

周 彪,郭政宏,严亨秀. 藏猪粪便芽孢杆菌基因组 DNA 的提取方法[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):93-95.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.024

藏猪粪便芽孢杆菌基因组 DNA 的提取方法

周 彪,郭政宏,严亨秀

(西南民族大学生命科学与技术学院,四川成都 610041)

摘要:藏猪源的芽孢杆菌制剂具有潜在研究应用价值,更好地提取其基因组 DNA 对后期研究具有重要作用。采用微波法、酚/三氯甲烷法、改进 CTAB 法、试剂盒法等 4 种方法提取同一份藏猪粪便 DNA,测定所得 DNA 含量及纯度,然后对 DNA 进行 16S rRNA 基因扩增并使用琼脂糖凝胶电泳法对比。结果表明,4 种方法均能提取到藏猪粪便的芽孢杆菌基因组 DNA,微波法虽然得到最多的 DNA,但是其蛋白质含量过高,DNA 纯度最低;试剂盒法提取的 DNA 纯度最高,但是 DNA 含量太低;综合比较,改进 CTAB 法 DNA 得率多且纯度高,性质稳定,扩增效果好,价格低廉,是最优提取方法。

关键词:藏猪;粪便;基因组 DNA;提取方法

中图分类号:S852.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)04-0093-02

藏猪别称藏香猪,原产于中国青藏高原海拔 2 500 ~ 4 300 m 的农区和半农区。藏猪保存了较为纯正的品系资源,是唯一能适应高原海拔气候和以放牧为主的猪种,是我国特有世界珍稀的草食性优良品种^[1]。藏猪肉质优良,主要源于其食草特性和生活环境,也与其不同于其他猪种的特殊胃肠道环境有着密不可分的关系。芽孢杆菌制剂通常都是以休眠孢子的形式存在,进入动物肠道后,孢子能在肠道上部迅速萌发、增殖,并分泌很多种活性很强的消化酶,有助于降解植物性饲料中某些复杂的碳水化合物,同时可以消耗大量的氧,维持肠道厌氧环境,增强肠道对厌氧益生菌的定植,抑制致病菌生长,平衡、稳定乳酸杆菌,维持肠道微生态平衡^[2-5]。

藏猪来源的芽孢杆菌制剂具有潜在的开发研究价值,提取其基因组 DNA 在开发研究中具有重要的意义,理想的基因组 DNA 获取方法除了考虑到 DNA 的产率,还要考虑到尽可能减少 DNA 的降解及试剂成本等。目前,已经有多种提取微生物基因组 DNA 的方法^[6-8],如微波法、酚/三氯甲烷法、CTAB 法、试剂盒法等。为了探究不同方法获取的基因组 DNA 对芽孢杆菌研究的影响,本试验采用 4 种方法对样品进行基因组 DNA 的提取,通过紫外可见分光光度计、琼脂糖凝胶电泳分析不同方法得到 DNA 的产量、纯度、稳定性,再将获得的基因组 DNA 进行 16S rRNA 基因扩增进行对比并评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)裂解液、酚、三氯甲烷、异戊醇、无水冰乙醇、AxyPrep 细菌基因组 DNA 小量制备试剂盒、琼脂糖、磷酸钠缓冲液(pH 值 7.0)、10% SDS 溶液、TAE 缓冲液、TE 缓冲液、LB 液体培养基等。

收稿日期:2015-11-23

基金项目:四川省应用基础研究计划(编号:2014JY0038)。

作者简介:周 彪(1989—),男,河北石家庄人,硕士研究生,研究方向为基础兽医学。E-mail:zhoubiao86@outlook.com。

通信作者:严亨秀,博士,教授,硕士生导师,研究方向为药理学。

E-mail:yanhengxiu@hotmail.com。

1.1.2 试验样品 采集于西藏林芝地区一牧民家中公藏猪新鲜粪便,-80℃液氮保存带回实验室。

1.1.3 主要仪器 PCR 扩增仪,东胜龙 ETC811;高速冷冻离心机,Thermo;紫外可见分光光度计,上海成光仪器有限公司;凝胶成像系统,Tanon;电泳仪,Tanon;电泳槽,Tanon;微量移液器,Eppendorf;电子天平,江苏省常州市宏衡电子仪器厂;涡旋振荡器,北京优晟联合科技有限公司等。

1.2 方法

1.2.1 样品预处理 称取冻存的粪便样品 5 g 于 4℃冰水或冰盒上解冻,置于 50 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中,并充分涡旋混匀,纱布过滤后,收集滤液并于沸水浴中处理 5 min,吸取 1 mL 热处理后的滤液加入到 19 mL LB 液体培养基中,振荡培养 24 h,4℃保存备用。

1.2.2 基因组 DNA 的提取

1.2.2.1 微波法 (1)微量移液器取 1 mL LB 菌液于 1.5 mL EP 管中,12 000 r/min 离心 2 min,再用 PBS 洗涤菌体 2~3 次;(2)弃上清,加 500 μL 1×TE 吹打混匀,取 100 μL 于 200 μL EP 管,12 000 r/min 离心 2 min;(3)弃上清,加 100 μL 1×TE 吹打混匀,12 000 r/min 离心 2 min;(4)弃上清,加 100 μL 1×TE 吹打混匀,用微波炉(先预热 1 min)加热 1 min,12 000 r/min 离心 2 min;(5)收集上清液,即为所提 DNA。

1.2.2.2 酚/三氯甲烷法 (1)微量移液器取 1 mL LB 菌液于 1.5 mL EP 管中,10 000 r/min 离心 3 min,弃上清;(2)加入 500 μL STE 液悬浮,加 10 μL 蛋白酶 K(20 mg/mL),混匀,37℃恒温水浴 20 min,再加入 10% SDS 20 μL,10 mg/mL PKA 20 μL;(3)置于 55~65℃恒温水浴中 1~3 h;(4)500 μL 酚-三氯甲烷-异丙醇(体积比为 25:24:1),下层生成牛奶色,混匀后 10 000 r/min 离心 4 min;(5)上一步后分 3 层,用剪了头的枪头吸取上层 DNA,加入异丙醇-三氯甲烷 500 μL,10 000 r/min 离心 3 min,收集上清;(6)加入 30 μL 5 mol/L NaCl,1 000 μL 冰无水乙醇,混匀后,冰上静置 10 min 至出现白色丝状物,10 000 r/min 离心 3 min,弃上清;(7)加入 500 μL 70%乙醇,10 000 r/min 离心 2 min,弃乙醇,风干约 30 min;(8)加入 100 μL 无菌水即为所提 DNA。

1.2.2.3 改进 CTAB 法 (1)微量移液器取 1 mL LB 菌液于 1.5 mL EP 管中,13 000 r/min 离心 2 min,弃上清,用 0.85% NaCl 溶液洗涤 2 次,加 550 μ L 1 \times TE 吹打混匀;(2)加 8 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL),混匀,37 $^{\circ}$ C 恒温水浴 30 min,再加 40 μ L 10% SDS 混匀,37 $^{\circ}$ C 恒温水浴 30 min,再加入 100 μ L 5 mol/L NaCl 混匀,加 80 μ L CTAB NaCl 溶液混匀,65 $^{\circ}$ C 恒温水浴 10 min;(3)再加入 8 μ L 10 mg/mL Rnase,37 $^{\circ}$ C 恒温水浴 1 h;(4)加入等体积 (0.7 ~ 0.8 mL) 三氯甲烷 - 异丙醇 (体积比为 24 : 1),轻轻振荡混匀,14 000 r/min 离心 12 min,分 3 层,收集上清液,加入等体积酚 - 三氯甲烷 - 异丙醇 (体积比为 25 : 24 : 1),轻轻振荡混匀,14 000 r/min 离心 10 min;(5)收集上清液,加入等体积三氯甲烷 - 异丙醇 (体积比为 24 : 1),轻轻振荡混匀,14 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,加入 2 倍体积预冷的无水乙醇,混匀,-20 $^{\circ}$ C 静置 30 min,14 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 500 μ L 70% 乙醇,混匀;(6)14 000 r/min 离心 3 min,弃上清,风干 15 min,将沉淀溶于 60 μ L ddH₂O 中,即为所提 DNA。

1.2.2.4 试剂盒法 采用 AxyPrep 细菌基因组 DNA 小量制备试剂盒,具体步骤参见说明书。

1.2.3 基因组 DNA 质量检测 分别采用紫外可见分光光度计法、1% 琼脂糖凝胶电泳法、PCR 扩增法分析所提取基因组 DNA 的得率、纯度以及大小。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 得率及纯度

对藏猪粪便进行沸水浴处理 5 min,只有芽孢杆菌可以存活于沸水浴中,其他细菌已被杀死。将 4 种方法所提取的基因组 DNA 稀释 100 倍,用紫外可见分光光度计测定 DNA 得率及纯度,每个样品 DNA 测定 3 次,取其平均值,得到 DNA 提取含量、DNA 纯度和蛋白质含量。DNA 得率测定标准: $D_{260\text{ nm}}$ 值为 1 时等同于 50 μ g/mL 双链 DNA, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值在 1.7 ~ 1.9 之间,则说明所测样品 DNA 纯度较高;比值低于 1.7,则可能有蛋白等杂质污染;高于 2.0,则样品 DNA 很可能已经降解。从表 1 可以看出,DNA 得率微波法 > 改进 CTAB > 试剂盒法 > 酚/三氯甲烷法;DNA 纯度试剂盒法 > 改

进 CTAB > 酚/三氯甲烷法 > 微波法;蛋白含量微波法 > 改进 CTAB > 试剂盒法 > 酚/三氯甲烷法。改进 CTAB 法的 DNA 得率和纯度均是第 2 位;微波法得率最高,但是其蛋白含量最高,导致 DNA 纯度最低;试剂盒法得率居第 3 位,DNA 纯度最高且蛋白含量最少;酚/三氯甲烷法得率最低且 DNA 纯度居于第 3 位。微波法和酚/三氯甲烷法的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值均低于 1.70,接近 1.0,这 2 种方法提取的 DNA 污染较严重,改进 CTAB 法和试剂盒法分别是 1.69、1.76,属于纯度较高的 DNA。试剂盒法需要价格昂贵的试剂盒。综合考虑以上因素,改进 CTAB 法最适合于藏猪粪便中芽孢杆菌基因组 DNA 的提取。

表 1 4 种方法提取的基因组 DNA 纯度和得率

方法	$D_{260\text{ nm}}$	$D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	DNA 得率 (μ g/mL)
微波法	0.221	0.208	1.06	1 105
酚/三氯甲烷法	0.107	0.087	1.23	535
改进 CTAB 法	0.213	0.126	1.69	1 065
试剂盒法	0.186	0.105	1.76	930

注:DNA 得率 = $D_{260\text{ nm}}$ \times 稀释倍数 \times 50 μ g/mL。

2.2 基因组 DNA 电泳检测

1% 琼脂糖凝胶电泳法检测结果 (图 1) 表明,4 种方法提取的基因组 DNA 分子质量均在 23 000 bp 左右,酚/三氯甲烷法所提 DNA 拖尾较严重,表明含杂质较多,其余 3 种方法所提基因组 DNA 较为完整且纯度较高,电泳条带清晰。图 2 为基因组 DNA 在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱存放 24 h 后所得电泳,微波法提取的基因组 DNA 降解量最多,表明 DNA 含有太多杂质。其他 3 种方法基因组 DNA 均有相似程度的降解。

2.3 16S rRNA 基因 PCR 扩增后效果

用细菌 16S rRNA 基因通用引物扩增所提基因组 DNA,使用 1% 琼脂糖电泳法检测,以 Marker DL2000 作为标准分子质量参照,通过凝胶成像系统成像 (图 3),4 种方法 PCR 扩增效果都较好,扩增的片段大小在 15 000 bp 左右,且干扰性杂带不多,重现性较好,但微波法、改进 CTAB 法和试剂盒法获得的条带较清晰,酚/三氯甲烷法的条带较模糊,表明微波法、改进 CTAB 法和试剂盒法提取的基因组 DNA 具有较好的质量,所得的 DNA 可作为 PCR 模板进行 16S rRNA 基因的有效扩增,为进行后续的试验研究提供材料保障。

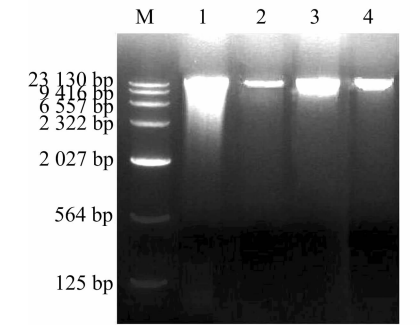


图1 新鲜基因组 DNA 电泳结果

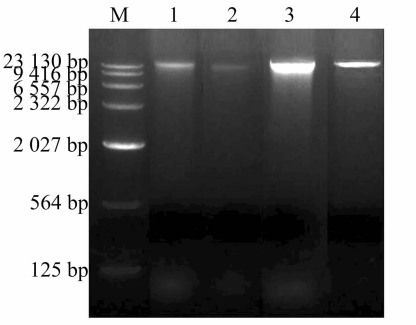


图2 -20 $^{\circ}$ C 存放 24 h 后基因组 DNA 电泳结果

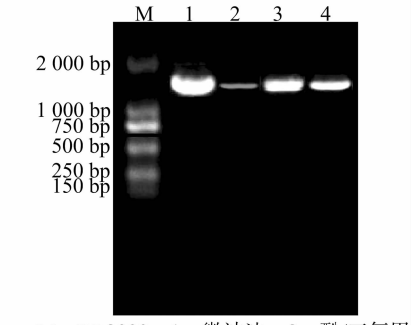


图3 16S rRNA 基因扩增电泳结果

3 结论与讨论

微波法只有洗涤、微波振荡破壁和酚/三氯甲烷抽提 3 步,相对于物理法破壁的费时、费力和酶法破壁的长时间消化

处理,微波法具有简便、高效、快速和价廉等特点^[9]。虽然微波法能提取到高得率的 DNA,但所提 DNA 中含有太多杂质,以致其稳定性极差,很可能是因为未进行核酸酶消化处理。酚/三氯甲烷抽提方法是目前提取外周血基因组 DNA 方

赵 满,李丽芳,王友竹,等. 黄粉甲翅芽生长因子基因的克隆及表达分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):95-98.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.025

黄粉甲翅芽生长因子基因的克隆及表达分析

赵 满¹, 李丽芳¹, 王友竹¹, Elena N. Elpidina², 朱家颖¹

(1. 西南林业大学云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南昆明 650224;

2. A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow 119991, Russia)

摘要:翅芽生长因子(imaginal disc growth factor, IDGF)是一类调节昆虫发育和生长的因子。利用 RACE 克隆技术,克隆获得黄粉甲(*Tenebrio molitor*) IDGF 基因,其 cDNA 序列长 1 465 bp,开放阅读框为 1 296 bp,可编码 431 个氨基酸,预测理论分子量为 48.25 ku,等电点为 7.63。氨基酸序列同源比对分析发现,黄粉甲 IDGF 与赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)和蔗根非耳象(*Diaprepes abbreviatus*)的 IDGF 相似性分别为 89%、71%。系统发育树分析表明,黄粉甲 IDGF 与赤拟谷盗 IDGF 进化关系最近。荧光定量 PCR 分析表明,在不同发育阶段, IDGF 基因在幼虫 1 龄和 2 龄中的表达量明显高于其他发育阶段。在蛹期不同组织中, IDGF 基因在脂肪体中的表达量最高。被管氏肿腿蜂(*Scleroderma guani*)寄生后, IDGF 基因的转录水平未受影响,表明寄生不能调控该基因的转录表达。

关键词:翅芽生长因子;基因克隆;黄粉甲;序列分析;管氏肿腿蜂

中图分类号: S433.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0095-04

翅芽生长因子(imaginal disc growth factor, IDGF)是一种可溶性多肽生长因子,因在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)翅芽 C1.8 + 细胞中鉴定具有促进翅芽细胞的增殖和

收稿日期:2015-09-23

基金项目:国家自然科学基金(编号:31411130192、31260449);云南省中青年学术与技术带头人后备人才项目(编号:2013HB077);云南省高校森林有害生物科技创新团队项目。

作者简介:赵 满(1988—),女,云南昭通人,硕士研究生,主要从事昆虫生理生化与分子生物学研究。E-mail:691041481@qq.com。
通信作者:朱家颖,博士,副教授,主要从事昆虫生理生化与分子生物学研究。E-mail:jyzyhu001@gmail.com。

法,可除去蛋白质和色素物质,研究表明,酚/三氯甲烷法可提取高纯度的 DNA^[10]。在本试验中,酚/三氯甲烷法提取的基因组 DNA 得率最低, DNA 纯度居于第 3 位,可能与酶消化细胞壁时间不足、萃取不彻底有关。改进 CTAB 法提取的基因组 DNA 得率和纯度均居第 2 位,综合考虑是提取藏猪粪便芽孢杆菌基因组 DNA 的最优方法。CTAB 法提取的 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检测和 16S rRNA 扩增表明,该法提取的 DNA 蛋白质污染少,降解不明显,产量稳定,重复性好,可做大量提取试验并应用于后续研究。试剂盒法操作简单,用时相对较短,所得 DNA 质量较为稳定,但价格昂贵,使用次数有限,不适合大量基因组 DNA 提取。不同方法出现的差异可能与不同方法裂解细菌细胞的效率及藏猪粪便中特异菌群组成有关。用 4 种方法提取同一份样品 DNA 的得率和纯度差异较大,说明对肠道菌群研究时采用不同 DNA 提取方法会影响对菌群多样性的分析,导致引入一些误差,因此,在研究不同动物肠道菌群时应选择合适的方法提取 DNA 以减少菌群分析误差。

参考文献:

[1] 贺寒冰,尹洛蓉,杨 肖,等. 藏猪和长白猪对口蹄疫疫苗的免疫

生长而得名^[1-2]。最初,科学家们在黑腹果蝇中通过同源性搜索和遗传分析发现存在一些类生长因子,如 *Spitz* 和 *Gurken* 的表皮生长因子(EGF)、纤维细胞生长因子(FGF)及转化生长因子- β (TGF- β)^[2-6]。但是,这些基因不具有生长因子所具备的促进有丝分裂活性,而仅是这些基因编码的分泌蛋白异常表达能导致细胞增生并抑制生长^[7-9]。然而,经细胞体外培养认为, IDGF 可能是作为胰岛素或类胰岛素的一个辅助因子而发挥生理功能^[10-11]。目前,遗传学研究发现, IDGF 参与调节果蝇的生长发育,在果蝇的胚胎卵黄细胞、胚胎和幼虫的脂肪体中显著表达,其蛋白分泌到血淋巴并运输到靶标

应答特性比较研究[J]. 四川动物,2011,30(4):517-521.

[2] 胡东兴,潘康成. 微生物制剂及其作用原理[J]. 中国饲料,2001(3):14-16.

[3] 何明清,程安春. 动物微生物学[M]. 成都:四川科学技术出版社,2004.

[4] 刘学剑. 饲用芽孢杆菌的研究和应用[J]. 广东饲料,2005(14):30-32.

[5] 黎春辉. 芽孢杆菌与部分抗菌中草药联合应用的研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2008:1-7.

[6] 陈思媛,郭明璋,贺晓云,等. 用于分子生物学检测的粪便 DNA 的提取方法优化[J]. 农业生物技术学报,2013,21(12):1509-1517.

[7] Tang J N, Zeng Z G, Wang H N, et al. An effective method for isolation of DNA from pig faeces and comparison of five different methods [J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 75(3):432-436.

[8] 郑 刚,陈己任,胡博文,等. 基于 DGGE 分析的大鼠粪便及肠道细菌 DNA 提取方法研究[J]. 食品科学,2011,32(17):215-218.

[9] Orsini M, Romano - Spica V. A microwave - based method for nucleic acid isolation from environmental samples [J]. Lett Appl Microbiol, 2001, 33:17-20.

[10] 刘正旺,云美玲,钟江华,等. 提取陈旧血液标本中 DNA 的三种方法比较[J]. 中国热带医学,2012,12(3):321-323.