

陈旧皮张中 DNA 提取的新方法*

饶刚^{①②} 李明^① 牛屹东^① 王静^{①③} 魏辅文^{①**} 方盛国^②

(①中国科学院动物研究所 北京 100080; ②浙江大学生命科学学院 杭州 310012;

③西北大学生物学系 西安 710069)

摘要:对传统的馆藏陈旧皮张标本 DNA 提取方法进行了改进,所提 DNA 分子量可达 1 kb,而且具有样品用量少(约 0.01 g)、消化时间短(约 14 h)和操作步骤简单等优点。利用所提 DNA,对小熊猫等珍稀动物线粒体 DNA 的细胞色素 *b* 和控制区序列的部分片段进行了 PCR 扩增、序列测定和比较分析,证实所提 DNA 合格而无污染,完全可以用于珍稀动物保护遗传学研究。

关键词:陈旧皮张标本;DNA;保护遗传学

中图分类号:Q523 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2001)04-53-05

* 中国科学院“青年科学家创新小组”专项基金,国家自然科学基金项目(No.39970103,30070119)资助;

** 通讯作者;

第一作者介绍 饶刚,男,23岁,博士研究生;研究方向:珍稀濒危哺乳动物的保护遗传学及分子进化;

收稿日期:2000-06-30, **修回日期:**2001-04-05

A New Method for DNA Extraction from Dried Skins

RAO Gang^{①②} LI Ming^① NIU Yi-Dong^① WANG Jing^{①③} WEI Fu-Wen^① FANG Sheng-Guo^②

(^① Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences Beijing 100080; ^② College of Life Sciences,

Zhejiang University Hangzhou 310012; ^③ Department of Biology, Northwest University Xian 710069, China)

Abstract: An improved method for DNA extraction from old or dried skins was developed. Compared to published protocols, it allows the use of minute amount of samples (0.01 g), and requires a much reduced digestion time. With this method, DNA with size of more than 1 kb can be obtained. A portion of mitochondrial *cyt b* gene and control region has been amplified from total DNA of red panda, takin and gold cat, extracted from skin samples using this method. Sequence data confirmed the authenticity of the extracted DNA, and indicate thus the value of the present method in conservation genetics study.

Key words: Skin sample; DNA; Conservation Genetics

近年来,遗传因素在保护生物学及系统进化中的作用受到普遍重视。要获取动物的遗传信息,首先必须采集含有动物遗传信息的分析样品。在60、70年代,通常采用杀死研究对象的方法,以获得新鲜样品,进行蛋白质的电泳分析。由于这种取样方法对生物资源的破坏性后果,研究人员不得不寻求一种非破坏性的(non-destructive)取样方法,比如捕获动物来抽取血液、采集毛发或羽毛、耳、尾或趾等分析样品。虽然该方法不至于导致动物死亡,但对动物特别是珍稀濒危动物均会或多或少地造成伤害^[1,2]。80年代中期以来,由于PCR技术的广泛应用,已经能对极少量遗传物质进行检测,由此产生了一类新的取样方法——非损伤性取样(noninvasive sampling)。这种方法的样品来源可以是动物的皮张标本、食物残渣、脱落的毛发、粪便、尿液等^[3,4]。在不伤害甚至不必见到动物的情况下,利用这些样品提取动物DNA并进行PCR扩增,可以进行生物个体遗传信息的分析,并应用于保护遗传学及系统进化的研究。

由于人类经济活动的加剧,严重破坏了自然资源与生态系统的平衡,导致野生动物的栖息环境严重退化。多种珍稀濒危动物由于数量稀少、栖息地狭窄并且相对隔离,种群间缺乏基因交流,导致遗传漂变、近亲繁殖等,使物种处

于严重濒危的境地。要保护这些珍稀濒危动物,最重要的是保护物种的遗传多样性及其进化潜力^[5]。只有摸清这些物种的遗传多样性现状,才能深入了解其进化历史,从而制定出切实可行的保护策略。绝大部分珍稀濒危动物的种群生存状况相当脆弱,已经不允许我们进行破坏性的取样活动,因此开发利用馆藏标本样品用于保护遗传学和系统进化等方面的研究极其重要。虽然一些学者从馆藏陈旧皮张标本中已经成功提取了DNA^[6,7],但是这些方法往往存在着标本样品用量大、实验周期长和操作步骤繁琐等不足。对此,作者对传统DNA提取方法进行了改进,现将结果报道如下。

1 材料与amp;方法

1.1 材料 用于DNA提取的皮张标本分别取自中国科学院动物研究所标本馆、中国科学院昆明动物研究所标本馆、四川师范学院以及西藏林业局等单位。样品为馆藏的小熊猫(*Ailu-
rus fulgens*)皮张标本。标本保存时间最长者为67年,最短者为1年。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取

①剪取0.3 cm²(约0.01 g)左右的皮张标本,用消毒的解剖刀去除皮张表面的毛发及其

它附着物。

②用消毒的剪刀将皮张剪成 1 mm^3 以下的微粒,置于 Eppendorf 管中,以去离子水高速振荡洗涤三次,高速离心,倾去上层清液。

③在每个 Eppendorf 管中加入 $500\ \mu\text{l}$ 的消化液, 54°C 过夜(14 h)。消化液: 10 mmol/L Tris-HCl, 0.5% SDS, 1 mmol/L CaCl_2 , 0.2 mg/ml 蛋白酶 K, pH 8.0。

④消化结束时,加入 $1\ \mu\text{l}$ 的 $1\ \mu\text{mol/L}$ EDTA (pH 8.0)。

⑤加入 $200\ \mu\text{l}$ 10% 的 Chelex 溶液,高速振荡混匀,置于沸水浴中 20 min。

⑥ $4\ 000\ \text{r/min}$ 离心 5 min,取上清。

⑦用等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提样品, $4\ 000\ \text{r/min}$ 离心 10 min,重复 2~3 次。

⑧在 DNA 溶液中加入 1/10 体积 3 mol/L 的 NaAc 溶液和 2 倍体积预冷的无水乙醇,混匀,置于 -20°C , 20 min。

⑨ $12\ 000\ \text{r/min}$ 离心 10 min,弃去上清。

⑩加入 1 ml 预冷的 75% 乙醇,颠倒离心管数次, $12\ 000\ \text{r/min}$ 离心 3 min,弃去上清。

⑪真空干燥,将干燥的沉淀物溶于适当体积的 TE 缓冲液中。在整个提取过程中,进行空白对比实验。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 扩增引物为线粒体 DNA 细胞色素 *b* 通用引物中的 L14724 和 H15149, 以及线粒体 DNA 控制区左区的通用引物 L16457 和 H16781, 由上海生工生物工程

技术公司合成。PCR 扩增的试剂盒购自大连宝生物工程公司,反应总体积为 $50\ \mu\text{l}$, 内含 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 1.5 mmol/L MgCl_2 , $0.4\ \mu\text{mol/L}$ 引物, 500 mg/ml 牛血清白蛋白(BSA), $5\ \mu\text{l}$ DNA 提取物, $1.5\ \text{U}$ Taq DNA 聚合酶。

细胞色素 *b* 扩增每个循环过程为变性: 94°C , 60 s; 复性: 55°C , 60 s; 延伸: 72°C , 90 s。共进行 35 个循环。反应前在 94°C 预变性 10 min, 35 个循环后在 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。

控制区序列扩增每个循环过程为变性: 94°C , 30 s; 复性: 45°C , 45 s; 延伸: 72°C , 60 s。共进行 50 个循环。反应前在 94°C 预变性 10 min, 50 个循环后在 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。

1.2.3 纯化及测序 PCR 产物用 MoBio 公司的回收试剂盒进行纯化回收后,在 ABI377 DNA 全自动测序仪上进行 DNA 序列测定。

2 结果

从皮张标本中提取的小熊猫 DNA 的电泳图谱如图 1 (a) 所示, DNA 片段的分子量可达到 1 kb 以上。其中 3 号泳道为从保存 67 年的小熊猫标本中提取的 DNA 样品, 其余样品保存时间从 2 年到 40 年不等。由于各地样品的处理方法不同, 并且样品保存的年代及条件也有很大差异, 所以造成提取 DNA 的质量差别较大, 如 5 号样品模板浓度即偏低。由于我们的目的序列(D-loop)是非编码区, 模板中存在的

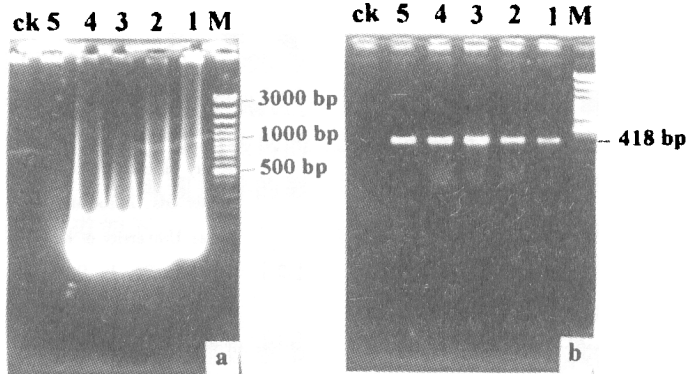


图 1 小熊猫皮张标本 DNA (a) 及细胞色素 *b* 扩增 (b) 的电泳图谱

M: DNA 分子量标记; 1~5: 提取的 DNA 样品编号(a)和扩增结果编号(b); ck: 空白对照样品

RNA 对 PCR 结果影响不大,因而没有对 DNA 提取物进行 RNA 酶的处理。可以看到,图 1:a 中的分子量较小的拖尾部分为 RNA;同时由于样品的防腐处理以及长时间保存均会严重影响 DNA 的质量和产量,提取出的 DNA 都会存在着严重降解,因此在电泳图谱上会出现弥散现象。

D-loop 片段的 PCR 扩增结果见图 1:b,空白对照实验没有出现扩增带,表明 DNA 在扩增过程未受到外源 DNA 分子的污染。在图中可以看到, DNA 模板浓度较低的 3 号、5 号样品的 PCR 结果也是令人满意的,扩增出 418 bp 的目的片段,因而证明用改进方法提取的 DNA 模板质量是可靠的。

DNA 测序结果经与 GenBank 中小熊猫源序列比较,证明了测序结果的正确性,由此也进一步证明扩增及提取过程中无污染,其结果用于保护遗传学的研究是可信的。

3 讨论

3.1 皮张标本的 DNA 提取 关于从陈旧皮张标本中提取 DNA,不少学者也作过类似的尝试,并且在某些实验对象取得了成功。然而,这些实验方法往往存在着标本样品用量大、实验周期长、操作步骤繁琐等不足。对于大型动物而言,较多的样品用量并不会明显损害标本的整体性;而对于小型动物,如果样品用量较多(约 0.5 g)则会对标本产生比较明显的损害,降低其在其它方面的研究价值。

本文对传统的 DNA 提取方法进行了改进,使得样品用量减少到 0.01 g,在很大程度上克服了小型动物取材难的问题,同时保留了皮张标本的完整性及其研究价值。一方面, Chelex 是一种对多价金属离子具高亲和力的一种螯合树脂,在高温条件下一些金属离子可以作为 DNA 降解的催化剂作用,而 Chelex 则能通过螯合这些金属离子来阻止 DNA 的降解,这样可从微量样品中得到较高分子量的 DNA,再通过 PCR 反应就能得到足够量的 DNA 进行序列测定^[8]。另一方面,由于皮张标本中的角蛋白等对蛋白酶 K 的消化作用有较高的耐受性,因而

以往皮张标本 DNA 的提取都要经过一个长时间(2~3 d)的消化过程^[7,9]。本文针对皮张标本的这一特性,对前处理过程中的消化液组分进行了调整,以钙盐代替钠盐。这是由于蛋白酶 K 有两个 Ca^{2+} 结合位点,它们与催化机理并无直接关系,但如果从该酶中除去 Ca^{2+} ,由于出现远程的结构变化,催化活性将丧失 80% 左右^[10]。所以如果要消化皮张标本中对蛋白酶 K 具较强耐受性的角蛋白,可以加入含 Ca^{2+} 的消化液,从而增强消化液的消化效果,大大减少了消化时间(约 14 h),使得实验周期成倍缩短;同时,由于对标本的前期处理工作一次到位,也简化了操作步骤。

3.2 在保护遗传学研究中的应用 进行保护遗传学的研究,首先要获得研究对象的遗传信息。由于珍稀濒危动物野生种群的生存状况十分脆弱,因而在对这些动物进行研究时,采集标本必须尽量减少对自然种群的干扰。非损伤性取样法的兴起,为获取珍稀濒危动物的遗传信息开辟了切实可行的新途径。我国馆藏标本丰富,且其中不乏系统收集的珍稀濒危动物样本,但长期以来并没有得到充分的利用,其原因主要是传统的 DNA 提取方法易受污染、遗传物质含量极少且质量不高。本文对传统的 DNA 提取方法进行了改进,用于小熊猫等动物的皮张标本全基因组 DNA 的提取,获得了合格的 DNA 样品,完全能适用于保护遗传学的研究,这对进一步拓宽实验材料来源具有极其重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Dessauer, H. C., M. S. Hafner. Collections of frozen tissues: value, management, field and laboratory procedures, and directory of existing collection. In: Dessauer, H. C., M. S. Hafner eds. Association of Systematic Collections. Lawrence, Kans: University of Kansas Press, 1984.
- [2] Taberlet, P., L. P. Waits, G. Luikart. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *TREE*, 1999, 8: 323~327.
- [3] Zhang, D. X., G. M. Hewitt. Isolation of DNA from preserved specimens. In: Karp, A., G. P. Isaac, D. S. Ingram eds. Molecular Tools for Screening Biodiversity. London: Chapman & Hall, 1998. 41~45.
- [4] 方盛国,冯文和,张安居等. 大熊猫父权认定的 DNA 指

纹图分析. 兽类学报, 1997, 17(2): 92 ~ 99.

- [5] 葛颂. 遗传多样性. 见: 蒋志刚, 马克平, 韩兴国主编. 保护生物学. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1997. 11 ~ 19.
- [6] Paabo, S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 1 939 ~ 1 943.
- [7] 兰宏, 王文, 施立明. 鹿属动物陈旧皮张标本的 DNA 提取及 PCR 扩增. 动物学研究, 1995, 16(2): 146 ~ 152.
- [8] Walsh, P. S., D. A. Metzger, R. Higuchi. Chelex 100 as a

medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 1991, 10(4): 506 ~ 513.

- [9] 宿兵, 恽锐. 动植物样品的采集及 DNA 样品的提取. 见: 季维智, 宿兵主编. 遗传多样性研究的原理与方法. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1997. 61 ~ 70.
- [10] Bajorath, J., S. R. Athan, W. Hinrichs, W. Saenger. Long range structural changes in proteinase K triggered by Calcium ion removal. *Nature*, 1989, 337: 481.