

一种提取眼点拟微球藻(*Nannochloropsis oculata*) DNA 的简便方法^{*}

张继民¹ 杨官品² 张学成^{2**}

(¹ 国家海洋局北海监测中心 青岛 266033)

(² 中国海洋大学生命学院 青岛 266003)

提要 用氯化锂法从眼点拟微球藻(*Nannochloropsis oculata*) 中提取 DNA 并对其提取条件进行了优化。新鲜藻细胞在提取液(0.6 mol/L LiCl, 0.8% Sakosyl, 20 mmol/L EDTA(pH8.0), 0.4% PVP, 10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 5%β-巯基乙醇) 中经过 55℃温育 30 min, 每 mg 鲜藻可提取 20~40 ng DNA, 提取的 DNA 分子量在 23 kb 左右, 可用于 PCR、限制性酶切等。

关键词 DNA 提取, 眼点拟微球藻(*Nannochloropsis oculata*), 氯化锂

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003) 09-0058-03

分子生物学研究要求高分子量和高纯度的 DNA, 而目前微藻 DNA 的提取还缺少理想的方法。DNA 的提取需要细胞的破碎并使 DNA 与其它成份分离。从绿藻、红藻和褐藻中提取 DNA 的方法需要液氮研磨, 造成大量的粘性多糖被释放, 妨碍 DNA 分离^[1, 2, 3]。微藻的藻细胞直径只有几个 μm, 也含有糖和酚类物质, 因此不宜用液氮研磨, 经典方法如 CTAB、氯化铯密度梯度离心也难以克服粘性多糖的影响。眼点拟微球藻(*Nannochloropsis oculata*) 在分子生物学上的研究还处于空白阶段, 用经典方法提取其 DNA 较繁琐且效果不佳。参照 Yong Ki Hong 等的方法, 我们用 LiCl 提取液提取眼点拟微球藻 DNA, 并对其提取条件进行了优化, 为以后的研究打下基础。该方法不用液氮研磨、CTAB 和氯化铯密度梯度离心, 简单易行, 提取的 DNA 可用于 PCR 扩增和限制性酶切反应等。

1 材料和方法

1.1 实验材料

眼点拟微球藻(*Nannochloropsis oculata*), 为本实验室保存。

1.2 实验方法

实验方法参照文献[4]并作了改进。离心收集 250 mL 对数中期的藻细胞, 按 4 mL/g 加入湿藻泥提取液(0.6 mol/L LiCl, 0.8% Sakosyl, 20 mmol/L EDTA(pH8.0), 0.4% PVP, 10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 5%β-巯基乙醇), 55℃处理 30 min, 每 10 min 晃动一次,

然后 4℃冷却, 置摇床上摇动 60 min, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 用等体积的酚/氯仿(1:1)、氯仿/异戊醇(24:1)各抽提一次, 10 000 r/min 离心 10 min, 小心吸取上清, 加入 RNAase 和蛋白酶 K 消化, 37℃保育 1 h, 加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)抽提 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 小心吸取上清, 然后加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH5.2) 和 2 倍体积的预冷无水乙醇, -20℃放置 2 h 以上, 12 000 r/min 离心 15 min, 去上清, 沉淀用 70% 的乙醇洗涤 2 次, 离心, 沉淀用 50 μL TE(pH8.0) 悬浮。取 1 μL 用 Hoefer DNA Quant 200 进行 DNA 定量。另取 10 μL 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段的大小。实验重复两次, 结果取两者平均值。

2 结果

当 LiCl 的浓度在 0.6~0.8 mol/L 时, 每 mg 湿藻泥提取的 DNA 量达到 45.56 ng, 低于或高于此浓度, DNA 提取的量都下降, 在缺少 LiCl 的条件下, 仅能提

^{*} 国家“863”计划项目 819-02-01 号。

第一作者: 张继民, 出生于 1976 年, 硕士, 现从事海洋环境监测与评价。

^{**} 通讯联系人, E-mail: xczhang@ouqd.edu.cn, 电话: 0532-2032789。

收稿日期: 2001-07-31; 修回日期 2001-11-20

研究报告 REPORTS

取少量的 DNA(见图 1); EDTA 的浓度在 20 mmol/L 时,提取的 DNA 量较大;在缺少 EDTA 的条件下,藻细胞 DNA 的提取量明显减少(见图 2);提取液中 PVP 的浓度在 0.4%、Sarcosyl 在 0.8% 时, DNA 提取的量较大并且基本维持不变(见图 3、4);热处理时间在

20~50 min 时, DNA 提取量最多,不经过热处理藻细胞仅提取少量的 DNA(见图 5);而缓冲液 Tris-HCl (pH8.0) 的存在(见图 6, 8)和 β -巯基乙醇的含量对 DNA 量的影响基本不大(见图 7)。提取的 DNA 分子大小在 23kb 左右并以其为模板进行 PCR 反应(引

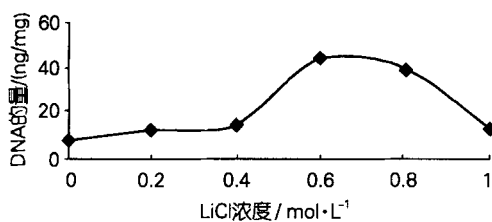


图 1 LiCl 的浓度对 DNA 提取量的影响
Fig.1 Effects of LiCl concentration on DNA yield

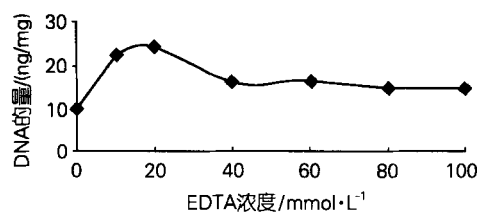


图 2 EDTA 的浓度对 DNA 提取量的影响
Fig.2 Effects of EDTA concentration on DNA yield

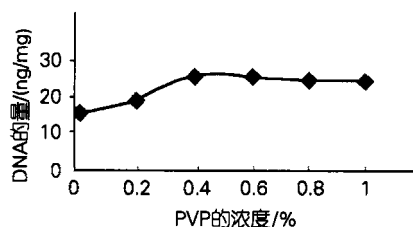


图 3 PVP 的浓度对 DNA 提取量的影响
Fig.3 Effects of PVP concentration on DNA yield

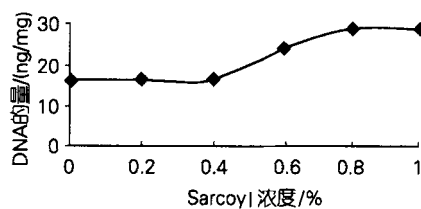


图 4 Sarcosyl 的浓度对 DNA 提取量的影响
Fig.4 Effects of Sarcosyl concentration on DNA yield

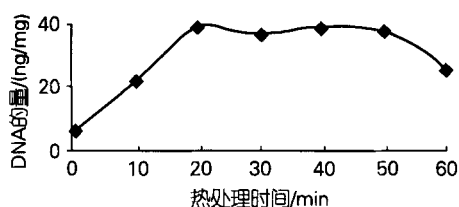


图 5 热处理时间对 DNA 提取量的影响
Fig.5 Effects of heating treatment time on DNA yield

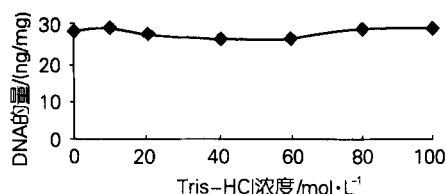


图 6 Tris-HCl 的浓度对 DNA 提取量的影响
Fig.6 Effects of Tris-HCl concentration on DNA yield

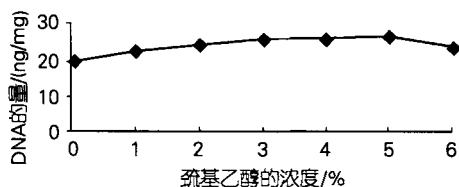


图 7 β -巯基乙醇浓度对 DNA 提取量的影响
Fig.7 Effects of β -mercaptoethanol concentration on DNA yield

物 P1 > GCTTCATCATCGCTTTCATCG, P2 > CTTCCTACG TAAATCAGCACGG), 扩增出的片段在 900 kb 左右, 并对该片段进行测序分析, 结果表明其为叶绿体 psbA 基因的一部分。利用限制性内切酶 EcoRI 对提取的 DNA 进行了酶切, 电泳结果显示还可以(图 9)。

3 讨论

LiCl 中的金属锂离子能够使墨角藻 (*Fucus*) 组织中的褐藻酸胶溶解性增加, 变软^[5]; 使紫菜 (*Porphyra*) 的



图8 不同 Tris-HCl 浓度下 DNA 图谱

Fig.8 Map of Tris-HCl concentration on DNA yield

M: λ DNA/EcoR; 1、2、3、4、5、6、7 分别为 0、10、20、40、60、80、100 mmol/L

M: λ DNA/EcoR; 1、2、3、4、5、6 和 7 represent 0、10、20、40、60、80、100 mmol/L, respectively



图9 酶切结果

Fig.9 Result of EcoRI digestion

1:提取 DNA/EcoRI; M: λ DNA/EcoR

1:EcoRI digestion of DNA; M: λ DNA/EcoR

紧密组织变软,从而使 DNA 释放出来^[6]。对于紫菜属的 *Porphyra perforata* 来说,当藻细胞经过液氮处理研磨后,大量的粘性多糖释放了出来,使得 DNA 提取纯化烦琐并且效果不佳,而 LiCl 能够基本避免粘性多糖的释放,使 DNA 提取方法简单化^[4],LiCl 使眼点拟微球藻细胞的 DNA 释放也证实了这一点,但是它作用于藻细胞的具体机理有待于进一步研究。提取植物细胞 DNA 时,为了除去酚类物质和 DNAase 的降解,提取液中需要加入一定浓度的 PVP 和 EDTA。PVP 与酚类物质结合,经过离心后就可以有效除去,而 EDTA 可以整合 DNAase 活性必需的一些金属离子,如 Mg^{2+} 等,从而基本上避免 DNA 的降解,保持 DNA 分子提取的完整性。Sarcosyl 是一种阴离子去污剂,使细胞膜破裂、蛋白质变性及蛋白质聚合体解离,能够更好地使细胞释放出 DNA。藻细胞在 55℃ 处理 30 min 后,再在 4℃ 经过温差处理,细胞更易破裂,更有利于提取 DNA,而没有经过此温差处理的细胞在其它条件相同时,仅释放出极少量的 DNA。Tris-HCl(pH8.0) 和 β -巯基乙醇的存在与否对 DNA 提取的量影响不大,不过 Tris-HCl(pH8.0) 是分子生物学实验中常用的一种缓冲液,对维持 pH 值至关重要,保持 DNA 分子提取的完整性;而 β -巯基乙醇作为一种还原剂可以减少 DNA 的降解。因此提取液中含有这些成份也是必要的。

4 结论

由于陆生高等植物和海洋藻类细胞壁结构组成和化学成份存在较大差异,一些用于提取陆生高等植

物 DNA 的经典方法如 CTAB 法不适用微藻细胞 DNA 的提取,且氯化铯密度梯度离心等对普通实验室来说并不具备。用 LiCl 法从眼点拟微球藻中提取 DNA 是个简便而经济的方法,其最佳提取液是: 0.6 mol/L LiCl, 0.8% Sakosyl, 10 mmol/L EDTA(pH8.0), 0.4% PVP, 20 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 5% β -巯基乙醇。

参考文献

- 1 Roell M K, Morse D E. Fraction of nuclear, chloroplast, and mitochondrial DNA from *Polysiphonia boldii* (Rhodophyta) using a rapid and simple method for the simultaneous isolation of RNA and DNA. J Phycol, 1991, 27: 299-305
- 2 Patwary M U, Mackay R M. Revealing genetic markers in *Gelidium vagum* (Rhodophyta) through the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. J Phycol, 1993, 29: 216-222
- 3 Mayes C, Saunders G W, Tan I H. DNA extraction methods for kelp (Laminariales) tissues. J Phycol, 1992, 28: 714-716
- 4 Yong-Ki Hong, Sang-Dal Kim, Miriam Polne-Fuller and Aharon Gibor. DNA extraction conditions from *Porphyra perforata* using LiCl. Journal of Applied Phycology, 1995, 7: 101-107
- 5 Evans L V. The use of lithium chloride as a pretreatment to an acetocarmine technique on *Fucus*. Phycologia, 1963, 2: 187-195
- 6 Yong-Ki Hong, Daniel A. Coury, Miriam Polne-Fuller and Aharon Gibor. Lithium Chloride extraction of DNA from the seaweed *Porphyra perforata* (Rhodophyta). J Phycol, 1992, 28: 717-720

(下转第 77 页)

(上接第 60 页)

A SIMPLE METHOD FOR THE DNA EXTRACTION OF *Nannochloropsis oculata*

ZHANG Ji-Min¹ YANG Guan-Pin² ZHANG Xue-Cheng²

(¹ North China Sea Monitoring Center, SOA, Qingdao, 266033)

(² College of Marine Life, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Received: July, 31, 2001

Key Words: DNA extraction, *Nannochloropsis oculata*, LiCl

Abstract

A rapid and simple method for DNA extraction from microalgae *Nannochloropsis oculata* using LiCl has been developed and optimized. Treating fresh algae in a solution containing 0.6 mol/L LiCl, 0.8 % Sarkosyl, 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.4 % PVP, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 5 % β -mercaptoethanol at 55 °C for 30 minutes can extract 20 ~ 40 μ g DNA from one gram fresh algae. The DNA is qualified as the PCR template amplification and the substrate of Restriction Endonuclease. The DNA is about 23 kb in length determined by agarose gel assays. (本文编辑:张培新)