

蜘蛛基因组 DNA 提取方法的比较*

童丽娟 王亚军 潘志崇 孙彩霞 张永靖

(宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

摘要: 分别用 SDS 法、SK251 基因组 DNA 小量抽提试剂盒法、自制试剂盒法,对蜘蛛组织的基因组 DNA 进行了提取。经比较,自制试剂盒法为提取蜘蛛基因组 DNA 最简便而又有效的方法。

关键词: 基因组 DNA; DNA 提取; 蜘蛛

中图分类号: Q81 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)06-53-03

Comparative Study of Methods for the Isolation of Spiders' Genomic DNA

TONG Li-Juan WANG Ya-Jun PAN Zhi-Chong SUN Cai-Xia ZHANG Yong-Jing

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University Ningbo 315211, China)

Abstract: This paper compares the effectiveness of three methods for extraction the genomic DNA from spiders' organs; the SDS method, SK251 genomic DNA minipreps kit method and self-made kit methods. The results show that compared to the other two methods, the self-made kit method was one of the most convenient and effective of the methods tested.

Key words: Genomic DNA; DNA Extraction; Spiders

蜘蛛是一类捕食性的节肢动物,主要捕食昆虫,它们在农田害虫的生物防治、维护生态系统的平衡中起着非常重要的作用。调查研究农田蜘蛛群落中捕食能力有差异但形态特征相似的群体,用分子标记的方法找出其种特异性的标记,以便筛选出抗逆性和捕食能力强的种群。

近年来,国内外有关昆虫 DNA 分子的研究已涉及到瓢虫、蚊、蝗虫、蟋蟀等一些昆虫^[1,2],但对蜘蛛基因组 DNA 提取的研究报道还比较少^[3],本文以农田害虫的天敌——蜘蛛为实验材料,对蜘蛛基因组 DNA 的提取方法进行了初步研究,为深入研究蜘蛛的 DNA 分子提供参考,同时也为蜘蛛的种类鉴定提高到分子水平和未来在生态农业中发挥作用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料和试剂 沟渠豹蛛(*Pardosa laura*)采自宁波大学周围农田,个小且为活体。

SK251 基因组 DNA 小量抽提试剂盒和 SDS 法试剂

购自上海生物工程公司;自制试剂盒由宁波大学海洋生物工程实验室提供。其中 SDS 法的试剂配制及实验方法参见文献[4~6]。

1.2 方法 取活体沟渠豹蛛附肢肌肉三份各 10 mg,在冰上迅速剪碎后,分别放入三种不同 DNA 提取方法的裂解液中。

1.2.1 SDS 法

1)将已迅速剪碎的样品组织放入已预冷的装有 400 μ l 裂解液(NaCl 100 mmol/L; Tris-HCl 10 mmol/L; EDTA 50 mmol/L; SDS 0.5%; 蛋白酶 K 100 μ g; 0.2% 巯基乙醇)的 1.5 ml eppendorf 管中,混匀。

2)置 65 $^{\circ}$ C 水浴中处理 15 min, 1 200 r/min 离心 10 min。

* 浙江省教委资助项目(No. 19990222);

第一作者介绍 童丽娟,女,33岁,实验师;主要从事生化、分子生物学实验工作。

收稿日期:2001-10-08,修回日期:2002-03-15

3)取上清液,加入 150 μl 饱和 NaCl 混匀,10 000 r/min 离心 10 min。

4)取上清液加入异丙醇,沉淀 DNA,置 -20°C 冰箱 20~30 min,10 000 r/min 离心 5 min,沉淀用 70% 酒精冲洗,空气干燥后,加入 500 μl TE 溶解。

5)加入 3~8 μl RNaseA,在 37°C 水浴中处理 30 min。

6)加入 500 μl 酚:氯仿:异戊醇(50:49:1),10 000 r/min 离心 10 min。取上清液加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),10 000 r/min 离心 10 min。重复抽提,直至界面无白色沉淀为止。

7)取上清液,加入 1/3 体积 NaAc,混匀后,加入 2 倍预冷冰乙醇,置 -20°C 处理 20~30 min,12 000 r/min 离心 5 min,去上清液。用 70% 酒精冲洗沉淀物,空气干燥。沉淀用适量 TE 溶解,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

1.2.2 SK251 基因组 DNA 小量抽提试剂盒法

1)将已剪碎的样品组织加入到 150 μl TE 和 400 μl 裂解液中,同时加入 60 μg Proteinase K,置 55°C 水浴 30~50 min,至溶液变清为止。

2)加入 600 μl 酚:氯仿:异戊醇(50:49:1)混匀,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液。

3)加入 500 μl Precipitation solution,混匀,10 000 r/min 离心 10 min,去上清液。

4)加入 100 μl 1.2 mol/L NaCl 溶解沉淀物;加入 30 μg RNaseA,置 55°C 水浴 10 min。

5)加入 3 倍体积冰乙醇沉淀 DNA,置 -20°C 冰箱 20~30 min,然后 10 000 r/min 离心,去上清液。

6)加入 70% 酒精 300 μl 洗涤沉淀,稍干后,加入适量 TE 溶解,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

1.2.3 自制试剂盒法

1)将已剪碎的样品组织加入到装有 200~400 μl 裂解液中混匀,再加入 RNaseA 10~20 μg 和 Proteinase K 20~40 μg ;置 65°C 水浴中,至溶液变清(约 10~30 min)。

2)10 000 r/min 离心 20 s,取上清液,加入 400 μl 亲和剂和 20 μl 吸附剂,轻轻混匀 5~10 min 后,6 000 r/min 离心 10 s,去上层液体。

3)沉淀中加入 500 μl 洗涤液,并混匀,8 000 r/min 离心 10 s,去上清液。重复洗涤一次。

4)沉淀在 65°C 水浴中干燥 5~10 min,加适量 TE 溶解,置 50~ 65°C 水浴中 5~10 min,1 2000 r/min 离心 10 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

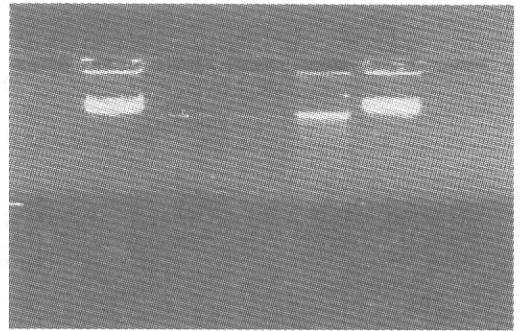
1.3 DNA 浓度和纯度检测 为了有利比较,把以上三种方法提取的样品 DNA 用 40 μl TE 溶解,然后各取 10 μl 进行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳。电压 60~80 V,室温下电泳 1~1.5 h,EB 染色,紫外透射分析仪检测并拍照,

用 Kadak 公司的凝胶分析软件 KDS1D120 检测 DNA 含量。

1.4 DNA 酶切检测 三种样品 DNA 都用 *Taq* I 内切酶酶切。酶切反应体积为 20 μl ,*Taq* 酶 10 U,DNA 样品若干微升,混匀,然后在 65°C 水浴中温育 2 h,1.5%~2.0% 琼脂糖凝胶电泳,紫外透射分析仪检测并拍照。

2 结果与讨论

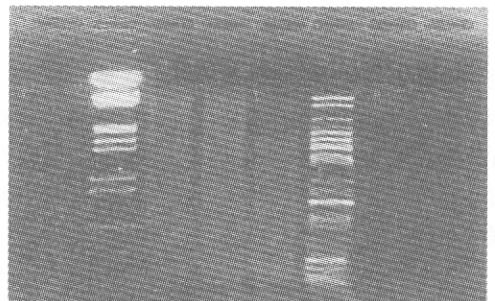
三种不同提取方法所需的蜘蛛样品组织用量均在 10 mg 左右,适用提取小个体蜘蛛的 DNA。图 1 列举了 3 种不同方法提取的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图。



M 1 2 3 M

图 1 三种不同方法提取的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

M. λ DNA; 1. SDS 法; 2. SK251 试剂盒法; 3. 自制试剂盒法



M 1 2 3 4

图 2 DNA *Taq* I 酶切结果

M. λ DNA [*Eco*R I/*Hind* III]; 1. SDS 法; 2. SK251 试剂盒法; 3. 自制试剂盒法; 4. λ DNA

从图 1 可以看出,三种不同方法提取的 DNA 主带清晰、无拖尾现象,说明三种样品的 DNA 较为完整,降解极少,无蛋白质等杂质。但三者的 DNA 浓度差异明显,SDS 法与 SK251 试剂盒法所获得的 DNA 浓度均较稀,用自制试剂盒法提取的 DNA 浓度最高,其得率在 400 ng/ μl 以上。

图 2 列举了 DNA 的 *Tag* I 内切酶酶切结果。用三种不同方法提取的蜘蛛 DNA 都可以被限制性内切酶酶切,其纯度均适合进行如 RAPD、AFLP、southern 杂交及 DNA 指纹检测等研究。

表 1 从 5 个方面对三种不同方法提取 DNA 的效果进行了比较。

总体上看,自制试剂盒效果最好,且无需用酚、氯仿等有毒试剂抽提,既可避免有毒试剂对实验操作人员身体的侵害,又可减少对环境的污染。此外,自制试剂盒法在操作期间仅转移上清液一次,大大降低了交叉污染的可能性,是一种省时、经济而又有效的方法。

表 1 不同提取方法的效果比较

内容	SDS 法	SK251 试剂盒法	自制试 剂盒法
得率 (ng/ μ l)	≤ 150	≤ 150	≥ 400
时间	4 ~ 24 h	2 h	1 h
费用	较低	一般	一般
有毒试剂	有	有	无
交叉污染可能性	有	有	较小

本研究结果将为深入研究蜘蛛的 DNA 分子提供重要的方法学信息。从 DNA 分子水平研究蜘蛛的分类和

系统演化,用分子标记找出农田蜘蛛群体中的特异性种类以及筛选出捕食性强的蜘蛛种群的愿望将会得以实现。本研究结果对其它种类生物个体的基因组 DNA 提取也有一定的参考价值。

参 考 文 献

- [1] 刘波,郑哲民,张迎春等. 稻蝗属基因组 DNA 提取方法. 陕西师范大学学报, 1999, 27(3): 97 ~ 99.
- [2] 王学忠,李菊升,王丕玉等. 用随机扩增多态 DNA (RAPD) 区分不同地株微小按蚊. 中国媒介生物学及控制杂志, 2000, 11(4): 257 ~ 260.
- [3] 王智,颜亨梅,唐果等. 一种供 RAPD 分析用蜘蛛模板 DNA 的快速提取法. 生命科学研究, 1999, 3(3): 268 ~ 270.
- [4] Williams J G K, Kubelik A R *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res*, 1990, 18(22): 6 531 ~ 6 535.
- [5] Welsh J, McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res*, 1990, 18(24): 7 213 ~ 7 218.
- [6] 朱沛轩,杨朝国,王明谊. PCR 检测技术. 成都: 四川大学出版社, 1995.