DNA 可用于 PCR 特异性扩增等后续研究工作.

关键词: 牦牛乳; 体细胞; 基因组 DNA; 提取

中图分类号: Q52

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2011)02-0066-04

Establishment and optimization of the DNA extraction from yak milk

CUI Yan-hua¹, MA Ying¹, QU Xiao-jun², LI Hai-mei¹, HE Sheng-hua¹

(1. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China, maying@hit.edu.cn;

2. Institute of Microbiology, Heilongjiang Science Academy, 150010 Harbin, China)

Abstract: A reliable and rapid method for genomic DNA extraction was constructed here to accelerate the identification of important genes in yak. In this method, the yak milk was first centrifuged, and then somatic cells were obtained for DNA extraction. The influences of different methods of protein removal, DNA precipitants, and storage conditions of yak milk on DNA quality were discussed. The quality of DNA was detected using PCR. Experimental results indicated that both the salting-out and phenol-chloroform method were effective for the removal of proteins, however the salting-out method was more simple and rapid. The precipitants isopropyl alcohol and ethanol were similar to precipitate DNA, but the glycol ether was the worst precipitant in this study. The storage conditions of yak milk have remarkable influence on the quality of DNA, and when the yak milk was stored at 4 ℃ for short term, or -20 ℃ for long term, the desired DNA can be got. The DNA extracted from yak milk using the salting-out method can be used in the later genetic research.

Key words: yak milk; somatic cell; genome DNA; extraction

近年分子生物学技术已成为家畜育种及畜产品应用研究的有利工具. 分离提取高质量的基因组 DNA 是家畜群体遗传变异、分子标记辅助选择育种、食品可溯性和基因工程等研究的基础. 当前通常以动物组织和血液为材料, 获得其基因组

DNA^[1-6]. 收集上述样品技术操作上存在困难, 而且均会对哺乳动物产生应激反应, 影响产乳量^[7]. 牦牛是在高寒、缺氧等严峻自然条件下, 经过长期自然选择和自身适应而形成的特殊牛种, 主要分布在我国青海、四川、甘肃、新疆、云南等地的高原山区. 牧民将牦牛视为神物, 采取其组织或血液为实验材料, 阻力很大, 因此, 寻找更为适宜的材料势在必行.

本研究采用常规离心方法从牦牛乳中分离体

收稿日期: 2009-07-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30871953;31074571).

作者简介: 崔艳华(1978—), 女, 博士, 副教授;

马 莺(1961—), 女, 教授, 博士生导师.

细胞,选用高盐法从体细胞中分离提取基因组DNA,并利用PCR检测对其进行评价.研究表明,该方法提取的基因组DNA可以用于PCR等后续研究.

1 试验

1.1 牦牛乳

牦牛乳取自四川麦洼牦牛.取样后,牦牛乳中加入叠氮化钠(NaN_3 , 0.4 g/L)防止蛋白沉淀,存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

1.2 试剂

蔗糖、Tris碱、盐酸、氯化镁、Triton-X-100、氯化钠、乙二醇四乙酸二钠盐、异丙醇、无水乙醇、乙二醇丁醚等均为分析纯,购自北京试剂公司.蛋白酶K、Taq酶及PCR相关试剂购自TAKARA公司.引物由上海生工合成.

1.3 主要仪器

高速冷冻离心机(Biofuge Stratos, Heraeus)、紫外可见分光光度计(TU-1800,北京普析通用仪器有限责任公司)、电泳仪(BioRad)、凝胶成像系统(BioRad)、PCR仪(TAKARA公司).

1.4 引物

根据牛 κ -酪蛋白的第4外显子区域设计引物 κ -CN F(5'-AGA AAT AAT ACC ATTCTG-CAT-3')和 κ -CN R(5'-GTTGAATTCTTTGAT-GTCTCCTTAGAGT-3'),预期产物片段大小为550 bp^[8].

1.5 牦牛乳中体细胞的提取

采用常规离心法提取牦牛乳中体细胞.收集50 mL牦牛乳,于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 3 000 r/min离心15 min.离心后,牦牛乳分为3部分,上层为脂肪层,中间为脱脂乳,沉淀为体细胞.弃去脂肪和脱脂乳,用70%乙醇脱脂棉球心擦拭附在管壁上的乳脂.将沉淀重悬于5 mL PBS缓冲液(pH 7.4)中,在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下3 000 r/min离心10 min;去上清,将沉淀重悬于少量PBS缓冲液中备用^[9].

1.6 体细胞中DNA的提取

参见文献[10]方法,并在此基础上进行了修改.

1.6.1 体细胞的裂解

首先将体细胞重悬于49 mL Lysis buffer(0.32 mol/L蔗糖,10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5,5 mmol/L MgCl_2 , 1% Triton-X-100); $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下3 000 r/min离心10 min;将沉淀重悬于10 mL Wash buffer(0.075 mol/L NaCl, 0.025 mol/L EDTA)中,洗涤2次;离心收集沉淀,将其重悬于

3 mL TE 溶液中(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 2 mmol/L EDTA),加入100 μL 10% SDS和40 μL 蛋白酶K(10 g/L),混匀,放于 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中1 h.

1.6.2 蛋白的去除

采用高盐法或酚/氯仿法去除蛋白.高盐法即温浴后,加入500 μL 5 mol/L NaCl,混匀,离心3 000 r/min 10 min去除沉淀蛋白.

酚/氯仿法则是在温浴后,冷却至室温,加入RNase,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下作用20~30 min,去除RNA.加入与溶液等体积酚/氯仿(1:1),混匀后,12 000 r/min离心10 min;取上清,加入等体积的氯仿,再次抽提.

1.6.3 核酸沉淀

收集水相,加入2倍体积预冷的无水乙醇,混匀, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下静置30 min;也可加入等体积的异丙醇或乙二醇丁醚,混匀,室温静置10~30 min.12 000 r/min离心10 min;弃上清,沉淀于70%乙醇洗2次;沉淀于室温干燥,重悬于100 μL 双蒸水.

1.7 DNA质量检测

1.7.1 琼脂糖电泳分析

DNA的完整性用1%非变性琼脂糖凝胶电泳,然后用凝胶成像系统观察.

1.7.2 DNA纯度鉴定

取提取的基因组DNA,用双蒸水稀释100倍,紫外分光光度计测量其在260和280 nm处的紫外吸光值.每个样品重复3次,取平均值.以 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值进行纯度分析.

1.8 PCR

以提取的牦牛乳基因组DNA为模板,以 κ -CN F和 κ -CN R为引物扩增 κ -酪蛋白的第4外显子区域.PCR反应程序为 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 4 min预变性,然后以 $94\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s、 $53\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s、 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s为一个循环,共进行30个循环,之后 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸10 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存.PCR反应体系为:10 $\times$ PCR buffer 5 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL , Taq酶2 U, DNA 10~50 ng,用双蒸水补足体积至50 μL .

2 结果与分析

2.1 牦牛乳中提取基因组DNA方法研究

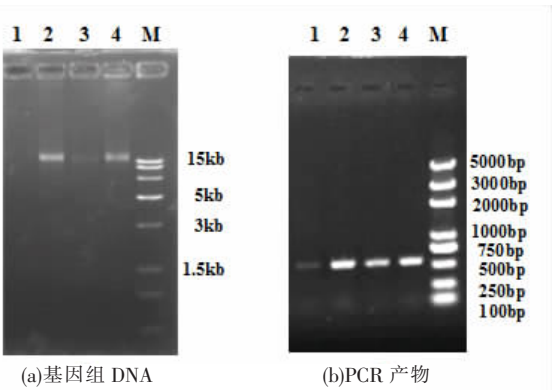
2.1.1 高盐法和酚/氯仿法的比较

去除蛋白的方法主要有酚/氯仿法和高盐法,其中酚/氯仿法较为常用.但是酚和氯仿等均为有机溶剂,尤其是氯仿具有刺激的挥发性气味,对人体有害.本研究采用SDS和蛋白酶K对体细胞进

行破膜处理后获得细胞裂解液,将其均分为 2 份,分别采用高盐法和酚/氯仿法去除其中的蛋白质.两种处理均获得了基因组 DNA,但是酚/氯仿方法因多次抽提,DNA 损失较大,仅为高盐法的 30% 左右(见图 1(a)).

利用紫外分光光度计测量 OD_{260} 和 OD_{280} 值,计算 OD_{260}/OD_{280} 值发现,酚/氯仿法和高盐法提取的 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值均接近 1.8,表明蛋白去除较为彻底.将两种方法获得的基因组 DNA 分别作为模板,扩增 κ -酪蛋白的 IV 外显子区域,均可获得特异性 PCR 产物(见图 1(b)).

天然状态的 DNA、RNA 是以脱氧核糖核蛋白(DNP)和核糖核蛋白(RNP)形式存在.DNP、RNP 在盐溶液中的溶解度受盐浓度的影响而不同.DNP 在低浓度盐溶液中几乎不溶解,随着盐浓度的增加溶解度也增加;RNP 在盐溶液中的溶解度受盐浓度的影响较小,因此,采用高盐法去除蛋白的同时也去除了 RNP,即去除了 RNA.高盐法与酚/氯仿法相比操作简便快速,且省去了酚/氯仿抽提.



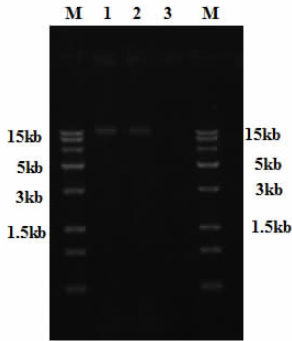
M: Maker; 1 和 2 为牦牛乳样品 H1; 3 和 4 为牦牛乳样品 H2; 1, 3 采用酚/氯仿法; 2, 4 采用高盐法.

图 1 不同去除蛋白方法对牦牛乳中 DNA 提取的影响

2.1.2 DNA 沉淀试剂及沉淀时间的确定

提取核酸类物质 DNA 和 RNA 过程中,主要采用醇沉淀核酸,如无水乙醇和异丙醇.无水乙醇是首选的沉淀剂,对盐类沉淀少,可最大限度地降低盐浓度对后续实验的影响,并且容易挥发除去.但是需要量较大(通常为样品体积的 2~3 倍),且需要在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下放置较长时间(30~60 min).异丙醇沉淀核酸时,需要量小(通常 0.6~1.0 倍体积)且速度快,并能够在室温条件下进行,时间短,因此,适用于浓度低、体积大样品的沉淀.但缺点是异丙醇难以挥发除去,需要用 70% 的乙醇漂洗 DNA 沉淀数次.近年来,采用乙二醇丁醚提取核酸时,取得了较好的沉淀效果^[11-12].本研究对

无水乙醇、异丙醇和乙二醇丁醚的沉淀效果进行了比较,由图 2 可以看出,异丙醇和无水乙醇的沉淀效果相近,而乙二醇丁醚效果最差,几乎无 DNA.



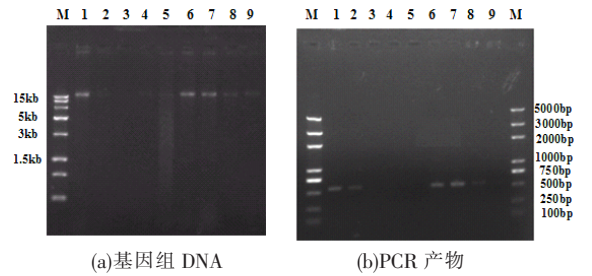
M. Maker; 1. 异丙醇, 室温 30 min; 2. 无水乙醇, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min; 3. 乙二醇丁醚 室温 30 min.

图 2 不同沉淀试剂对牦牛乳 DNA 提取的影响

2.2 牦牛乳不同贮藏条件下对基因组 DNA 提取的影响

通常取样时需要备有专用设备对样品现场冷冻,以保证样品低温保藏.将同一牦牛乳样品保存在不同贮藏条件下,研究了贮藏条件对 DNA 提取质量的影响.

由图 3 可以看出,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存 3 d 以及在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 1~3 d 的样品,提取的 DNA 较好;以上述样品提取的 DNA 为模板,PCR 扩增 κ -酪蛋白的 IV 外显子区域,均获得了约 550 bp 的目标条带.在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存 15~30 d 的样品可提取 DNA,但浓度有所降低,可用于 PCR 检测.在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存 3 d 的样品提取的 DNA 含量很低,条带非常微弱,通过加大 DNA 模板的体积可以用于 PCR 扩增.



1. $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 d; 2. $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 6 d; 3. $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 14 d; 4. $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 d; 5. $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 6 d; 6. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 d; 7. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 d; 8. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 d; 9. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 d.

图 3 不同贮藏条件对牦牛乳中 DNA 分离提取的影响

在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存 15 d 的样品则几乎没有分离得到 DNA.在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存的样品仅仅有微弱的条带.PCR 扩增未得到目标条带.表明上述条件保存的样品不适宜于 DNA 的提取.

同时以保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下达半年的牦牛乳样品为材料,提取了牦牛乳体细胞的DNA,发现可以获得DNA,并可用于PCR扩增。

3 结 论

1)以牦牛乳为材料,建立以牦牛乳中体细胞提取牦牛基因组DNA的方法.并通过不同去除蛋白方法和DNA沉淀方法的比较,对该方法进行了优化.此方法取材容易,操作简便,避免了有机试剂抽提,且使用试剂价格低廉,适用于后续的PCR特异性扩增等操作。

2)通过不同贮藏条件对牦牛乳中DNA提取的影响研究发现,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下短时间保存或在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下长期保存,均可获得理想的DNA,应尽早处理材料,以期获得最佳的DNA。

3)本研究所建立的以牦牛乳为材料提取DNA的方法,避免了以牦牛组织或血液为实验材料的取样困难,为从分子水平上研究牦牛及牦牛乳提供了更为便捷有效的方法。

参考文献:

- [1] PRINZENBERG E M, WEIMANN C, BRANDT H, *et al.* Polymorphism of the bovine CSN1S1 promoter: linkage mapping, intragenic haplotypes, and effects on milk production traits [J]. J Dairy Sci, 2003, 86: 2696 – 2705.
- [2] IBEAGHA – AWEMU E M, PRINZENBERG E M, JANN O C, *et al.* Molecular characterization of bovine CSN1S2 * B and extensive distribution of zebu – specific milk protein alleles in european cattle [J]. J Dairy Sci, 2007, 90:3522 – 3529.
- [3] PRINZENBERG E M, JIANLIN H, ERHARDT G. Genetic variation in the κ – Casein Gene (CSN3) of Chinese Yak (*Bos grunniens*) and phylogenetic analysis of CSN3 sequences in the genus *Bos* [J]. J Dairy Sci, 2008, 91:1198 – 1203.
- [4] BAI W L, YIN R H, ZHAO S J, *et al.* Characterization of a κ – Casein genetic variant in the Chinese yak, *Bos grunniens* [J]. J Dairy Sci, 2008, 91:1204 – 1208.
- [5] CHEN S Y, COSTA V, AZEVEDO M, *et al.* New alleles of the bovine κ – Casein gene revealed by resequencing and haplotype inference analysis [J]. J Dairy Sci, 2008, 91:3682 – 3686.
- [6] KUSZA S, VERESS G, KUKOVICS S, *et al.* Genetic polymorphism of α s1 – and α s2 – caseins in Hungarian milking goats [J]. Small Ruminant Res, 2007, 68: 329 – 332.
- [7] BOUTINAUD M, JAMMES H. Potential of milk epithelial cells: a review [J]. Reprod Nutr Dev, 2002, 42 (2):133 – 147.
- [8] PRINZENBERG E M, KRAUSE I, ERHARDT G. SS-CP analysis at the bovine CSN3 locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C, E, F, G) and three new DNA polymorphisms (H, I, A1) [J]. Anim Biotechnol, 1999, 10:49 – 62.
- [9] BOUTINAUD M, RULQUIN H, KEISLER D H, *et al.* Use of somatic cells from goat milk for dynamic studies of gene expression in the mammary gland [J]. J Anita Sci, 2002, 80(5):1258 – 1269.
- [10] D'ANGELO F, SANTILLO A, SEVI A, *et al.* A simple salting – out method for DNA extraction from milk somatic cells: investigation into the goat CSN1S1 Gene [J]. J Dairy Sci, 2007, 90:3550 – 3552.
- [11] 淳俊, 郑彦峰, 王胜华, 等. 一种广泛适用的RNA提取方法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(5):591 – 597.
- [12] SUNKAR R, GIRKE T, JAIN P K, *et al.* Cloning and characterization of microRNAs from rice [J]. Plant Cell, 2005, 17(5):1397 – 1411.

(编辑 刘 彤)