

单条固定线虫基因组 DNA 提取及 18S rRNA 基因 PCR 扩增

沈锡权, 杨官品, 廖梅杰

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 根据线虫 18S 核糖体 RNA 基因 PCR 扩增效果比较了丙酮、乙醇、乙醇 + 0.05 mol/L EDTA(pH8.0) 和 5% 海水福尔马林 4 种固定剂, 碱裂解和蛋白酶 K 处理 2 种单条线虫基因组 DNA 提取方法的优劣。用乙醇固定的样品最适合制备 PCR 模板 DNA, 而 5% 海水福尔马林固定的样品能最完整地保持样品形态。蛋白酶 K 处理获得的 DNA 较碱裂解获得的更适合 PCR 扩增。结果有助于分子生物学方法在海洋线虫分类、多样性和生态学研究中的应用。

关键词: 线虫; 固定; 基因组 DNA; 18S 核糖体 RNA 基因

中图分类号: **文献标识码:**A **文章编号:** 1000-3096(2005)05-0033-04

环境变化会影响动植物、微生物物种的组成及群落结构^[1-3]。从生物学角度研究环境问题, 就是描述生物种类、丰度及其变化以及这些变化与环境因子的关系, 并根据这种关系监测、预测环境变化。线虫对环境变化敏感, 分布广泛, 是一种很好的环境指示生物。从基因组测序^[4]到基因功能解析^[5], 国内外已经从不同角度对线虫进行了研究。例如, 已经根据核糖体 RNA 基因序列建立了线虫系统学关系^[6], 已在线虫分类学^[7]中引入了 DNA 序列信息^[8-9]。但是, 线虫多样性研究主要依据形态结构^[10-12], 依赖研究者经验, 数据比较与整合困难。

结合形态特征, 根据指示基因序列信息鉴定种

类、剖分群落结构对海洋线虫多样性及其与海洋环境关系的研究具有重要意义。作为获取指示基因序列的基础, 作者报道了单条固定线虫基因组 DNA 的分离及 18S 核糖体 RNA 基因的 PCR 扩增方法。

1 材料与方法

1.1 取样与样品固定

于 2003 年夏季取青岛湾东侧潮间带泥沙装瓶, 带回实验室, 分别用等体积的丙酮、乙醇、乙醇 + 50 mmol/L EDTA(pH8.0) 和 5% 海水福尔马林等 4 种固定剂固定。线虫 18S 核糖体 RNA 基因不同区域扩增引物见表 1。固定样品于室温保存。

表 1 线虫 18S 核糖体 RNA 基因扩增引物

Tab.1 Primer pairs used for the amplification of different fragments of nematode 18S ribosomal RNA gene

引物名*	引物位置**	引物序列(5'→3')	长度
SSUG18S4	5' end	GCTTGCTCTCAAAGATTAAGCC	21
SSU22R	429-411	GCCTGCTGCCTTCCTTGGA	19
SSU 9R	584-565	AGCTGGAATTACCGCGGCTG	20
SSU26R	927-907	CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG	21
SSU23R	1 298-1 280	TCTCGCTCGTTATCGGAAT	19
SSU13R	1 438-1 419	GGGCATCACAGACCTGTTA	19
SSU18P	3' end	TGATCCWKCYGCAGGTTACAC	20

注: * SSUG18S4、SSU18P 是真核生物通用引物, 其它为线虫特异引物; 带 R 的引物和 SSU18P 为反向引物。* * 在 *Caenorhabditis elegans* 核糖体 RNA 基因(X03680)上位置。

1.2 单条线虫基因组 DNA 分离

将固定样品转移至 1 000 mL 量筒内, 加自来水至 800 mL, 加盖后颠倒摇动数次并静置 1~3 min (视颗粒组成而定)。将上层水倒入分离筛(孔径 0.055 mm), 用

收稿日期: 2004-06-11; 修回日期: 2004-12-20
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40176028)
作者简介: 沈锡权(1980-), 男, 在读硕士生, 主要从事海洋线虫多样性、海洋线虫分子生态学研究, E-mail: yguanpin@mail.ouc.edu.cn.

水冲洗分离筛上的残余物,最后用 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)冲洗。将残余物转移到 TE 缓冲液中,室温浸泡过夜(8 h 以上)。冲洗福尔马林固定样品时,TE 缓冲液中需要补充 100 mmol/L 甘氨酸和 0.05% SDS。

• 用 2 种方法制备单条固定线虫基因组 DNA。(1) 碱裂解法。在解剖镜下挑取单条线虫,与 20 μ L 0.25 mol/L NaOH 混合,离心使线虫完全被溶液浸没;25 $^{\circ}$ C 温育过夜(≥ 8 h),99 $^{\circ}$ C 加热 3 min(干浴或 PCR 仪上进行),冷却至室温,简单离心集中液体;依次加入 4 μ L 1 mol/L HCl, 10 μ L 0.5 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)和 5 μ L 2% (V/V) Triton X-100,混匀并离心,再次在 99 $^{\circ}$ C 加热 3 min,冷却至室温^[13]。制备的基因组 DNA 为单链 DNA, pH 值在 8 到 9 之间,可直接用于 PCR 扩增反应。(2)蛋白酶 K 法。挑取单条线虫,转移到预先加有 20 μ L ddH₂O 的离心管中,-84 $^{\circ}$ C 冷冻过夜,室温融化后加入 2 μ L 10 倍 PCR 缓冲液和 2 μ L Protease K (20 mg/mL),混合并简单离心以集中液体,55 $^{\circ}$ C 温浴 2~3 h,95 $^{\circ}$ C 30 min^[14,15]。制备的基因组 DNA 直接用于 PCR 扩增反应。

1.3 18 S 核糖体 RNA 基因片段的 PCR 扩增

针对不同固定方法和 DNA 制备方法获得的模板 DNA,优化 PCR 反应体系中 Mg^{2+} 浓度,发现用经碱裂

解制备的 DNA 作 PCR 模板,最佳 Mg^{2+} 浓度为 4 mmol/L,而经蛋白酶 K 处理制备的 DNA,最佳 Mg^{2+} 浓度为 1 mmol/L。另外,分别用 2 μ L 碱裂解制备的 DNA 和 1 μ L 蛋白酶 K 处理制备的 DNA 模板,可获得最佳扩增效果。最佳 Mg^{2+} 浓度和最佳底物浓度是根据最短片段(SSUG18S4/SSU9R 引物组合)确定的。PCR 反应体系总体积 25 μ L,除 Mg^{2+} 和模板 DNA 外,反应体系中还含有 dNTP 200 μ mol/L(每种),正、反向引物各 0.2 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 1 单位和 1 倍缓冲液。循环条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 4 min 接 94 $^{\circ}$ C 1 min、58 $^{\circ}$ C 1 min 20 s、72 $^{\circ}$ C 2 min 35 个循环再在 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 min。扩增产物与 100 bp DNA Ladder IV 分子量标准一起,经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳记录结果。

2 结果与分析

新鲜样品用碱裂解和蛋白酶 K 制备 DNA,均能扩增出 1.7 kb 左右近全长的 18S 核糖体 RNA 基因片段。但是,为了适应野外规模取样和实验室大规模分析需要,作者仍用 4 种试剂对样品进行了固定,并在室温保存 5 个星期后,用 2 种方法制备了基因组 DNA。固定和 DNA 提取两步共有 8 种组合,提供了 8 种模板 DNA。用建立的 PCR 扩增体系扩增不同长度的核糖体 18S 核糖体 RNA 基因片段,结果如图 1 所示。

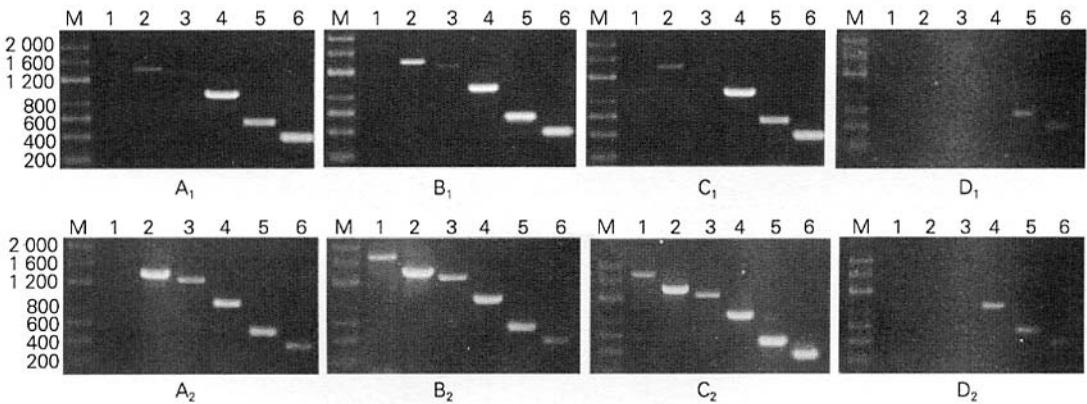


图 1 从 4 种固定方法和 2 种 DNA 分离方法共 8 种组合获得的模板 DNA 进行 18S 核糖体 RNA 基因不同长度片段扩增的情况

Fig. 1 18S ribosomal RNA gene fragments amplified from 8 DNA templates corresponding to 8 combinations of 2 extracting methods and 4 fixing methods

A、B、C 和 D 分别为丙酮、乙醇、乙醇 + 0.05 mmol/L EDTA(pH8.0)和 5% 海水福尔马林固定样品,下脚标 1 和 2 分别表示碱裂解法和蛋白酶 K 法。引物组合及其扩增片段长度分别为 SSUG18S4/SSU18P, 约 1 700 bp(1); SSUG18S4/SSU13R, 约 1 440 bp(2); SSUG18S4/SSU23R, 约 1 300 bp(3); SSUG18S4/SSU26R, 约 930 bp(4); SSUG18S4/SSU9R, 约 600 bp(5); SSUG18S4/SSU22R, 约 430 bp(6)。

A, B, C and D are samples fixed in acetone, absolute alcohol, alcohol with 0.05mmol/L EDTA (pH8.0) and 5% formalin in seawater respectively, footnotes 1 and 2 indicate 2 DNA extracting methods, alkaline lysis and protease K treatment respectively. Primer pairs and the fragment lengths they amplified are as follows: SSUG18S4/SSU18P, about 1 700 bp (lane 1); SSUG18S4/SSU13R, about 1 440 bp (lane 2); SSUG18S4/SSU23R, about 1 300 bp (lane 3); SSUG18S4/SSU26R, about 930 bp (lane 4); SSUG18S4/SSU9R, about 600 bp (lane 5); SSUG18S4/SSU22R, about 430 bp (lane 6)。

根据 PCR 扩增带长度和产量(带亮度)判定固定方法和 DNA 提取方法的优劣。A₁D 分别为 4 种样品固定方法,而下脚标 1、2 分别代表 2 种 DNA 提取方法。A₁D₁、A₂D₂ 表示 4 种固定方法和 2 种 DNA 提取方法的 8 种组合。作者发现用蛋白酶 K 法提取的 DNA 作模板,PCR 扩增效果好于碱裂解法。同一固定方法比较,蛋白酶 K 处理提取的 DNA,PCR 扩增带的亮度要强于碱裂解提取的 DNA。从 PCR 片段长度看,乙醇和乙醇 + 0.05 mol/L EDTA(pH8.0) 固定的样品用蛋白酶 K 法提取 DNA 能扩增更长的片段。

从乙醇、乙醇 + 0.05 mol/L EDTA(pH8.0) 和丙酮固定的线虫提取的 DNA,PCR 扩增效果都比较好。在保存 5 周后,用蛋白酶 K 处理提取基因组 DNA,从乙醇固定和乙醇 + 0.05 mol/L EDTA(pH8.0) 固定的样品能获得 1.7 kb 左右近全长的线虫 18S rRNA 基因片段(图 1, B₂ 和 C₂),条带比较清晰明亮;而用碱裂解制备的 DNA,只从乙醇固定样品获得了 1.7 kb 片段(B₁和 C₁)。从丙酮固定样品能获得 1.4 kb 片段(A₁、A₂)。从乙醇、乙醇 + 0.05 mol/L EDTA(pH8.0) 固定样品虽然能获得最长、最亮的片段,但 2 种固定方法在维持线虫形态方面较丙酮和福尔马林差^[16]。在乙醇中加入 EDTA,是为了用 EDTA 来螯合金属离子从而抑制核酸酶的活性,但效果并不十分明显。因此,作者认为在短时间内用乙醇固定线虫比较好,但既能满足分子生物学方法的需要,又能最大限度地维持形态结构的线虫长时间保存方法还需进一步研究。

福尔马林的化学成份为甲醛 36%、甲醇 8% ~ 12%、游离酸 0.02%,还有极少量的氯化物、硫酸盐、重金属和铁。用于保存生物标本的福尔马林浓度一般为 5% ~ 10%,所保存的生物标本的一般形态结构被较好地固定,但对生物大分子是否被破坏的问题研究得较少。甲醛在空气中易氧化成甲酸,而甲酸对 DNA 有较强的降解作用。研究发现,DNA 的降解程度与标本的保存质量密切相关,凡是用玻璃瓶装且密封好的标本所提取的 DNA 较为完整^[17]。本实验用 5% 海水福尔马林瓶装且密封保存线虫 5 个星期。发现其保存的线虫形态在 4 种保存液中是最好的,但从 2 种 DNA 提取方法获得的模板 DNA 扩增出的 DNA 片段都最短。这可能是由于提取 DNA 方法太过剧烈使核酸分子遭到破坏。另外,甲醛溶于水可以生成水合甲醛而且反应是可逆的。所以,用水冲洗样

品始终有部分甲醛残留在标本中,对下一步实验造成障碍。在洗涤液中加入 EDTA 和甘氨酸,其自由基团能与甲醛相结合,在一定程度上能够消除甲醛的影响。

在生物材料中,DNA 容易被其体内的酶,如核酸酶、过氧化物酶等,所降解。即使这些酶没有活性,DNA 也会因为水解、氧化等因素自动降解。有机溶剂大多能保存生物样品 DNA。这可能是因为有机溶剂一方面能快速地使组织和细胞内的酶类失活、变性,另一方面有机溶剂又能使生物材料脱水防止水解。因此,为提高保存效果,应尽量使保存液中少混入水分。更新保存液也能降低含水量。

2 种制备方法获得的基因组 DNA 都能直接用于 PCR 反应。作者所扩增的是高拷贝的 18S rRNA 基因,没有试验单拷贝基因,因此,制备的 DNA 是否适用单拷贝基因的扩增要进一步分析。蛋白酶 K 处理提取基因组 DNA,简单、快速,结合乙醇(或丙酮)固定、室温保存,作者建立的方法适用远程取样和规模分析,为用分子生物学方法进行海洋线虫分类、多样性和生态学研究奠定了基础。值得说明的是分子生物学方法的应用需要传统分类学做基础。如何在取得分子生物学数据的同时获得形态学数据或进行分类鉴定,也就是如何将分子生物学方法与形态鉴定相结合,同步获得形态分类数据和基因序列数据还需要深入细致的研究。

参考文献:

- [1] Parmesan C, Yohe G. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across nature systems[J]. *Nature*, 2003, 421: 37-42.
- [2] Root T L, Price J T, Hall K R, *et al.* Fingerprints of global warming on wild animals and plants[J]. *Nature*, 2003, 421: 57-60.
- [3] Zingone A, Oksfeldt - Eneroldsen H. The diversity of harmful blooms: a challenge for science and management[J]. *Ocean and Coastal Management*, 2000, 43: 725-748.
- [4] The C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode C. elegans: A platform for investigating biology[J]. *Nature*, 1998, 282: 2 012-2 018.
- [5] Kamath R S, Fraser A G, Dong Y, *et al.* Systematic functional analysis of the Caenorhabditis elegans genome using RNAi[J]. *Nature*, 2003, 421: 231-237.
- [6] Blaxter M L, De Ley P, Garey J R. A molecular evolutionary framework for the phylum nematoda[J]. *Nature*, 1998,

- 392: 71 – 75.
- [7] Floyd R M, Abebe E, Papert A. Molecular barcodes for soil nematode identification[J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11: 839 – 850.
- [8] Dorris M, De Ley P, Blaxter M L. Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism[J]. *Parasitology Today*, 1999, 15: 188 – 193.
- [9] Platt H M, Warwick R M. Free – living Marine Nematodes [M]. Cambridge, London: Cambridge University Press, 1983.
- [10] 张志南, 周 红, 郭玉清, 等. 黄河口水下三角洲及其临近水域线虫群落结构的比较研究[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32: 436 – 444.
- [11] 张志南, 周 红, 慕芳红. 渤海线虫群落结构的多样性及中性模型分析[J]. 生态学报, 2001, 21: 1808 – 1814.
- [12] Lamshead P J D, Tietjen T, Glover A. Impact of large scale natural physical disturbance of the diversity of deep – sea North Atlantic nematodes[J]. *Marine Ecology*, 2001, 214: 121 – 126.
- [13] 杨官品, 朱艳红, 李志岗. 土壤细菌基因资源的直接分离—16S核糖体RNA基因模式[J]. 湖北大学学报, 1998, 20(4): 383 – 385.
- [14] 赵春江, 李 宁. 一种从毛发中提取DNA的简易方法[J]. 遗传, 2003, 25(1): 69 – 70.
- [15] Kim J, Chae C. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus2 DNA from formalin – fixed paraffin – embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with *in situ* hybridization [J]. *Journal of Virological Methods*, 2001, 92: 105 – 111.
- [16] Fukatsu T. Acetone preservation: a practical technique for molecular analysis [J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 1935 – 1945.
- [17] 徐来祥, 张知彬, 宋铭晶, 等. 福尔马林保存的动物标本基因组DNA的提取方法[J]. 动物学报, 2002, 48(2): 264 – 269.

Isolation of fixed nematode individual genomic DNA and amplification of 18S ribosomal RNA gene fragments

SHEN Xi – quan, YANG Guan – pin, LIAO Mei – jie
(College of Marine Life Sciences, Qingdao 266003, China)

Received: Jun., 11, 2004

Key words: nematode; fixation; genomic DNA; 18S ribosomal RNA gene

Abstract: Based on the lengths and yields of PCR products, eight template DNAs were isolated from marine nematode individuals and stored respectively in four fixing solutions (acetone, absolute alcohol, alcohol with 0.05 mol/L EDTA (pH8.0) and 5% formalin in seawater) using two different genomic DNA isolation methods (alkaline lysis and protease K treatment) were compared for their performances in the amplification of 18s ribosomal RNA gene fragments. It was found that absolute alcohol is the best fixing solution for preparing PCR template DNA, and 5% formalin in seawater is the best for keeping morphological characters of nematode individuals. The genomic DNA isolated with protease K treatment was better for PCR amplification than that isolated with alkaline lysis. Our results would help approach to taxonomical and ecological studies of free – living marine nematode.

(本文编辑:张培新)