

段文斌, 金 刚, 代建国, 等. Trizol 法提取普通小球藻总基因组 DNA[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 33–34.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.009

Trizol 法提取普通小球藻总基因组 DNA

段文斌^{1,2}, 金 刚¹, 代建国¹, 张丽君¹, 栾崇林¹, 于化泓²

(1. 深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院, 广东深圳 518055; 2. 南昌大学生命科学与食品工程学院, 江西南昌 330030)

摘要: Trizol 法主要应用于动植物 RNA 提取, 由于其在提取 RNA 的过程中将 DNA 有效分离到有机相中, 并且在有机相中 DNA 未被降解, 因此本研究采用 Trizol 法提取具有细胞壁的小球藻的基因组 DNA, 发现提取得到的 DNA 纯度和产率高, 且 DNA 完整性好。经检测: $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}} = 1.86$, 平均得率为 $977\text{ }\mu\text{g/g}$ 鲜质量; 琼脂糖电泳检测其条带清晰, 未发生降解。该方法具有简单快速获得高纯度和高产率的小球藻基因组 DNA 的优点。

关键词: Trizol 法; 普通小球藻; DNA 提取

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)07-0033-02

Trizol 法最早由 Chomczynski 等提出, 用于提取细胞或组织中的总 RNA^[1]。经过 Trizol 处理过的样品, 其总 RNA、DNA 及蛋白质分别分布在上层水相、中间层、下层有机相。Trizol 试剂中含有的苯酚、异硫氰酸胍等物质, 将细胞迅速破碎, 并抑制释放出来的核酸酶, 同时能够保持 RNA、DNA 的完整性, 因此对 RNA、DNA 的同时提取纯化十分有用^[2], 大大节约试验时间, 提高试验效率。小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 作为一种单细胞绿藻, 具有极强的光合自养能力; 含有丰富的脂质、蛋白质、维生素、核酸、食物纤维、叶绿素等, 都是人体健康不可或缺的营养物。小球藻还生产多种生物活性物质^[3]。由于其脂类可以达到细胞干质量的 10%~30% 而被用于生产生物柴油^[4-5]; 通过转基因小球藻可以被用来生产病毒抗体^[6]; 也发现小球藻具有抗菌活性^[7]; 小球藻可以治理重金

属、有机物以及氮磷污染^[8]。因此, 科研工作者开始对小球藻进行深入研究。本研究尝试使用 Trizol 法^[9]提取小球藻基因组 DNA, 以期获得简单快速获取高纯度高产率基因组 DNA 的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

普通小球藻购自中国科学院典型培养物种保藏委员会海洋生物种质库, 使用 SE 培养基培养, 在三角瓶中培养, 培养温度为 25 ℃, 光照强度条件为 2 000 lx, 光暗周期设置为 12 h/12 h; 培养至对数后期取样, 试验前将普通小球藻 4 ℃ 黑暗处理 24 h, 将细胞内储存的淀粉消耗掉, 将有利于 DNA 的提取。

1.2 试剂

Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司, 氯仿、无水乙醇及异丙醇均为国产分析纯, 10 mol/L NH₄Ac, TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 值 8.0), 70% 乙醇。

1.3 仪器

离心机: 德国 Eppendorf 公司生产; 凝胶成像系统: 美国 SYNGENE 公司生产; 核酸/蛋白分析仪: BECKMAN COUL-

收稿日期: 2014-05-02

基金项目: 广东省自然科学基金 (编号: 10151805501000007); 广东省深圳市科技项目 (编号: JC201005280534A, JCY20130331151022276)。

作者简介: 段文斌 (1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物技术。

E-mail: 394050313@163.com。

通信作者: 金 刚, 教授。E-mail: jingang@szpt.edu.cn。

[10] Yu J H, Zhu B M, Wickre M, et al. The transcription factors STAT5A and STAT5B negatively regulate cell proliferation through the activation of Cdkn2b and Cdkn1a expression[J]. Hepatology, 2010, 52(5): 1808–1818.

[11] 方 琼, 李 娟, 吕学斌, 等. 家猪信号转导及转录激活因子基因 3、5a 及 5b 的克隆、剪切变体鉴定及组织表达图谱分析[J]. 四川大学学报, 自然科学版, 2012, 49(4): 879–886.

[12] 刘云峰, 王桂芝, 李秋梅, 等. 崂山奶山羊 *LEP* 和 *STAT5a* 基因对泌乳和生长性状的影响[J]. 中国农业科学, 2013, 46(18): 3946–3954.

[13] 宋章会. 贵州山羊生产现状调查与发展对策[J]. 贵州畜牧兽医, 2007(5): 15–16.

[14] Sham P, Bader J S, Craig I, et al. DNA pooling: a tool for large-scale association studies [J]. Nature Reviews Genetics, 2002, 3(11): 862–871.

[15] Suliman H B, Carraway M S, Piantadosi C A. Postlipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA [J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2003, 167(4): 570–579.

[16] 陈焕珍, 王 晓, 李凤英, 等. JAK2/STAT5 通路在胰岛对妊娠适应中的作用[J]. 上海交通大学学报, 2012, 32(5): 555–559.

[17] Shain K H, Yarde D N, Meads M B, et al. $\beta 1$ Integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation[J]. Cancer Research, 2009, 69(3): 1009–1015.

[18] 褚 敏, 阎 萍, 裴 杰, 等. STATs 家族基因多态性在奶牛育种中的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011(2): 25–26.

[19] Huang Y L, Zhao F, Luo C C, et al. SOCS3-Mediated blockade reveals major contribution of JAK2/STAT5 signaling pathway to lactation and proliferation of dairy cow mammary epithelial cells *in vitro* [J]. Molecules, 2013, 18(10): 12987–13002.

TER DU800;酶标仪:Thermo Fisher SCIENTIFIC。

1.4 试验步骤

将培养至对数期($D_{680\text{ nm}}$ 约为 $0.6^{[10]}$) 的普通小球藻 300 mL 在 1 500 g 下离心 5 min 进行收集并称鲜质量(500 ~ 600 mg),用新鲜培养基重悬浮 1 次,并再次离心收集;加入 5 mL Trizol 试剂,吹打混匀,转入玻璃匀浆器研磨 10 min;加入 1.5 mL 氯仿,混合均匀,在 10 000 g 、室温下离心 10 min,弃上层水相和中间变性蛋白层,吸取下层有机相至新的离心管中;加入等体积的无水乙醇沉淀 DNA, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min, 10 000 g 、室温下离心 10 min;弃去上清,加入 100 μL TE 溶解管底的 DNA 沉淀,吹打混匀,加入 40 μL 10 mol/L NH_4Ac ,混匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min, 10 000 g 、室温下离心 10 min;吸取上清至新的离心管中,加入 140 μL 的异丙醇,混匀, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min, 12 000 g 、室温下离心 10 min,弃去上清;加入 70% 的乙醇洗涤 2 次沉淀,离心,吸去离心管底的液体,在室温下晾干 5 min,加入 80 μL TE 溶液溶解 DNA。

1.5 检验方法

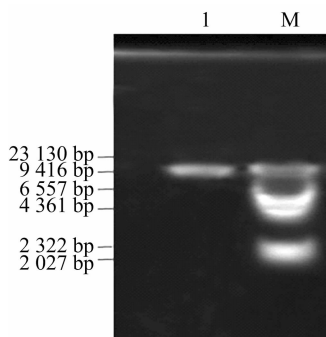
使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析以及核酸/蛋白分析仪测定其 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$ 及其比值;取 5 μL 溶有 DNA 的 TE 溶液稀释 400 倍后进行 DNA 浓度测定,并根据 DNA 浓度计算公式($\text{DNA 浓度} = \text{稀释倍数} \times D_{260\text{ nm}} \times 50/1000$)计算出浓度值,计算结果单位为 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

2 结果与分析

使用 Trizol 法提取普通小球藻基因组 DNA,其紫外吸收光谱在 260 nm、280 nm 波长处都有吸收峰, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值为 1.86,表明该方法提取得到的 DNA 样品没有蛋白质等其他杂质,纯度较高(表 1);并且具有高 DNA 产率,平均产率为 977 $\mu\text{g}/\text{g}$ 鲜质量)。从图 1 可以看出,琼脂糖凝胶电泳成像后的图像中点样孔处干净,表明并没有蛋白质污染;DNA 条带单一,无拖尾及降解现象,说明所提取的 DNA 完整性好并且没有 RNA 污染,电泳图谱与 21 kb 位置相齐。

表 1 普通小球藻 DNA 紫外吸收值及 DNA 浓度测定

$D_{260\text{ nm}}$	$D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	DNA 浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
0.327 3	0.175 9	1.86	6.546



1—Trizol 法提取的小球藻 DNA;

M— λDNA ($\text{Hind III} + \text{EcoR I}$) marker

图 1 1% 琼脂糖凝胶电泳结果

3 讨论

由于小球藻具有很厚的细胞壁^[11],并且是单细胞真核藻

类,细胞直径 3 ~ 8 μm ,这些小球藻自身的特性给小球藻基因组 DNA 提取造成了不小困难,其细胞壁破碎和细胞溶解效果对基因组 DNA 的提取产率和效果具有较大影响;已有小球藻基因组 DNA 提取方法^[12],如任学艳等的 SDS 法^[13]。SDS 法试验步骤较多,在研磨时由于没有缺少合适的保护试剂,DNA 容易被降解,影响到基因组 DNA 的产率和提取速度。CTAB 法现在有更多的改进方法^[13-14],但是基因组得率较低,张桂和等提取的蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 得率为 695 $\mu\text{g}/\text{g}$ 鲜质量^[14]。陈颖等的超声波法和纤维素酶法有 RNA 污染、DNA 降解以及产率低的问题。本试验采用加入 Trizol 后进行玻璃匀浆器研磨,一是保证小球藻的充分破碎,对小球藻基因组 DNA 起到保护作用,是保证基因组 DNA 的得率的重要因素。

本试验设计出了提取普通小球藻基因组 DNA 的方法;该方法稳定可靠,并且具有简单快速获取高纯度和高产率基因组 DNA 的优点。该方法可以被用于分子生物学试验作为常规提取普通小球藻基因组 DNA 的方法。

参考文献:

- [1] Chomeczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 162(1): 156-159.
- [2] 秦娟娟, 路志勇, 焦章平, 等. 改良 TRIzol 法同步提取血液 RNA 和 DNA[J]. 法医学杂志, 2013, 29(3): 209-211.
- [3] Daniell H, Chebolu S, Kumar S, et al. Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins[J]. Vaccine, 2005, 23(15): 1779-1783.
- [4] 邹宁. 生物反应器培养藻类生产生物柴油技术[C]// 2008 农业生物环境与能源工程国际论坛论文集. 北京: 中国农业工程学会, 2008: 130-133.
- [5] 赵引德. 新奥微藻制生物柴油中试成功[N]. 中国化工报, 2008-12-12(2).
- [6] Hayashi K H, Hayashi T. A screening strategy for selection of anti-HSV-1 and anti-HIV extracts from algae[M]. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2009: 264-271.
- [7] 江红霞, 郑怡. 8 种微藻抗菌活性研究[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2002, 18(2): 117-120.
- [8] 浩云涛. 椭圆小球藻 (*Chlorella ellipsoidea*) 的污水净化效应及其对 Cd^{2+} 的耐受性机制[D]. 南京: 南京师范大学, 2002.
- [9] 王暑辉, 徐倩, 徐筱, 等. 富含多糖多酚的侧柏叶片总 RNA 提取方法[J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(1): 76-80, 89.
- [10] 李士虎, 朱明. 分光光度法测定单胞藻数量初步研究[J]. 淮海工学院学报: 自然科学版, 2001, 10(增刊 1): 8-9.
- [11] Hiroshi T, Tayoyasu H. Studies on the cell wall of *Chlorella* III: Incorporation of photosynthetically fixed carbon into cell wall of synchronously growing cells of *Chlorella ellipsoidea*[J]. Plant & Cell Physiology, 1982, 23(6): 1033-1040.
- [12] 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.
- [13] 王恒强, 孔庆军, 任雪艳, 等. 小球藻的分离及其 DNA 提取方法的研究[J]. 农业科学与技术: 英文版, 2008, 9(4): 44-46.
- [14] 张桂和, 徐碧玉, 王珺. 几种海洋微藻基因组 DNA 的分离提取及 PCR 检测[J]. 热带海洋学报, 2007, 26(1): 68-72.