

聚球藻 7002 基因组 DNA 提取方法比较

董学卫¹, 李有志¹, 何庆芳^{2,3}, 于秀敏⁴, 彭振英², 毕玉平²

(1. 广西大学 生命科学与技术学院, 亚热带生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西 南宁 530004; 2. 山东省农业科学院 高新技术中心, 山东省作物与畜禽品种改良生物技术重点实验室, 农业部黄淮海作物遗传改良与生物技术重点开发实验室, 山东 济南 250100; 3. 美国阿肯色大学 应用科学系, 美国 小石头城 72204; 4. 济宁市药品检验所, 山东 济宁 272100)

摘 要:以聚球藻 7002(*Synechococcus* sp. PCC 7002)为试材, 采用高盐法、CTAB 法、PVP 法和石英砂法 4 种方法对其基因组 DNA 进行提取, 并使用核酸测定仪检测提取到的基因组 DNA 的纯度和浓度, 对基因组 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳分析及 PCR 扩增检测。结果表明: 4 种方法均能提取到符合分子生物学要求的聚球藻 7002 基因组 DNA, 其中 PVP 法纯度最高, 高盐法、石英砂法次之, CTAB 法纯度最低; 石英砂法浓度最高, PVP 法、高盐法稍低, CTAB 法浓度最低。4 种方法提取到的基因组 DNA 均能扩增出理想条带。

关键词:聚球藻 7002; 基因组 DNA; 提取方法

中图分类号:Q 949. 22 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)20-0095-03

Synechococcus sp. PCC 7002(以下简称聚球藻 7002)是一个广盐性单细胞蓝藻, 能利用光、CO₂ 及其它无机物来生长, 是全球碳循环的主要参与者和初级生产力的主要贡献者之一^[1], 能够在很宽的 NaCl 浓度范围内生长, 对高光照射具有很强的耐受性^[2-3]。聚球藻的细胞结构和遗传体系与革兰氏阴性菌类似, 适用于大肠杆菌的分子生物学实验操作在聚球藻中同样适用^[4]。陈斌^[5]研究了聚球藻 7002 在 MA 培养基中最佳生长条件。聚球藻 7002 具有自然转化能力^[6-7], 其基因组已经完全测序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 是突变互补性和大量生产体系的潜在来源^[8]。这些特点表明聚球藻 7002 是生物技术应用很好的平台。

鉴于其诸多特性, 许多科学家将聚球藻 7002 作为一种极好的模式生物应用于生物学各领域的研究。基因组 DNA 是分子生物学研究的基础, 筛选出一种能够得到高产量、高纯度的聚球藻 7002 的基因组 DNA 方法具有十分重要的意义。该试验以聚球藻 7002 为材料进行基因组 DNA 提取, 并对提取的 DNA 进行纯度、浓度检测和 PCR 分析, 对提取效果进行比较, 以期找到一种

适合聚球藻 7002 基因组 DNA 的提取方法, 为聚球藻分子生物学水平的研究提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

聚球藻 7002(*Synechococcus* sp. PCC 7002)由中国科学院水生生物研究所提供。藻种采用 MA 培养基进行培养, 培养温度为 30℃, 光照强度为 4 000 lx, 光暗比为 12 h : 12 h, 培养时间为 7 d。

BioPhotometer Plus 核酸测定仪(德国)、TP600PCR 仪(TaKaRa)、UVP GDS7500 凝胶成像系统(美国)、Centrifuge5417R 台式冷冻离心机(Eppendorf)、DYY-8C 型电泳仪(北京市六一仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 藻体收集 将实验室培养的新鲜藻液用于基因组 DNA 提取。在无菌操作条件下, 吸取等量新鲜藻液至离心管中, 12 000 r/min 离心 6 min, 弃上清, 沉淀用于下一步操作。

1.2.2 DNA 提取 高盐法参照参考 Salah 等^[9]的操作, CTAB 法、PVP 法等参照杨泽民等^[10]的方法进行, 石英砂法参照陈高^[11]的方法操作。

1.2.3 DNA 纯度及浓度检测 采用 BioPhotometer Plus 核酸测定仪测定各种方法提取的 DNA 样品在 260、280 nm 波长下的吸光值, 得出纯度以及 DNA 浓度。每种方法做 3 个平行, 取其平均值。基因组 DNA 用浓度为 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 PCR 扩增及凝胶电泳检测 根据 cyanobase(<http://>

第一作者简介:董学卫(1982-), 男, 博士, 工程师, 研究方向为蓝藻基因工程。E-mail: dxwsd@163.com.

责任作者:毕玉平(1961-), 男, 博士, 研究员, 现主要从事植物分子生物学等研究工作。E-mail: yupingbi@vip.sina.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31270102); 泰山学者海外人才基金专项资助项目(tshw20091014)。

收稿日期:2013-07-26

genome. kazusa. or. jp/cyanobase) 中聚球藻 7002 的 *rcbL* 基因序列 (ID: SYNCC7002_A1798), 利用 DNAClub 软件按照引物设计的一般原则设计 1 对特异性引物, 正向引物 5'-GAGCCTTAGCCCCACAAAAC-3', 反向引物为 5'-GCGGTTTTCCTCCAGCAA-3', 引物扩增片段大小为 500 bp。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。PCR 反应体系 (25 μ L) 为: 12.5 μ L 2 \times Taq plus Master Mix, 正反引物 (10 μ mol/L) 上下游各 1.0 μ L, 1.5 μ L DNA 模板, 9.0 μ L ddH₂O。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。凝胶电泳检测: 将 PCR 产物于 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 并在凝胶成像仪上进行拍照比对。

2 结果与分析

2.1 4 种方法提取的 DNA 纯度及浓度比较

由表 1 可知, 高盐法和石英砂法提取得到的 DNA OD_{260}/OD_{280} 均小于 1.8, 说明蛋白质、糖类等杂质含量较高; CTAB 法提取得到的 DNA 纯度大于 1.8, 说明 RNA 污染较为严重; PVP 法得到的 DNA 纯度较好, 在 1.8 左右, 说明蛋白质和 RNA 污染较小^[12-14]。以 SDS 提取缓冲液作为细胞裂解液的高盐法和 PVP 法的最大优点就是在整个试验中都避免了与有毒物质的接触, 操作安全、简单。高盐法采用的是 6 mol/L NaCl 饱和溶液, 而 PVP 法用的是 10% 的 PVP k30 和 75 mol/L NH₃Ac, 原理都是利用高盐浓度沉淀去除蛋白质等杂质, 从而分离出 DNA。PVP 法除使用类似于高盐法中的 NaCl 饱和溶液的 NH₃Ac 饱和溶液, 还多加了一种高分子化合物 PVP, PVP 是一种高分子合成树脂, 可溶于水、乙醇及氯仿, 工业上常用作澄清剂、稳定剂, 能络合多酚类物质, 防止多酚物质氧化成醌类, 可以有效避免多酚类化合物介导的 DNA 降解^[9, 15]。

表 1 4 种方法提取聚球藻 7002

基因组 DNA 的纯度和浓度比较

Table 1 Comparison of the concentrations and purities of

Synechococcus sp. PCC 7002 genomic DNA extracted by different methods

方法	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	纯度 (OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀)	DNA 浓度/ μ g $\cdot\mu$ L ⁻¹
高盐法	0.065	0.041	1.59	161.4
CTAB 法	0.007	0.003	2.30	17.5
PVP 法	0.144	0.081	1.78	361.0
石英砂法	0.169	0.156	1.08	423.4

由图 1 可知, 4 种方法提取到的聚球藻 7002 基因组 DNA 均在同一位置处有明显条带, 条带亮度除了 CTAB 法稍弱以外, 其它 3 种方法提取到的基因组 DNA 电泳条带均明亮, 这和表 1 中 DNA 浓度的测定结果一致, 说明这 4 种方法均能提取出聚球藻 7002 基因组 DNA, 但

是 CTAB 法获得的基因组 DNA 浓度较低。

2.2 PCR 扩增结果

用设计的 PCR 引物扩增 4 种方法提取到的聚球藻 7002 基因组 DNA 结果见图 2。由图 2 可知, 不同 DNA 提取方法获得的 DNA 对 *rcbL* 基因都有较好的特异性扩增, 目的条带亮度好, 说明这 4 种提取方法都能很好满足 PCR 扩增要求, 这可能是因为聚球藻 7002 没有细胞壁, 多糖类物质含量也较少, 因此从中提取基因组 DNA 的 PCR 扩增效果较好。

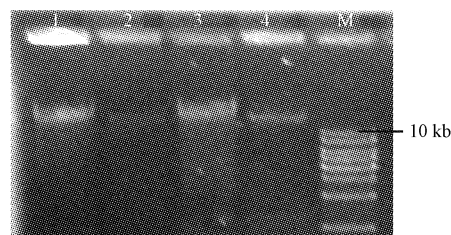


图 1 4 种方法提取的聚球藻 7002 基因组 DNA

琼脂糖凝胶电泳图谱

注: 1: 高盐法; 2: CTAB 法; 3: PVP 法; 4: 石英砂法; M: 标准分子量 (1 kb DNA Ladder)。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *Synechococcus* sp.

PCC 7002 genomic DNA extracted by different methods

Note: 1: High-salt method; 2: CTAB method; 3: PVP method; 4: Quartz sand method; M: 1 kb DNA Ladder.

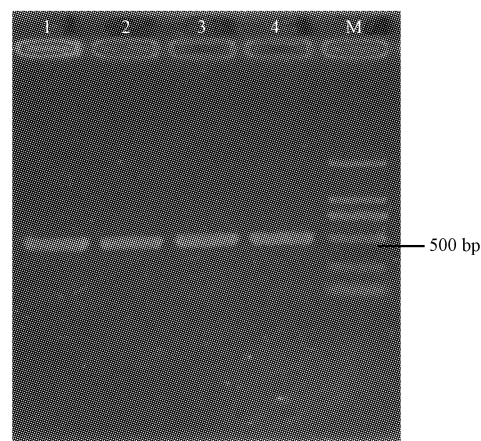


图 2 *rcbL* 引物扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

注: 1: 高盐法; 2: CTAB 法; 3: PVP 法; 4: 石英砂法; M: 标准分子量 (Trans 2k DNA Marker)。

Fig. 2 PCR amplification of *rcbL* promoter based on

Synechococcus sp. PCC 7002 genomic DNAs

Note: 1: High-salt method; 2: CTAB method; 3: PVP method; 4: Quartz sand method; M: Trans 2k DNA Marker.

3 讨论与结论

PCR 技术以及建立在 PCR 基础上的分子标记技术广泛被应用于分子标记育种及高分辨率的 DNA 图谱,

PCR 扩增对模板 DNA 的质量要求较高,是影响分子实验结果的关键因素之一,因此,高质量的基因组 DNA 对试验起到决定性作用^[16]。该试验比较了高盐法、CTAB 法、PVP 法和石英砂法 4 种方法对聚球藻 7002 基因组 DNA 提取的效果,从试验结果来看,4 种方法都能比较理想的提取到基因组 DNA,都符合分子生物学试验的要求。相对而言,PVP 法纯度最高,石英砂法浓度最高。但是,蛋白酶 K 价格昂贵,成本较高,在 DNA 提取过程中酶需要在最适温度条件下反应一段时间,周期较长,试验步骤多,提取液制备过程和 DNA 提取过程中容易失活,降低催化效率,应用受到限制。而石英砂法省时,高效且廉价,是理想的聚球藻 7002 基因组 DNA 的提取方法,用于 PCR 扩增可以获得良好的效果。

参考文献

- [1] 马英,焦念志.聚球藻(*Synechococcus*)分子生态学研究进展[J].自然科学进展,2004,14(9):967-971.
- [2] Batterton J C Jr, Van Baalen C. Growth responses of blue-green algae to sodium chloride concentration[J]. Archiv für Mikrobiologie, 1971, 76(2): 151-165.
- [3] Nomura C T, Sakamoto T, Bryant D A. Roles for heme-copper oxidases in extreme high-light and oxidative stress response in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002[J]. Archiv für Mikrobiologie, 2006, 185(6): 471-479.
- [4] Stanier R Y, Cohen B G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria[J]. Annual Reviews in Microbiology, 1977, 31(1): 225-274.
- [5] 陈斌.蓝藻对黄芩苷生物转化研究初探[D].北京:北京中医药大学, 2009.
- [6] Stevens S E, Porter R D. Transformation in *Agmenellum quadruplicatum* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1980, 77(10): 6052-6056.
- [7] Frigaard N U, Sakuragi Y, Bryant D A. Gene inactivation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 and the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* using *in vitro* - made DNA constructs and natural transformation[J]. Methods In Molecular Biology, 2004, 274(3): 325-340.
- [8] Xu Y, Alvey R M, Byrne P O, et al. Expression of genes in cyanobacteria: adaptation of endogenous plasmids as platforms for high-level gene expression in *Synechococcus* sp. PCC 7002[J]. Methods In Molecular Biology, 2011, 684(2): 273-293.
- [9] Salah M A, Iciar M. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. Nucleic Acids Reserch, 1997, 22(25): 4692-4693.
- [10] 杨泽民,章群,谢数涛,等.金藻基因组 DNA 的提取与 PCR 扩增[J].生物学杂志, 2008, 25(1): 60-63.
- [11] 陈高.多不饱和脂肪酸生物合成途径相关酶基因的克隆及在集胞藻 PCC6803 中的表达研究[D].济南:山东师范大学, 2012.
- [12] 马艳芝,张玉星.梨属植物基因组 DNA 提取部位对 RAPD 扩增的影响[J].西南农业学报, 2009, 22(4): 1042-1045.
- [13] 刘昔辉,宋焕忠,张革民,等.一种快速高效提取甘蔗及其近缘属基因组 DNA 的方法[J].西南农业学报, 2010, 23(2): 515-518.
- [14] 杜金子,陈丽梅,黄荣韶,等.改良 SDS 法提取石韦基因组 DNA 的研究[J].西南农业学报, 2009, 22(3): 754-758.
- [15] Fu R Z, Wang J, Sun Y R, et al. Extraction of genomic DNA suitable for PCR analysis from dried plant rhizomes/roots[J]. BioTechniques, 1998, 25(11): 7962-7968.
- [16] 徐伟丽,马莺,杜明,等.豆粉基因组 DNA 不同提取方法的比较[J].中国农学通报, 2011, 27(23): 119-122.

Comparison of Different Methods for Extracting Genomic DNA of *Synechococcus* sp. PCC 7002

DONG Xue-wei¹, LI You-zhi¹, HE Qing-fang^{2,3}, YU Xiu-min⁴, PENG Zhen-ying², BI Yu-ping²

(1. College of Life Science and Technology, State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004; 2. High-Tech Research Center, Shandong Academy of Agricultural Science, Key Laboratory for Genetic Improvement of Crop, Animal and Poultry of Shandong Province, Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and Biotechnology, Huanghuaihai, Ministry of Agriculture, Jinan, Shandong 250100; 3. Department of Applied Science, University of Arkansas, Little Rock, Arkansas 72204; 4. Jining Institute for Drug Control, Jining, Shandong 272100)

Abstract: Taking *Synechococcus* sp. PCC 7002 as material, four methods of high-salt method, CTAB method, PVP method and quartz sand method were used to extract the genomic DNA of it, and the concentration and purity of DNA were detected by nucleic acid analyzer, agarose condensate gel electrophoresis and PCR amplification were analyzed. The results showed that the four methods were able to extract genomic DNA from *Synechococcus* sp. PCC 7002, the DNA which was extracted by PVP method had the highest purity, containing less protein and RNA, the high-salt method and the quartz sand method followed, the CTAB method had the lowest purity. The DNA which was extracted by the quartz sand method had the highest concentration, the PVP method followed, then the high-salt method, the CTAB method had the minimum concentration. The genomic DNA which was extracted by four kinds of method could amplify the ideal band.

Key words: *Synechococcus* sp. PCC 7002; genomic DNA; extraction method