

文章编号: 1004 - 7271(2008)05 - 0530 - 05

## 高效海藻 DNA 提取方法研究

韩 静<sup>1,2</sup>, 余舜武<sup>2</sup>, 罗利军<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 200090;

2. 上海市农业生物基因中心作物遗传改良国家重点实验室种质资源分室, 上海 201106)

**摘要:**简单、高效的抽提 DNA 是进行分子生物学研究的基础。选取三种不同海藻纲中的条斑紫菜、条浒苔、钝顶螺旋藻为材料,通过采用改良的 CTAB 法、LiCl 法及试剂盒法抽提基因组 DNA 并进行比较,以找出适用于各种藻类 DNA 提取的快速有效方法。结果表明适当提高裂解液与样品比能有效降低材料中多糖与蛋白质、酚类等杂质,提高 DNA 纯度和得率。经过修改后,三种方法都能有效抽提 DNA,其中试剂盒法省时,所得到的 DNA 纯度最高,但得率较低且成本高。CTAB 法与 LiCl 法也均能得到高质量的 DNA,但 LiCl 法相对而言更简捷有效。此外,抽提前材料预处理对 DNA 质量有明显影响。

**关键词:**海藻; DNA 提取; LiCl 法

**中图分类号:**S 917      **文献标识码:** A

## Studies on efficient methods of algae DNA isolation

HAN Jing<sup>1,2</sup>, YU Shun-wu<sup>2</sup>, LUO Li-jun<sup>1,2</sup>

(1. College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China;

2. Shanghai Agrobiological Gene Center, Germplasm Resources Division, National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Shanghai 201106, China)

**Abstract:** Simple and high efficiency methods for DNA preparation were the base for the algae molecular genetic research. To look for rapid and efficient methods to isolate DNA, three algae (*Porphyra yezoensis*, *Enteromorpha clathrata* and *Spirulina platensis*) were as materials to extract DNA by three preparation methods, improved CTAB method, LiCl method and extraction kit. These results indicated that the more extraction buffer was valid to remove impurities such as proteins and polysaccharides, and increased the yield and purity of DNA. Three methods have been improved and are all potent for genomic DNA extraction. Using the isolation kit was the most rapid method and the DNA purity was high, but expensive with low DNA yield. The improved CTAB method and the LiCl method were inexpensive and efficient methods for total genomic DNA isolation from 3 algal species, but the latter was more rapid and simple. Furthermore, the pretreatment of material also affected the quality of DNA.

**Key words:** algae; DNA isolation; LiCl method

DNA 是分子生物学研究的基本材料,高效的抽提制备方法是开展基因工程研究的基础。众所周

收稿日期:2007-11-02

基金项目:上海市青年科技启明星计划(06QA1404)

作者简介:韩 静(1984-),女,硕士研究生,专业方向为水产养殖。E-mail: hj06@sagc.org.cn

通讯作者:罗利军, E-mail: llj@sagc.org.cn

知,藻类的形态各异,不同的藻类具有极强的特异性。单一机械的 DNA 提取方法不足以满足需要,另外藻体中大量的多糖、蛋白质、多酚等物质将 DNA 包埋而难以去除,这也给抽提 DNA 带来了一定难度。我们选取条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*)、条浒苔 (*Enteromorpha clathrata*)、钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 三种分属不同门类的海藻,参考韩峰等<sup>[1]</sup>提出的海藻核酸提取的难点及对策,分别采用改良的 CTAB 法、LiCl 法和普通的基因组 DNA 提取试剂盒对这三种海藻进行 DNA 抽提。并对得到的 DNA 进行 PCR 扩增,以探索简单、快速、低成本的高效抽提各种藻类 DNA 的抽提方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

螺旋藻加入 Zarrouk 培养基<sup>[2]</sup>,28-30 °C,3 000 Lux<sup>[3]</sup>光照培养箱中生长至 OD<sub>560</sub> = 0.8,用筛绢过滤收集,蒸馏水清洗 2~3 次,挤去水备用。条斑紫菜丝状体在天然海水加 MES 培养基<sup>[2]</sup>中 20 °C 左右通气培养,随时取用。条斑紫菜、条浒苔、钝顶螺旋藻藻种均由上海水产大学生命与科学技术学院藻种保存中心提供。

### 1.2 总 DNA 的提取

#### 1.2.1 试剂盒法

采用 V-gene(爱思进生物技术有限公司 杭州)的 DNA 小量提取试剂盒,具体的操作参照试剂盒说明书。

#### 1.2.2 CTAB 法

参考常规方法,并根据李晋楠等<sup>[4]</sup>的方法进行修改:200 mg 材料,液氮研磨后加入 1 mL 预热 CTAB 提取液(100 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L EDTA,1.4 mol/L NaCl,2% CTAB),使用前加入 2% β-巯基乙醇,65 °C 水浴 1 h,其间每隔 5 min 振荡混匀。加入等体积的苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)混合振荡 20 min,10 000 rpm 离心 10 min,取上清,加入 0.35 倍体积的无水乙醇和 0.2 体积的 5 mol/L 的 KAc 混匀,离心后取上清加入半体积异丙醇,-20 °C 冷冻 30 min,10 000 rpm 离心 10 min,吹干后加入 400 μLmol/L NaCl 和 1.5 μL RNase,37 °C 水浴 30 min 消解 RNA。将 5 个离心管中的溶液收集合并,加入预冷的无水乙醇沉淀,-20 °C 静置超过 10 min 后离心,沉淀用 70% 酒精洗涤,晾干后溶于 200 μL TE 中。

#### 1.2.3 LiCl 法

参照 Hong 等<sup>[5]</sup>的方法,200 mg 材料,液氮研磨后加入 1 mL 预热 LiCl 提取液(0.8 mol/L LiCl,0.6% SDS,10 mmol/L EDTA),处理方法改为 55 °C 水浴 15 min,其它纯化处理与 CTAB 法相同。

螺旋藻属于单细胞藻类,不需液氮破碎组织,操作流程稍作修改,未经液氮研磨,直接加入抽提溶液进行研磨,其他方法同上面所述。

### 1.3 检测方法

#### 1.3.1 总 DNA 质量鉴定

取 5 μL DNA 原液经含溴化乙锭(EB)的 1% 琼脂糖凝胶电泳,以 Hind III 酶切的 λDNA 作为分子量标记,检测其分子量的大小。电泳缓冲液为 1 × TAE(40 mmol/L Tris-Ac. 1 mmol/L EDTA),Tanon 凝胶自动成像系统拍照。采用 DU640(BECKMAN)紫外分光光度计检测 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值,得到三种方法的 DNA 的纯度并检测浓度,以计算得率。

#### 1.3.2 PCR 扩增检测

采用两对 RAPD 引物进行 PCR 扩增,25 μL 体系,将 DNA 原液稀释 50 倍,取 1 μL 作为模板,PCR 反应条件为 94 °C 3 min 后,94 °C 30 s,36 °C 30 s,72 °C 30 s,35 个循环。72 °C 延伸 5 min。产物取 10 μL 在 1% 琼脂糖凝胶电泳后检测。

## 2 结果和分析

### 2.1 DNA 产物的浓度、纯度和得率

三种方法提取的 DNA 紫外分光检测的结果见表 1, 由于材料的含水量及核酸含量有区别, 因此得率有一定误差。为了尽可能准确, 分别对这些材料通过过滤和离心进行脱水。通过测定结果可以看出, 三种方法中试剂盒法得到的 DNA 纯度最高, 但得率较低, LiCl 法与 CTAB 法纯度相差不大, 但 LiCl 法的得率较高。从三种藻类提取结果来看, 用 LiCl 法提取的 DNA 得率在 50  $\mu\text{g/g}$  到 75  $\mu\text{g/g}$  之间, 高于 CTAB 法的 30  $\mu\text{g/g}$  到 43  $\mu\text{g/g}$  的得率, 在抽提效率上要高于 CTAB 法。

表 1 三种 DNA 提取方法的结果比较

Tab.1 The results of three DNA extraction methods

	条斑紫菜 <i>P. yezoensis</i>			条浒苔 <i>E. clathrata</i>			螺旋藻 <i>S. platensis</i>		
	纯度 ( $\text{OD}_{260}/$ $\text{OD}_{280}$ )	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	得率 ( $\mu\text{g/g}$ )	纯度 ( $\text{OD}_{260}/$ $\text{OD}_{280}$ )	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	得率 ( $\mu\text{g/g}$ )	纯度 ( $\text{OD}_{260}/$ $\text{OD}_{280}$ )	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	得率 ( $\mu\text{g/g}$ )
Kit 法	1.84	89	17.8	1.88	67	14.4	1.8	101	21.2
CTAB 法	1.39	203	40.6	1.79	149	29.8	1.63	213	42.6
LiCl 法	1.33	248	49.6	1.68	282	56.4	1.75	375	75.0

### 2.2 基因组 DNA 的电泳结果

从总 DNA 电泳结果来看, 试剂盒所得到的 DNA 条带亮度较弱, 但点样孔无残留, 条带整齐, 无拖尾。说明含量较少但纯度较高。LiCl 法所得 DNA 电泳条带比 CTAB 法所得条带亮, 说明 DNA 浓度高。这与紫外分光光度计测定的结果吻合。

### 2.3 PCR 扩增结果

本实验采用 RAPD 引物来了解基因组 DNA 是否适合进行 PCR。随机采用两个 RAPD 引物, 退火温度经优化, 在 39  $^{\circ}\text{C}$  的退火温度下进行 PCR 扩增 (具体见材料与与方法), 其电泳结果见图 2, 结果表明除少数样品外均能有效进行扩增, 且条带清晰。

## 3 讨论

本文所选三种海藻分属于红藻门、绿藻门和蓝藻门三个不同门类, 并在其中具有一定的代表性。前人曾对其中某些门类的 DNA 抽提进行过研究: 郭宝大等<sup>[6]</sup>用 SDS-蛋白酶 K 裂解细胞提取条斑紫菜总 DNA, Hu 等<sup>[7]</sup>采用 SDS 裂解法提取条斑紫菜等十五种红藻的 DNA。茅云翔等<sup>[8]</sup>使用了改进的 CTAB 法及琼脂糖包埋法制备了大分子量的螺旋藻 DNA。藻体的形态和不同的特性对 DNA 的抽提效果有较大影响。成熟的条斑紫菜叶状体组织中的

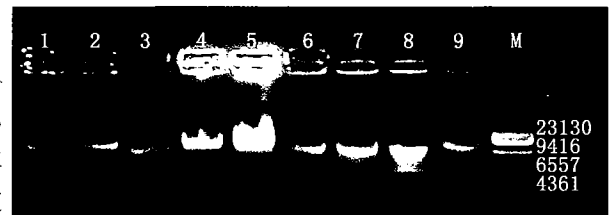


图 1 三种藻类不同方法提取物的电泳结果

Fig.1 The electrophoresis map of extractions using different methods from three algae

1~3. 条斑紫菜; 4~6. 条浒苔; 7~9. 钝顶螺旋藻; 1, 4, 7. CTAB 法; 2, 5, 8. LiCl 法; 3, 6, 9. 试剂盒法; M.  $\lambda$  DNA 经 HindIII 酶切后产生的 DNA 标记。



图 2 三种方法提取海藻基因组 DNA 的 PCR 扩增电泳图

Fig.2 The PCR profile with three algae genome DNAs by three methods

1~9 采用 OPAA1 引物, 10~18 采用 OPAA 2 引物。1~3 和 10~13. 条斑紫菜; 4~6 和 13~15. 条浒苔; 7~9 和 16~18. 钝顶螺旋藻。1, 4, 7, 10, 13, 16. CTAB 法; 2, 5, 8, 11, 14, 17. LiCl 法; 3, 6, 9, 12, 15, 18. 试剂盒法。

DNA 含量不高<sup>[9]</sup>,且细胞壁较厚,多糖多酚等杂质成分含量很高,因此我们选择了紫菜丝状体作为材料,王勇等<sup>[10]</sup>也证明丝状体紫菜 DNA 提取效果要好于叶状体。条浒苔为中空管状结构,因此藻体含水量大,冷冻研磨易结块,且多糖和蛋白含量偏高,给提取带来了一定难度。钝顶螺旋藻属于蓝藻门,是一种原核丝状微藻,外被胶质鞘,可耐受高浓度溶菌酶、冻融裂解、煮沸裂解等处理;同时有非常高的核酸酶活性,易使 DNA 降解<sup>[11]</sup>。另外,由于螺旋藻在碱性高盐环境下生长,在需要用纯水多次洗涤藻体以消除残余培养液的影响。除了根据材料的自身特征改变抽提方法外,在提取过程中共同的难题是多糖的去除。前人为分离抽提产物中的多糖污染,利用琼脂糖电泳,切下 DNA 部分再将胶回收<sup>[12]</sup>,但这也使 DNA 更易降解。藻中多糖的主要成分是硫基多糖和羧基多糖等,它们的密度与核酸相似,很容易与 DNA 共沉淀,黏性很高,这些多糖污染还会抑制连接酶、DNA 聚合酶等酶的活性<sup>[13]</sup>。在其他植物的 DNA 提取中,CTAB 及 LiCl 裂解液被证明能有效去除多糖,并在此基础上发展了简易的 DNA 提取方法<sup>[14]</sup>。与植物 DNA 提取方法相比,在本实验中,发现藻类需要更高的裂解液与材料体积重量比才能充分去除多糖等污染(数据未列出)。

目前一些传统生物技术已广泛应用于藻类研究,但应用分子生物学技术有目的地深入研究则是近些年才得以开展<sup>[15]</sup>。基因组 DNA 的提取技术是分子生物学研究中的基本技术,DNA 样品的质量对于实验的成败至关重要。传统的 CTAB 法虽然在植物中发展的较为成熟,但在海藻 DNA 提取的过程中但还有很多问题存在,罗立明等<sup>[16]</sup>指出,藻类富含蛋白多糖等物质,这些杂质降低了 DNA 的质量,导致实验需要反复多次抽提,降低了提取效率。裂解与破碎细胞壁,使 DNA 透出是抽提中必需解决的问题<sup>[17]</sup>。在已报道的藻类提取方法中,很多都采用海螺酶、蛋白酶 K 等进行消化,以解决液氮破碎细胞后裂解物黏稠、DNA 得率低且有严重的多糖污染等难题<sup>[18]</sup>,但这无疑使实验过程更加复杂耗时,成本相应增加。因此本实验中为了提高 DNA 抽提效率,分别采用改进的植物 CTAB 法和 LiCl 法,发现能明显改善 DNA 的抽提流程和质量。为了进一步提高得率,在 CTAB 及 LiCl 法后续的纯化中采用了醋酸钾和低浓度乙醇结合去除多糖杂质的方法。三种方法都可在材料较少的情况下进行抽提,所得 DNA 的抽提效率有一定的差别。除试剂盒外,两种方法纯度的差别并不十分明显。LiCl 法提取的 DNA 得率在 50  $\mu\text{g/g}$ 到 75  $\mu\text{g/g}$ 之间,高于 CTAB 法的 29  $\mu\text{g/g}$ 到 43  $\mu\text{g/g}$ 鲜重的得率。从 DNA 电泳的结果来看,发现 CTAB 及 LiCl 法虽都得到了完整的基因组 DNA,可同试剂盒方法相比仍有杂质存在,点样孔明显的荧光存在,两种方法得到的 DNA 纯度相差不大。但总体而言 LiCl 法相对较好,成本低廉,得率较其他方法有明显的优势,且抽提所需时间比 CTAB 法短。缩短抽提时间也有利于保持基因组 DNA 的完整性,提高了实验的效率。

从 PCR 结果来看,使用 RAPD 引物都得到了扩增结果,但是电泳结果显示出部分差异,说明不同抽提方法所残留的杂质对 PCR 扩增有影响。两个引物扩增中,不同海藻的 LiCl 法的抽提的 DNA 的 PCR 扩增都进行得十分充分,暗示该方法抽提 DNA 后残留的杂质对后续分子生物学研究影响最小。如果能够利用 DNA 纯化试剂盒对抽提的 DNA 进行进一步的纯化,将明显提高 DNA 质量,并能应用于各种分子生物学操作。因此,LiCl 法和 CTAB 法均可作为简单高效的 DNA 提取方法,适用于多种海藻,其操作简便易行,成本较低,是较为理想的方法。

#### 参考文献:

- [1] 韩 峰,宫倩红,史晓种,等.海藻核酸提取的难点及对策[J].海洋科学,2004,28(10):71-74.
- [2] 成永旭.生物饵料培养学[M].北京:中国农业出版社,2005.
- [3] 甘旭华,唐欣昀,刘广金,等.螺旋藻的纯化[J].微生物学通报,2005,32(2):1-4.
- [4] 李晋楠,汪志平.高质量螺旋藻基因组 DNA 制备方法研究[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2002,28(5):533-536.
- [5] Hong Y K, Sohn C H, Lee K W, et al. Nucleic acid extraction from seaweed tissues for polymerase chain reaction [J]. Marine Biotechnology, 1997, 5(2-3):95-99.
- [6] 郭宝太,夏连胜,姜国勇,等.提取条斑紫菜高纯度总 DNA 及其质粒状 DNA 的新方法[J].莱阳农学院学报,2002,19(1):3-6.
- [7] Hu Z M, Zeng X Q, Wang A H, et al. An efficient method for DNA isolation from red algae [J]. Journal of Applied Phycology, 2004, 16(3):161-166.

- [8] 茅云翔,张宝红,杨官品,等. 节旋藻(螺旋藻)高分子量 DNA 的两种制备方法[J]. 海洋科学,2003,27(2):32-36.
- [9] 吴立山,王亚军,刘必谦. 坛紫菜 DNA 提取的初步研究[J]. 水利渔业,2005,25(4):21-23.
- [10] 王 勇,裴鲁青,骆其君,等. 紫菜丝状体 DNA 的提取[J]. 海洋学报,2002,(3):146-148.
- [11] 柯珍恋,徐 虹,章 军. 抑制螺旋藻胞内核酸酶活性的研究[J]. 海洋科学,2003,27(1):34-37.
- [12] Aldrich J, Cullis C A. RAPD analysis in flax: Optimisation of yield and reproducibility using Klen Taq I DNA polymerase, chelex 100, and gel purification of genomic DNA[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11(2):128-141.
- [13] Fu R Z, Wang J, Sun Y R, et al. Extraction of genomic DNA suitable for PCR analysis from dried plant rhizomes roots[J]. Biotechnology, 1998, 25(5):796-801.
- [14] Porebski S, Bailey L G, Bernald R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1997, 15(1):8-15.
- [15] 欧阳高亮,肖 俐,李祺福,等. 分子生物学技术在水产养殖中的应用[J]. 海洋科学,2004,24(3):31-34.
- [16] 罗立明,欧阳叶新,胡鸿钧. 海洋单细胞四目藻基因组 DNA 的微量提取[J]. 武汉植物学研究,2003,21(4):295-300.
- [17] 陈 颖,刘根齐,李文彬,等. 3 种小球藻 DNA 提取方法的比较[J]. 植物生理学通讯,2001,37(3):242-244.
- [18] 张建民,杨官品,张学成. 一种提取眼点拟微球藻(*Nannochloropsis oculata*) DNA 的简便方法[J]. 海洋科学,2003,27(9):58-61.

### 《中国水产科学》2009 年征订启事

《中国水产科学》为中国水产科学研究院主办的学术性期刊,目前已成为中国水产界的重要学术期刊。本刊在促进中国的水产科学、加强国际间学术交流、展示中国水产界最新科研成果与研究进展等方面发挥了重要作用。刊物影响因子逐年递增,2007 年中国科技期刊引证报告统计的影响因子值为 0.829,并获得第三届“中国百种杰出学术期刊”奖。

本刊主要报道水产生物学基础研究、水生生物病害及其防治、水产生物营养及饲料、渔业生态保护及渔业水域环境保护、水产品保鲜与加工综合利用、水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖以及渔船等方面的最新进展、最新成果、最新技术和方法。

本刊为双月刊,A4 开本,每期 176 页,单月出版,国内外公开发售。

国内定价 30 元/期,全年 180 元(含邮费)。邮发代号:18-250

国内统一刊号:CN11-3446/S,国际标准刊号:ISSN1005-8737,国外代号 4639Q。

直接向编辑部订阅可享受 8 折优惠,也可在当地邮电局(所)办理订阅手续(可破季订阅)。漏订或补订当年和过期期刊,请直接向编辑部订阅。

编辑部地址:北京市丰台区青塔村 150 号(中国水产科学研究院内),邮政编码:100141

联系电话:010-68673921

传 真:010-68673931

E-mail:zgscx@cafs.ac.cn;jfishok@publica.bj.cninfo.net