

模式小鼠总 DNA 三种提取方法比较

刘甦苏,左 琴,周舒雅,王辰飞,贺争鸣,李保文,范昌发

(中国食品药品检定研究院,国家啮齿类实验动物种子中心,北京 100050)

【摘要】 目的 建立简便、快捷、经济的模式小鼠总 DNA 提取方法,以快速鉴定大批量模式小鼠基因型。**方法** 采用苯酚抽提法、异丙醇沉淀法、鼠耳煮沸法提取同种模式小鼠总 DNA,对比 DNA 纯度、得率、耗费时间,并比较基因型鉴定结果。**结果** 苯酚抽提法得率最高,异丙醇沉淀法最低;而纯度则按照苯酚抽提法、异丙醇沉淀法、鼠耳煮沸法顺序递减;在耗时上鼠耳煮沸法最短。三种方法提取的 DNA 均可做模版用于基因型鉴定。**结论** 鼠耳煮沸法操作简单、成本最低,快速、基因型鉴定结果可靠,可用于规模化的基因型鉴定实验中。

【关键词】 总 DNA 提取方法;基因型鉴定;PCR 反应;模式小鼠

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 07-0045-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 007. 009

Comparison of three methods for total DNA extraction from mouse models

LIU Su-su, ZUO Qin, ZHOU Shu-ya, WANG Chen-fei, HE Zheng-ming, LI Bao-wen, FAN Chang-fa

(Laboratory Animal Resource Center, National Institute of Food and Drug Control,
Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To establish a simple, fast and economic total DNA extraction method to serve the rapid identification of model mouse genotype in large number of mice. **Methods** Three methods, i. e. phenol extraction, isopropyl alcohol precipitation and mouse ear boiling methods were used to extract the total DNA from ten C57-rasmodel mice. The purity and yield of DNA obtained by the three methods were compared, and polymerase chain reaction (PCR) assay was used to compare the efficacy of the three extraction methods. **Results** Among the three methods, phenol extraction was the best and isopropyl alcohol precipitation was the poorest in DNA yield. In terms of DNA purity, the phenol extraction was the best and the mouse ear boiling method was the poorest. All the three methods could be used to extract the total DNA from mice serving as template of PCR reaction for the mouse genotype identification. The time consumption of three methods are 12.5 hr, 13 hr and 0.18 hr. Mouse ear boiling method was significantly lower than that of the other two methods ($P < 0.01$). The obtained total DNA can be stored at conventional -20°C for 7 days and 30 days later still can be used as a template for PCR reaction. **Conclusions** Among the three methods studied, the mouse ear boiling method is simple and with the lowest cost, so it is feasible for total DNA extraction in scaled genotyping experiments.

【Key words】 Total DNA extraction; Genotype identification; PCR reaction; Model mice

随着基因工程技术的不断发展和完善,基因工程小鼠越来越多的应用于生命科学研究中,已渗透到医学、发育生物学、遗传学、动物育种学等各个领

域。模式小鼠模型在繁殖建系过程中,需要不断对其子代进行基因型鉴定,因而建立快速、稳定、准确、经济的基因型鉴定方法很有实际应用价值^[1-2]。

【基金项目】 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金(2012B5)。

【作者简介】 刘甦苏(1981-),女,助理研究员,主要从事模式动物相关工作。

【通讯作者】 范昌发(1970-),男,博士,研究员,主要从事模式动物研究。Email: fanchf@nifdc.org.cn。

southern 印迹杂交、斑点杂交和聚合酶链式反应 (PCR)^[3] 是模式动物基因型鉴定常用的方法, 而后者因操作简单快速, 应用更为广泛^[4]。引物设计是 PCR 实验的关键之一, 其中反应产物长度直接影响扩增效率。以总 DNA 为模板的普通 PCR 反应, 引物设计时产物长度在 100 ~ 600 bp 为宜^[5-6]。在批量模式小鼠的基因型鉴定中, 总 DNA 的提取工作量较大, 耗时耗力, 而 PCR 模板的 DNA 得率和纯度直接影响基因型鉴定的准确性和效率, 因而有必要对其进行探索。本文以常规 PCR 片段长度为例, 采用苯酚抽提法^[7]、异丙醇沉淀法^[8]、鼠耳煮沸法提取模式小鼠基因组 DNA, 测定其 OD260 与 OD280 的吸光值, 评估核酸的纯度和得率, 并通过 PCR 方法进行模式小鼠基因型鉴定, 旨在确立更加实用的基因型鉴定方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

模式小鼠选取本单位自主建立 C57-*ras* 模型小鼠【SCXK(京)2009-0017】, 饲养于国家啮齿类实验动物种子中心【SYXK(京)2011-0005】, 繁育环境为 SPF 级, 饲养和实验在清洁级环境中进行。本实验在中国食品药品检定研究院实验动物伦理委员会监督下进行。

1.2 仪器与试剂

鼠尾裂解缓冲液储存浓度 (0.2 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 5 mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.2% SDS, 10 mg/mL 蛋白酶 K), 鼠耳裂解 10 倍母液 [100 mmol/L NaOH, 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)], 常用缓冲液 TE buffer、TAE buffer 按照《分子克隆》手册配置; Tris 平衡酚购自于天津灏洋生物制品公司, RNase A 和蛋白酶 K 购自于大连宝生物, 其它常见生化试剂乙醇、异戊醇、异丙醇、氯仿购自北京化学工业集团有限公司。1.5 离心管和 PCR 管及盖购自于 AXYGEn。检测仪器为美国 ABI PCR 仪, Thermo nanodrop 2000 微量紫外分光光度计。引物由诺赛基因公司合成。

1.3 基因组 DNA 提取的方法

选取 C57-*ras* 模型小鼠 10 只, 分别留取相应组织分别用以下三种提取基因组 DNA

1.3.1 方法一苯酚抽提法:

- (1) 剪取约 1 cm 鼠尾置于 1.5 mL 的离心管中
- (2) 每管加入配制好的 250 μ L 裂解液和 5 μ L

蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 水浴过夜

(3) 每管加入 250 μ L Tris 平衡酚。室温离心 2 min 取上清至另一个新的 EP 管中

(4) 加入等体积氯仿:异戊醇 (49:1) 充分混匀后, 室温离心 2 min 取上清至新的 EP 管中

(5) 加入 25 μ L 醋酸铵和 500 μ L 异丙醇, 试管上下颠倒混匀, 室温离心 10 min, 弃上清

(6) 冷藏的 75% 乙醇轻混后漂洗一次, 离心弃上清风干, 加入 TE 和 RNase A, 55 $^{\circ}$ C 水浴溶解 2 h

1.3.2 方法二异丙醇沉淀法:

(1) 剪取约 1 cm 鼠尾置于 1.5 mL 的离心管中。

(2) 每管加入配制好的 500 μ L 裂解液 (含蛋白酶 K 5 μ L, 稀释终浓度:100 μ g/mL), 55 $^{\circ}$ C 水浴过夜

(3) 取出室温放置 10 ~ 15 min, 室温离心 15 min 后, 吸取上清至另一个新的 EP 管中

(4) 加入等体积的异丙醇, 颠倒混匀后室温放置 10 min, 离心后弃上清

(5) 冷藏的 75% 乙醇轻混后漂洗一次, 离心后弃上清风干, 加入 TE 和 RNase A, 55 $^{\circ}$ C 水浴溶解 2 h

1.3.3 方法三鼠耳煮沸法:

(1) 先配制 2 种 10 倍母液 100 mmol/L NaOH 和 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 分别于试剂瓶中常温保存。两种母液混合并分别稀释 10 倍, 配制成使用液 (现用现配)

(2) 剪取约 1 cm 鼠尾置于 1.5 mL 的离心管中

(3) 每个样品加入现配的裂解液, 95 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 降至室温后直接吸取上清作为模板进行 PCR 反应

1.4 总 DNA 琼脂糖凝胶电泳及质量检测

分别采用紫外分光光度计法、琼脂糖凝胶电泳法, 检测所得 DNA 的得率和质量。DNA 经 TE 稀释后分别取 1.5 μ L, 用紫外分光光度计测定 260 和 280 nm 的光吸收值, 计算 DNA 得率及纯度。电泳检测取 2 μ L 总 DNA 与 6 \times loading buffer 按比例混匀。用 1% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/mL EB) 电泳检测。

1.5 PCR 反应扩增检测

分别以三种方法提取的总 DNA, 通过 PCR 反应进行基因型鉴定。引物设计针对转基因的编码序列, 上游引物为 Pri. PFT, 下游引物为 Pri. PRN1735 (表 1), 目的片段 408 bp。PCR 条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min 变性; 95 $^{\circ}$ C 30 s; 62 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环。产

物取 5 μL 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 PCR 反应引物序列及退火温度

Tab.1 The primer sequences and annealing temperature of PCR reaction

引物 Primers	引物序列(5' - >3') Primer sequences	片段长度(bp) Fragment size	退火温度(℃) Annealing temperature
Pri. PFT	ACACGGGCGCTAGCTGAGTCGAGAGCT	408	62
Pri. PRN1735	CACTTGCAGCTCATGCAGCCGGGCCAC		

表 2 三种不同基因组 DNA 提取方法结果比较

Tab.2 Comparison of total DNA isolated by three different methods

样品编码 Code	苯酚抽提法 Phenol extraction		异丙醇沉淀法 Isopropyl alcohol precipitation		鼠耳煮沸法 Mouse ear boiling	
	总 DNA 得率 (μg)	吸光值比值 (A260/A280)	总 DNA 得率 (μg)	吸光值比值 (A260/A280)	总 DNA 得率 (μg)	吸光值比值 (A260/A280)
1	28.34	1.80	14.05	1.73	24.45	1.54
2	48.92	1.80	9.66	1.73	25.23	1.59
3	41.45	1.80	6.02	1.69	26.04	1.60
4	36.39	1.78	16.41	1.69	24.39	1.60
5	29.69	1.79	4.42	1.67	25.89	1.59
6	33.07	1.79	12.06	1.73	25.86	1.58
7	30.16	1.82	11.17	1.71	25.74	1.56
8	32.13	1.84	10.32	1.70	27.60	1.56
9	32.76	1.82	9.02	1.68	27.42	1.56
10	40.27	1.84	10.72	1.69	23.31	1.58
Mean ± SD	35.32 ± 6.47	1.81 ± 0.02	10.36 ± 3.50	1.70 ± 0.02	25.59 ± 1.36	1.58 ± 0.02

注:10 只阳性鼠 DNA 样品代码表示为 1~10,统计结果以平均值 ± 标准差表示。

Note: DNA samples of 10 positive mice are coded for 1~10, statistical results expressed as mean ± SD.

2 结果

2.1 总 DNA 得率和纯度

选取 10 只 C57-ras 阳性鼠分别用三种方法提取总 DNA,计算得率和纯度,结果表示方式为平均值 ± 标准差。总 DNA 得率方面,苯酚抽提法最高,其最高值能达到 48.92 μg,平均得率为 35.32 μg,而异丙醇沉淀法得率最低,平均得率仅为 10.38 μg,鼠耳煮沸法介于二者之间平均得率为 25.59 μg。在衡量 DNA 纯度方面,测定光吸收比值是一个重要指标^[9],三种提取方法呈现一个递减的趋势,结果与理论值一致。苯酚抽提法和异丙醇沉淀法比值差异不大,平均值分别为 1.81 和 1.7,鼠耳煮沸法所提取的总 DNA 纯度最差,平均比值为 1.58(表 2)。

2.2 总 DNA 电泳检测结果

取等量总 DNA 采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)。结果表明,方法一和方法二的总 DNA 质量较好,每个样品都有清晰的条带,方法三提取的效果最差,电泳检测无清晰的条带。

2.3 PCR 反应扩增目的条带结果

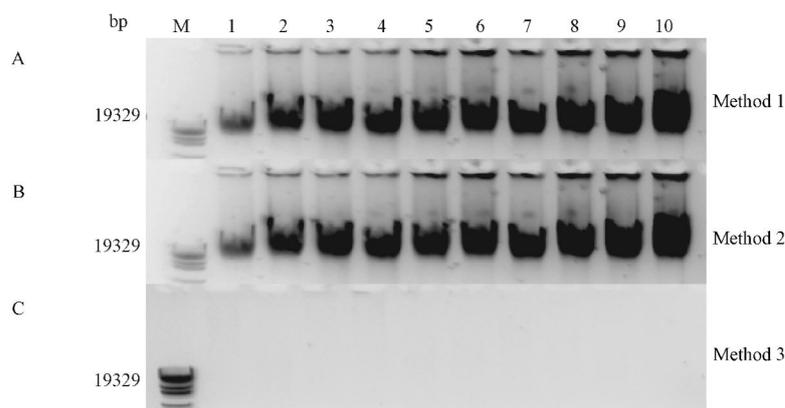
根据设计引物 PCR 扩增 ras 基因,不同 DNA 模板本都出现清晰目的条带(图 2),表明三种方法提取的 DNA 均完全可以做为 PCR 反应的模板,达到筛选转基因阳性鼠的实验目的。

2.4 鼠耳煮沸法提取的 DNA 保存方法比较结果

鼠耳煮沸法提取的 DNA 采用常规 -20℃ 保存 7 d、30 d 后重复 PCR 扩增反应,依然出现清晰目的条带(图 3),说明该方法所提取的 DNA 可以保存一个月左右时间,在不能及时开展后续实验时依然适用。如果长时间样品最好存放于 -80℃ 超低温冰箱内。

2.5 三种提取方法耗费时间比较

选取 10 只 C57-ras 阳性鼠,计算三种方法提取总 DNA 的时间并进行统计分析。苯酚抽提法和异丙醇沉淀法的提取时间分别为 12.5 h 和 13 h 极显著($P < 0.01$)高于鼠耳煮沸法 0.18 h。虽然苯酚抽提法的提取时间低于异丙醇沉淀法,但差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 3 和图 4)。

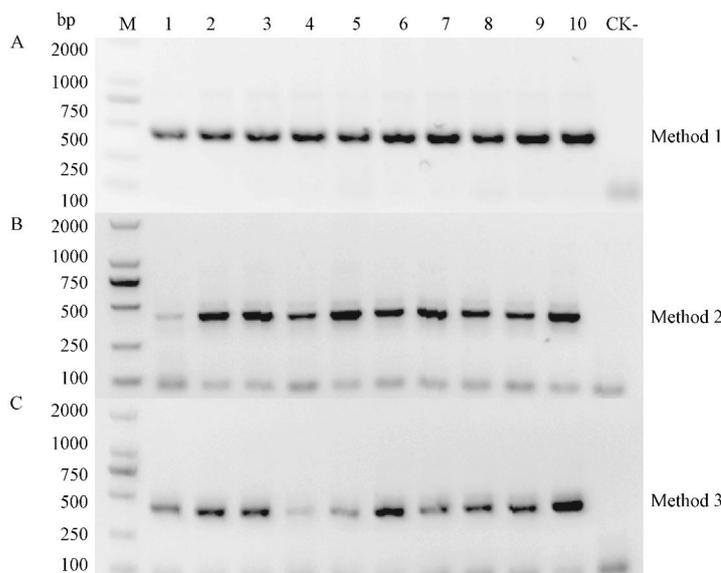


注:A 苯酚抽提法;B 异丙醇沉淀法;C 鼠耳煮沸法;Marker: λ -EcoT14。

图 1 三种不同提取方法所得总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测结果

Note: A: Phenol extraction; B: Isopropyl alcohol precipitation; C: Mouse ear boiling; Marker: λ -EcoT14.

Fig. 1 Agarose electrophoresis results of the total DNA extracted by three different methods



注:A 苯酚抽提法;B 异丙醇沉淀法;C 鼠耳煮沸法;Marker: D-2000。

图 2 三种不同提取方法 PCR 扩增检测结果

Note: A: Phenol extraction method; B: Isopropyl alcohol precipitation method; C: Mouse ear boiling method; Marker: D-2000.

Fig. 2 Detection of PCR amplification products extracted by three different methods

表 3 三种不同提取方法实验时间结果比较

Tab. 3 Comparison of the times used for extraction of total DNA by the three extraction methods

方法 Method	数量 n	提取时间(小时) Extraction time (hr)
苯酚抽提法	10	12.5 **
异丙醇沉淀法	10	13 **
鼠耳煮沸法	10	0.18

注:和鼠耳煮沸法比较, ** $P < 0.01$ 。

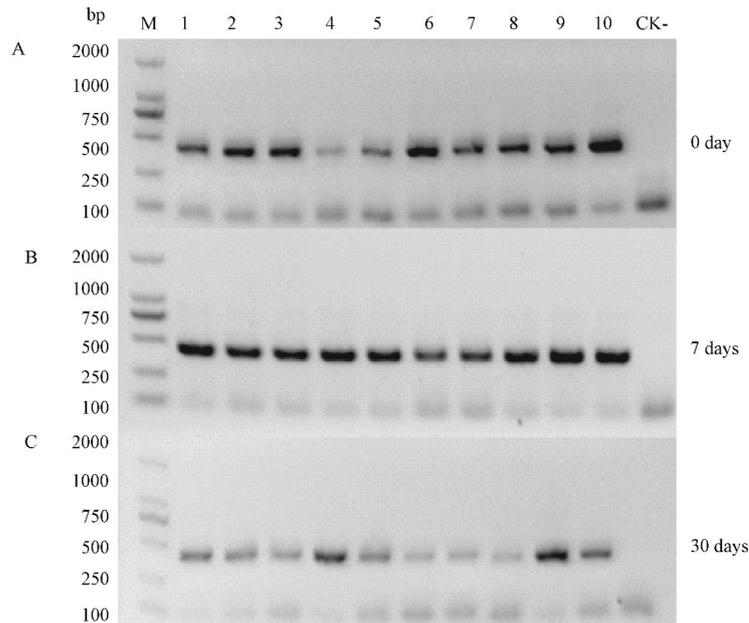
Note: ** $P < 0.01$, compared with mouse ear boiling method.

3 讨论

为了维系国家啮齿类实验动物种子中心日常

工作,常常面临批量模式小鼠基因型鉴定。建立简便、快捷、经济的总 DNA 提取方法能有助于提高工作效率。常见提取总 DNA 的方法有苯酚抽提法、碱裂解法、盐沉淀法等。肖波^[10]等对苯酚抽提法和盐沉淀法^[11]进行过相关比较。本文比较分析了苯酚抽提法、异丙醇沉淀法和鼠耳煮沸法三种方法。

苯酚抽提法 DNA 得率最高,异丙醇沉淀法最低;纯度则是苯酚抽提最好,鼠耳煮沸法最差。三种方法提取的总 DNA 均可作为 PCR 反应的模板,达到基因型鉴定目的。苯酚抽提法和异丙醇沉淀法提取的 DNA 纯度较好,但在批量鉴定时费时费



注:A 图是鼠耳煮沸法提取的 DNA 保存 0 d 的 PCR 实验扩增结果;B 图是鼠耳煮沸法提取的 DNA 保存 7 d 的 PCR 实验扩增结果;C 图是鼠耳煮沸法提取的 DNA 保存 30 d 的 PCR 实验扩增结果,保存条件均为 -20℃ 保存。Marker 为 D-2000。

图 3 鼠耳煮沸法所得总 DNA 不同保存时间的 PCR 扩增检测结果

Note: A; PCR resultsof DNA stored for 0 day;B: PCR results of DNA stored for 7 days;C: PCR results of DNA stored for 30 days;All the DNA samples were stored at -20℃ ; Marker;D-2000.

Fig. 3 Detection of PCR amplification products of total DNA extracted by mouse ear boiling method and stored for different preservation times

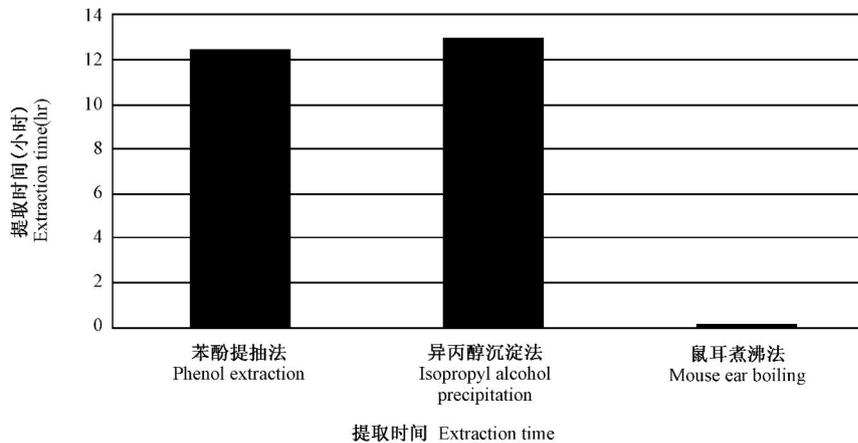


图 4 三种不同提取方法实验时间比较

Fig. 4 Comparison of the times used for extraction of total DNA by the three extraction methods

力,基因型工作易出现延误工作的情况。综合比较成本,效果后发现,鼠耳煮沸法有以下优点:

3.1 操作步骤简便,减少交叉污染

苯酚抽提法操作繁琐且所用试剂品种较多,增加了 PCR 污染的可能性。改进后的异丙醇沉淀法,减少了酚/氯仿抽提步骤,降低了操作风险和交叉污染的可能性。鼠耳煮沸法操作步骤更为简单,煮

沸后上清可直接进行 PCR 反应,进一步减少各样品交叉污染的几率。

3.2 缩短实验周期,快速筛选鉴定

苯酚抽提法和异丙醇沉淀均需过夜消化样本,异丙醇沉淀法虽减少了酚/氯仿抽提步骤,但同样第二天才获得实验结果;鼠耳煮沸法缩短了实验周期,当天即可筛选鉴定。

3.3 降低实验成本,避免操作风险

苯酚抽提法使用试剂较多且酚类物质有高度腐蚀性,易引起严重的烧伤^[12]。鼠耳煮沸法只需 2 种普通试剂且价格便宜,避免了乙醇等有机溶剂或浓缩盐的介入,实验成本较低且无操作风险。

综合比较,鼠耳煮沸法在批量筛选、快速鉴定模式小鼠基因型鉴定工作更为实用。

参考文献:

- [1] 卢一凡,田韞,邓继先. 转基因动物鉴定技术的研究进展[J]. 生物工程进展, 2000,20(3):60-61.
- [2] 赵彦青,纪香,赵宝成. 转基因动物的研究与应用及其存在问题[C]. “科技进步推进畜牧业现代化”科技论文集, 2011 年.
- [3] 杨继山,潘庆杰,董晓. 转基因动物检测方法的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(3):45-49.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW, 主编, 黄培堂译. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002, 487-509.
- [5] Linz U, Delling U, Rubsamen-Waigmann H. Systematic studies on parameters influencing the performance of the polymerase chainreaction[J]. J ClinChem Biochem. 1990,28(1):5-13.
- [6] 任亮,苏玉虹,巴彩凤,等. PCR 引物设计技巧[J]. 现代畜牧兽医,2005,6:49
- [7] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993:96.
- [8] Abbot C, Prove S, Vivian N, *et al.* PCR as a rapid screening method for transgenic mouse [J]. Trends in Genetics, 1988, 4(11):325.
- [9] 李永明,赵玉琪. 实用分子生物学方法手册[M]北京: 科学出版社, 1999, 21-23.
- [10] 肖波,李岩,屈慧歌,等. 两种动物基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 烟台师范学院学报(自然科学版),2005, 21(1):56-58.
- [11] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 71-131
- [12] 鲍毅新,孙波,张龙龙,等. 对动物组织 DNA 提取方法的改进及 PCR 检测[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2009, 32(3):318-320.

[修回日期]2014-05-13