

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00752

利用改进的酚-氯仿法从猪毛囊中提取基因组 DNA

王继英^{1,2}, 俞英¹, 冯利霞¹, 王怀中², 张勤¹

1. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100193;
2. 山东省农业科学院畜牧兽医研究所, 济南 250100

摘要: 为提高从猪毛囊组织中提取基因组 DNA 的效率, 文章在借鉴从其他组织提取基因组 DNA 方法的基础上, 对经典的酚-氯仿法的反应体系和步骤进行了改进。利用改进的酚-氯仿抽提法, 从猪的毛囊组织中快速、高效地提取了高质量基因组 DNA。利用该方法从 1~6 根猪毛囊中提取的基因组 DNA 可满足基于 PCR 技术的相关分子生物学实验需要。

关键词: 猪毛囊组织; 基因组 DNA; 酚-氯仿法

Genomic DNA extraction from hair sacs of pigs using modified phenol-chloroform method

WANG Ji-Ying^{1,2}, YU Ying¹, FENG Li-Xia¹, WANG Huai-Zhong², ZHANG Qin¹

1. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;
2. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, China

Abstract: In referring to various methods for genomic DNA extraction from different tissues, we modified the classical phenol-chloroform procedure and reaction system for use in genomic DNA extraction from pig hair sacs. With the modified the phenol-chloroform method we successfully obtained high quality genomic DNA from pig hair sacs. Genomic DNA can be extracted from sacs of one to six pig hairs with satisfied quantity and quality for the need of PCR-based molecular experiment.

Keywords: pig hair sac; genomic DNA extraction; phenol-chloroform method

在猪分子遗传研究中, 绝大多数的研究采用血液、耳组织、肝脏等作为 DNA 模板来源。但在对本地猪及野猪研究过程中, 血样、耳组织等获得较为困难, 而猪毛囊不失为一种重要的 DNA 模板源, 因为: 采样过程简单, 便于操作, 尤其适用于野性较强的地方猪种猪群; 便于贮藏与运输; 不易损伤动物。毛发中的 DNA 主要集中在毛囊细胞中。在从动物体上采集或脱落的毛发中, 绝大多数

都带有完整的毛囊。从动物毛囊组织提取基因组 DNA 的方法研究已有多例报道^[2~6], 但因为毛囊组织量少且含有较多的角蛋白而不易消化, 用其提取的基因组 DNA 通常量少而且质量不高。因此探索从毛囊中提取高质量的基因组 DNA 的提取方法具有重要的意义。

酚、氯仿抽提 DNA 是最为经典, 也是一般实验室常用的方法, 上皮、血液、肌肉组织等均可采用

收稿日期: 2009-12-28; 修回日期: 2010-03-14

基金项目: 国家转基因重大专项(编号: 2009ZX08009-146B), 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号: 2006CB102104), 国家高新技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2008AA101002)和国家自然科学基金项目(编号: 30800776)资助

作者简介: 王继英(1977-), 女, 在读博士, 研究方向: 动物分子数量遗传学。E-mail: jnwangjiying@163.com

通讯作者: 张勤(1956-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物分子数量遗传学、计算机在动物育种中的应用。E-mail: qzhang@cau.edu.cn

该方法。本研究在借鉴其他组织基因组 DNA 提取的基础上, 优化反应体系和步骤, 利用酚-氯仿抽提法, 从 1~6 根猪的毛囊组织中快速、高效地提取了高质量基因组 DNA, 利用该方法提取的基因组 DNA 可满足基于 PCR 技术的相关分子生物学实验需要。

1 材料和方法

1.1 实验材料

采集体重均在 50 公斤左右的香猪(成年)及杜洛克、大约克(生长猪)的毛囊组织为实验材料。先用酒精棉球擦拭猪的颈背处, 然后用止血钳或手在猪的颈背处采带有完整毛囊的猪毛, -20℃ 冷冻保存。各品种分别选取带完整毛囊的猪毛 20 根, 用体视显微镜(OLYMPUS SZX7, JAPAN)测量毛及其毛囊的直径和长度, 以比较不同品种猪毛及毛囊的区别。香猪设 4 个组(1、2、4 和 6 根猪毛), 杜洛克和大约克各设两个组(6 和 12 根), 每组 3 个重复, 以比较不同品种、不同猪毛根数的毛囊组织基因组 DNA 的提取效果。

1.2 方法

1.2.1 猪毛囊组织 DNA 提取

取带有毛囊的猪毛 1~12 根, 用剪刀剪取根部带有毛囊的部分约 0.5 cm 放入 0.5 mL 离心管中。加组织抽提液(50 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0), 100 mmol/L EDTA(pH 8.0), 100 mmol/L NaCl, 1%十二烷基磺酸钠)200 μ L, 蛋白酶 K(20 mg/ μ L) 5~8 μ L, 充分混匀。55℃ 水浴消化 1~2 h, 中间用手指轻弹样品以加速消化过程。再向管中加入 5 mol/L NaCl 60 μ L, 饱和酚/氯仿/异戊醇(25: 24: 1) 260 μ L, 来回颠倒离心管混匀 5 min, 使蛋白质充分变性。10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液于另一新离心管中。加入 2 倍上清液体积的冰乙醇, 轻轻颠倒离心管, 使 DNA 成絮状沉淀析出。10 000 r/min 离心 5 min, 使 DNA 沉淀至离心管管底。然后用 70%的乙醇冲洗 DNA 沉淀 1~2 次, 自然凉干, 加入 40 μ L TE (10 mmol/L pH 8.0 Tris-Cl, 1 mmol/L pH 8.0 EDTA)溶解 DNA, -20℃ 保存。

1.2.2 基因组 DNA 的浓度、纯度测定及琼脂糖凝胶电泳检测

取 2 μ L 基因组 DNA, 利用 Nanovue(GE Healthcare)分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度。取

1~4 μ L 基因组 DNA, 在 0.8%的琼脂糖凝胶上电泳, 利用凝胶成像系统(BIO-RAD)观察、拍照。

1.2.3 PCR 检测

为验证猪毛囊组织基因组 DNA 的 PCR 扩增效果, 利用猪的 $\alpha 1$ 岩藻糖转移酶基因(*FUT 1*)引物^[1]对提取的 DNA 进行扩增, 引物序列如下: 上游引物 5'-CTTCAGCCAGGGCTCCTTTAAG-3', 下游引物 5'-CTTCCTGAACGTCTATCAAGACC-3'。PCR 扩增体系为: 10 \times buffer 2.5 μ L, 2 μ L dNTP, 上、下游引物各 1 μ L(12.5 μ mol/L), 毛囊组织 DNA 模板 1 μ L(浓度在 250 ng/ μ L 以上的要进行适当的稀释, 降低杂质浓度), HS *Taq* 酶 1 U (大连宝生物), 加双蒸水至 25 μ L。反应条件为: 94℃ 变性 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 次循环; 72℃ 延伸 8 min。扩增完毕后, 取 5 μ L 的 PCR 产物在 2.5%的琼脂糖凝胶上电泳检测扩增结果。

2 结果与分析

2.1 不同品种猪毛囊组织比较

我国地方品种猪的毛粗、硬和长, 特别是背部鬃毛更是如此, 从背部拔的鬃毛的毛囊组织完整且较大。相比较而言, 大约克和杜洛克的猪毛细、软和短, 背部的鬃毛不太明显, 拔时易断。表 1 是 3 个品种的猪毛及毛囊的直径和长度统计结果。可以看出, 杜洛克和大约克的毛及毛囊直径没有显著区别($P>0.05$), 但与香猪的毛和毛囊的直径均有极显著的差异($P<0.01$)。3 个品种的毛及毛囊的长度彼此间均有极显著差异($P<0.01$)。图 1 为 50 kg 左右体重的香猪、大约克和杜洛克的毛及毛囊照片, 通过此图也可以看出三者之间的明显差别。

2.2 毛囊基因组 DNA 的纯度和产量

在 DNA 提取过程中, 加入冰乙醇后可见白色雾状物形成, 轻轻上下颠倒几次, 除了 6 根杜洛克毛囊组织的样品组外, 其余组均可见絮状沉淀形成, 6 根杜洛克毛囊组织的样品组, 离心后在离心管管底也可见少许白色沉淀。

用分光光度计测定了所提毛囊基因组 DNA 的纯度($A_{260/280}$ 比值)和浓度(表 2)。从表 2 可以看出, 香猪的毛囊 DNA 提取量最高, 大约克次之, 杜洛克最少,

表 1 杜洛克、大约克和香猪毛及毛囊的直径和长度(n = 20)

品种	毛囊直径(mm) ± S.E.	毛直径(mm) ± S.E.	毛囊长度(mm) ± S.E.	猪毛长度(cm) ± S.E.
杜洛克	2.475±0.094 ^A	1.925±0.069 ^A	14.83±1.623 ^A	3.160±0.112 ^A
大约克	2.763±0.078 ^A	2.187±0.063 ^A	24.09±1.236 ^B	4.595±0.115 ^B
香猪	4.812±0.239 ^B	3.737±0.177 ^B	51.25±1.897 ^C	8.450±0.253 ^C

注: 采用 SPSS One-Way ANOVA 中的 LSD 法进行多种比较, 同列中不同字母的上标表示平均数间差异极显著($P < 0.01$); S.E.为标准误。

表 2 猪的毛囊组织基因组 DNA 浓度、纯度及总产量

品种	根数	重复数	浓度(ng/μL) ± S.E.	A _{260/280} ± S.E.	总产量(μg) ± S.E.
香猪	1	3	214.17 ± 36.47	1.93 ± 0.009	8.57 ± 1.46
	2	3	512.33 ± 102.78	1.98 ± 0.015	20.49 ± 4.11
	4	3	868.83 ± 90.44	2.00 ± 0.003	34.75 ± 3.62
	6	3	1464.67 ± 109.95	1.99 ± 0.008	58.58 ± 4.40
杜洛克	6	3	100.38 ± 5.95	1.85 ± 0.035	4.02 ± 0.24
	12	3	217.58 ± 53.05	1.95 ± 0.016	8.70 ± 2.12
大约克	6	3	263.42 ± 56.45	1.99 ± 0.010	10.54 ± 2.26
	12	3	312.83 ± 44.48	2.00 ± 0.003	12.51 ± 1.78

注: S.E.为标准误。

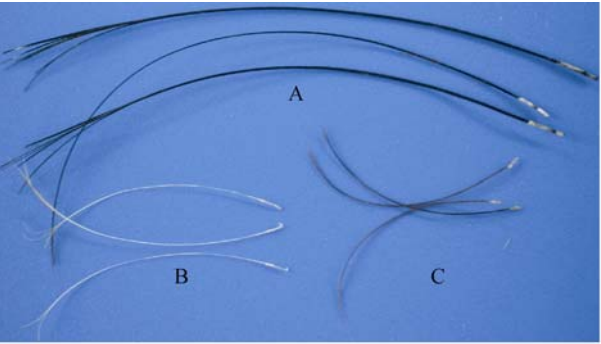


图1 不同品种猪(体重50 kg左右)毛及毛囊比较
A: 香猪; B: 大约克; C: 杜洛克

其趋势和 3 个品种的猪毛囊的直径和长度相一致。杜洛克的毛囊 DNA 提取量最低, 6 根杜洛克猪毛的毛囊中提取了总产量在 4 μg 左右的基因组 DNA, 而 6 根香猪猪毛的毛囊 DNA 提取量高达 58 μg, 是杜洛克毛囊组织 DNA 提取量的 14 倍。

一般认为, 紫外分光光度计检测时, 基因组 DNA 的 A_{260/A280} 比值在 1.80~2.0 之间说明 DNA 纯度符合常规的基于 PCR 的各种实验需要, 若该值小于 1.80 说明所提取的 DNA 含蛋白质较高, 大于 2.0 则说明 RNA 残留 RNA 过多。本试验所提的毛囊组织基因组 DNA 的 A_{260/280} 比值在 1.85 ~ 2.00, 说明蛋白质去除效果很好, 但是残留有一定量的 RNA, 这是因为本实验在 DNA 提取过程中没有加 RNA 酶

(RNAase)降解毛囊组织中的 RNA。

2.3 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测

图 2 为香猪毛囊 DNA 提取液(2 μL)在 0.8%的琼脂糖凝胶中电泳结果, 可以看出 1 根猪毛的毛囊 DNA 提取液带型清晰整齐, 而 2、4 和 6 根猪毛的毛囊 DNA 提取液浓度过高, DNA 带呈现圆括号型, 下部 RNA 及其他的残留物也较多。把 2、4 和 6 根猪毛的毛囊 DNA 提取液 2~12 倍稀释, 再取 2 μL 电泳, 结果如图 3 所示。可以看出, 带型变得整齐, 下部残留物也随之变得很淡。图 4 为 1~2 μL 杜洛克和大约克毛囊组织 DNA 提取液(未稀释)的电泳结果, 清晰整齐的 DNA 条带下, RNA 条带较清晰, 因为 DNA 提取过程中没有加 RNAase 降解毛囊组织中的 RNA 缘故。

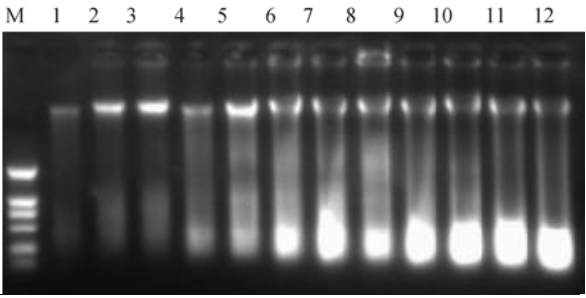


图 2 香猪毛囊组织 DNA 提取液稀释前电泳图
M: DL2000 Marker; 1~3: 1 根毛囊; 4~6: 2 根毛囊; 7~9: 4 根毛囊; 10~12: 6 根毛囊。

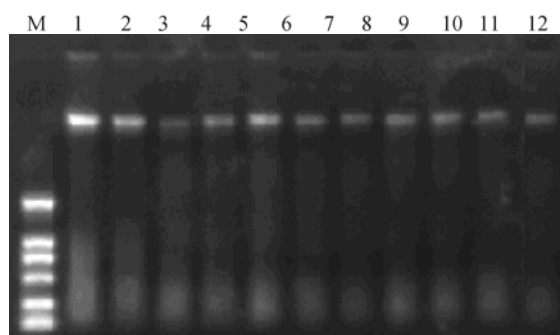


图 3 香猪毛囊组织 DNA 提取液 2~12 倍稀释后电泳图
M: DL2000 Marker; 1~3: 1 根毛囊; 4~6: 2 根毛囊(2~4 倍); 7~9: 4 根毛囊(8 倍); 10~12: 6 根毛囊(12 倍)。

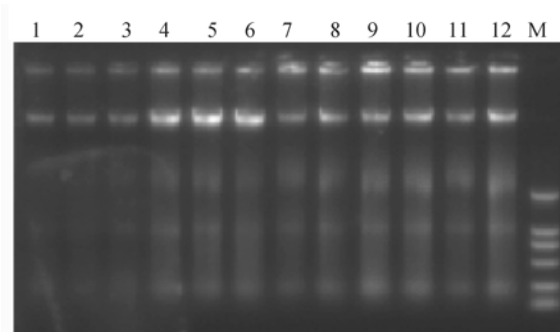


图 4 杜洛克和大约克毛囊组织 DNA 提取液电泳图(未稀释)
1~3: 6 根杜洛克毛囊样品组(2 μL); 4~6: 12 根杜洛克毛囊样品组(2 μL); 7~9: 6 根大约克毛囊样品组(2 μL); 10~12: 12 根大约克毛囊样品组(1 μL); M: DL2000 Marker。

2.4 PCR 检测

猪 *FUT* 基因扩增的结果见图 5。除了杜洛克 6 根毛囊样品组有一个扩增失败外, 从 1 根、2 根、4 根、6 根香猪及 6 根或 12 根杜洛克和大约克猪毛囊组织中提取的 DNA 均可获得 PCR 扩增产物, 且电泳带明亮整齐, 无非特异条带, 说明扩增效果良好。

3 讨论

徐艳春等^[2]用 Chelex2100 处理野生哺乳动物的

毛发制备 DNA, 但用此方法对毛囊细胞裂解不够彻底, 提取的基因组 DNA 杂质较多。栗磊等^[3]、杨胜利等^[4]和李军林等^[5]利用常规的酚-氯仿提取法从猪和朱鹮的毛囊中获得了较高质量的 DNA, 但提取的基因组 DNA 量都很少, 李军林等^[5]对于产量较低的样本需采用二次 PCR 才能获得高质量的 PCR 扩增效果。赵春江等^[6]利用 1~4 根猪毛的毛囊以常用的 PCR 缓冲液、MgCl₂ 溶液和蛋白酶 K 为裂解液, 在 PCR 仪上设置一个程序: 65 30 min, 95 15 min, 4 10 min, 而后瞬时离心 PCR 管, 上清液即可做 PCR 模板。但该方法从猪毛囊中提取的 DNA 不能长期保存, 且蛋白含量高, 极易影响后继的 PCR 扩增效率, 对 *Taq* 酶和引物要求均较高。

本研究在借鉴前人基因组 DNA 提取的各种方法的基础上, 结合酚-氯仿抽提法从耳组织和血液中提取基因组 DNA 的经验, 利用改进了的酚-氯仿法从猪的毛囊组织中快速(全过程 3 h 左右)提取不仅质量高而且总量多的基因组 DNA。与其他方法相比较, 本方法中有 3 点措施保证毛囊基因组快速、高质量提取效果: 一是本实验采用的裂解液体系和蛋白酶 K 结合可以很好的消化组织, 消化过程只需 1~2 h; 二是采用酚/氯仿/异戊醇(25: 24: 1)混合液提高抽提效果, 只抽提一次上清液即很澄清, 减少反复抽提导致的基因组 DNA 损失; 三是采用冰乙醇(异丙醇因其难挥发往往对后继操作有影响)来增加基因组 DNA 沉淀形成的效果, 并利用高速离心来收集形成的 DNA 沉淀。利用此方法可以很好的从 1 根香猪(可以推广到其他地方猪种)、6 根杜洛克或大约克生长猪毛囊组织中提取 A_{260}/A_{280} 介于 1.85~2.00、产量大于 4 μg 的基因组 DNA, 完全可以满足实验室常规的基于 PCR 的相关分子生物学实验。

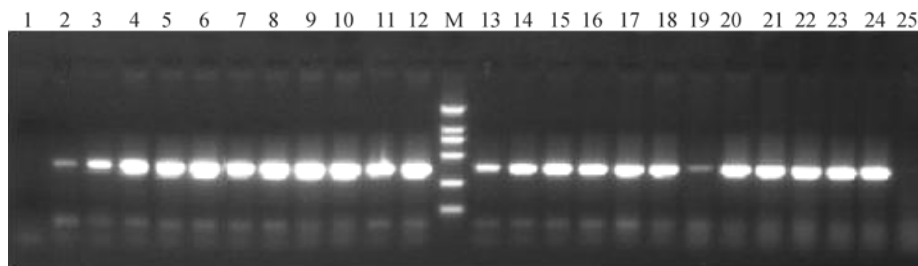


图 5 *FUT I* 基因 PCR 扩增电泳图

1~12: 6 根、12 根杜洛克和大约克样品组; M: DL2000 Marker; 13~24: 1、2、4 和 6 根香猪毛囊样品组(2、4 和 6 根毛囊为稀释后); 25: 阴性对照

不同品种和不同体重的猪毛囊组织大小有明显差异。本实验中猪毛囊组织来自于体重均在 50 kg 左右的成年香猪和杜洛克、大约克生长猪。若是用仔猪的毛囊组织提取基因组 DNA 则需根据毛囊大小相应调整毛囊的根数。对于育成猪或成年猪,无论是地方猪还是引进猪种,均可以利用本实验方法提取满足常规的基于 PCR 的相关分子生物学实验所需的基因组 DNA。

参考文献(References):

- [1] Vögeli P, Bertschinger HU, Stamm M, Stricker C, Hagger C, Fries R, Rapacz J, Stranzinger G. Genes specifying receptors for F18 fimbriated *Escherichia coli*, causing oedema disease and postweaning diarrhoea in pigs, map to Chromosome 6. *Anim Genet*, 1996, 27(5): 321-328.
- [2] 徐艳春, 马立新, 白素英. 应用 PCR 方法通过毛发进行哺乳动物性别鉴定. *东北林业大学学报*, 2000, 8(6): 72-77.
- [3] 栗磊, 王慧. 从动物毛发中提取 DNA 进行 RAPD 扩增的研究. *山东畜牧兽医*, 1999(2): 1-2.
- [4] 杨胜林, Surintorn Boon-anan-tanasarn. 不同数量猪毛中提取基因组 DNA 的比较. *山地农业生物学报*, 2005, 24(5): 457-459.
- [5] 李军林, 舒青, 蒙世杰, 秦鸿雁, 冯蕾. 非损伤性取样在朱鹮群遗传研究中的应用. *遗传*, 2001, 23(3): 217-219.
- [6] 赵春江, 李宁. 一种从毛发中提取 DNA 的简易方法. *遗传*, 2003, 25(1): 69-70.

• 综合信息 •

2010 年《遗传》作者须知

《遗传》的定位是反映中国遗传学原创性研究成果及国际遗传学进展的学报级中文生物学核心期刊, 中国精品科技期刊。“2009 年版中国科技期刊引证报告(核心版)”的数据显示,《遗传》的总被引频次为 1513 次, 生物学科排名第 13 位; 影响因子为 0.835, 生物学科排名第 10 位。

1. 报道范围: 遗传学、基因组学、发育生物学、生物进化、遗传工程及生物技术等领域有创新性的研究论文; 遗传学研究的新技术与新方法; 学科热点问题的专论与综述; 学术争鸣与讨论; 遗传学教学的经验体会; 国内外著名遗传学家介绍; 遗传咨询; 国内外学术会议信息等。

2. 稿件要求: 只接收中文稿件, 请附详细的中英文摘要。中英文题目应简洁明快; 名词术语规范; 使用法定的计量单位; 基因符号为斜体; 插图清晰, 表格为三线表; 图表随文排版, 按顺序编码制正确引用参考文献, 保留全部引文作者姓名。基金项目、图表和中文参考文献不必列出英文对照。全文通栏排版。

3. 送审标准: 只是利用 PCR 或同源克隆的方法研究基因表达的文章将不予接收, 须有基因功能方面的研究方可送审。一般不必在文中列出 PCR 检测的电泳图片。

4. 数据库收录: 《遗传》已被 20 余种国内外重要检索系统与数据库收录。新发表的文章将提交到《中国学术期刊光盘版》、《中国遗传网》等介质、媒体上长期全文发布; 文章摘要将被美国《医学索引》(MEDLINE)、《生物学数据库》、《化学文摘》、《俄罗斯文摘杂志》、《中国学术期刊文摘》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。作者的稿酬在《遗传》发表后一次性给付, 以后不再支付其他报酬。

5. 作者确认: 所投稿件是独立取得的原创性成果, 享有自主知识产权, 无抄袭问题; 未一稿两投; 相关数据、图表等结果未曾以各种文字在国内外公开发表过; 文章如在《遗传》发表, 将不再以任何语种向国内外其他刊物投稿; 作者之间无署名及排序纠纷, 学生投稿已征得导师同意, 而且无保密问题。

一旦发现学术不端问题出现, 编辑部将予以退稿或撤稿处理, 并公开曝光, 今后将不再接收该作者的稿件。

6. 投稿方式: 网上投稿和网上审稿。请登录《遗传》网站 <http://www.chinagene.cn>, 在“作者投稿查稿系统”注册后, 按提示步骤完成投稿。如 3 日后未收到投稿回执的, 请及时向编辑部发邮件查询(E-mail: yczz@genetics.ac.cn)。

7. 审稿流程: 收到稿件后, 由编辑部严格初审, 对于学术水平和写作格式未达到本刊要求的及时退稿。经审查录用的稿件, 由编辑部加工和英文编辑润色后, 及时发给作者修改定稿。修订稿及时在本刊网站的“最新录用”栏目全文发布。排版打印后返给作者校读清样, 必须全部作者在《版权转让协议》上签名方可发表。本刊开辟绿色通道, 重大成果的研究论文收稿 3 个月内优先刊出。

8. 稿件费用: 本刊不收取审稿费与彩版费。寄清样时通知作者交纳版面费, 每页 300 元, 稿酬每页 70 元。

《遗传》编辑部
2010 年 1 月 15 日