

一种从鸟类剥制标本提取 DNA 的改进方法

吴唤玲 韩德民* 章敬旗 李进华

(安徽大学生命科学学院 安徽省生态工程与生物技术重点实验室 合肥 230039)

摘要:应用非损伤性取样的方法,收集鸟类剥制标本的皮肤组织和羽毛,用无水乙醇、浸泡液预处理的方法抽提 DNA,结果两者都可提取 DNA 供 PCR 扩增。将 PCR 产物经序列测定和比对分析,证明提取的 DNA 为目的 DNA,表明本试验方法可行。鸟类剥制标本的皮肤组织和羽毛可以作为研究种群遗传学的资源。

关键词:鸟类;剥制标本;DNA 提取;刁鸡;皮肤组织

中图分类号:Q953 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2007)01-84-05

An Improved Method for DNA Extraction from Avian Specimens

WU Huan-Ling HAN De-Min* ZHANG Jing-Qi LI Jin-Hua

(School of Life Science, Anhui University; The Key Laboratory of Eco-engineering and Biotechnology of Anhui Province, Hefei 230039, China)

Abstract: Non-invasive sampling is a useful tool for genetic analysis of endangered species, but it is often inapplicable due to the low quality and quantity of DNA obtained. In order to explore a method for extracting DNA from specimen of bird, we tried to extract DNA from dried skin of birds. We extracted total DNA of the koklass specimens successfully. Compared with the existing DNA extracting methods, our method allows the use of minute amount of dried skin and the feather, and this method is easier, quicker and more economical. The specimens of the dried skin and feathers are proved to be a good source of DNA extraction for genetic analysis.

Key words: Bird; Specimen; DNA extraction; Koklass; Skin

20 世纪 80 年代以来,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^[1],即在不伤害或触及动物的前提下收集脱落的毛发、粪便、口腔脱落细胞、陈旧皮张等作为分析样品,进行遗传学分析。

采用非损伤性取样方法,开发利用馆藏标本资源,用于保护遗传学和系统进化等方面的研究极其重要^[1]。标本制作好后,被注明产地,保存在固定的地点,排除了由于遗传物质转移和物种迁移等造成的系统分析的紊乱,可获得种群长期、全面的遗传信息^[2]。

已有研究从馆藏鸟类标本的皮肤组织和趾垫中提取基因组总 DNA,但是现有实验方法从

标本皮肤组织中提取的 DNA 产量和质量都较低,实验的稳定性不高;从趾垫中提取的 DNA 效果较好,但是对标本的损坏较大^[3]。本研究旨在通过鸟类剥制标本的皮肤组织和羽毛中提取 DNA 的实验,探讨一种耗资小、成功率高的鸟类剥制标本 DNA 提取方法。

基金项目 国家自然科学基金资助(No.30470258);

* 通讯作者, E-mail: zlemihan@yahoo.com.cn;

第一作者介绍 吴唤玲,女,硕士研究生,研究方向:动物分子生物学, E-mail: whl20032003@126.com

收稿日期 2006-03-20,修回日期 2006-11-06

1 材料与方法

1.1 材料 用于 DNA 提取的组织样品共 10 个,鸟类剥制标本取自安徽大学标本馆(标本 1~7)、安徽师范大学标本馆(标本 8、9),样品为勺鸡(*Pucrasia macrolopha*)假剥制标本,采集制作于 20 世纪 80~90 年代;阳性对照为勺鸡新鲜肌肉组织,-70℃保存。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

① 皮肤样品一律用灭菌的剪刀取约 0.4 cm²(0.01 g),除去皮肤表面附着物,剪碎至 1 mm²以下,置于 Eppendorf 管中;拔 2 枚羽毛(尾羽),用灭菌的剪刀剪取羽根,约 1 cm,剪成 2~3 段,置于 Eppendorf 管中;

② 加入 500 μl 无水乙醇^[4],振荡后静置 30 min,4 500 r/min 离心 6 min,去上清液;

③ 无菌水振荡,4 500 r/min 离心 6 min,去上清;重复 2 次;

④ 加入 500 μl 浸泡液(10 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, pH 8.0),室温放置 1 h,4 500 r/min 离心 6 min,去上清液;

⑤ 加 500 μl 去离子水,振荡,6 000 r/min 离心 6 min,倾去上清;快速重复两次;

⑥ 加 400 μl 消化液(100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 25 mmol/L EDTA, 0.5% SDS, 1 mg/ml 蛋白酶 K, pH 8.0),55℃,2~3 h。

之后的步骤参照陈旧皮张 DNA 提取方法^[1]的⑥~⑩步。为防止提取过程中外源 DNA 的污染,用无菌滤纸代替皮肤组织和羽毛作阴性对照,用勺鸡新鲜肌肉组织作阳性对照,提取过程同标本提取过程。为比较实验结果,参照标准方法^[8]从标本的皮肤组织提取 DNA。

实验取剥制标本的皮肤组织样品 9 份,羽毛样品 9 份,新鲜肌肉组织样品 1 份。对皮肤组织样品,按陈旧皮张 DNA 提取方法^[1]作了对照实验。为减少实验误差,每一样品作 2 个重复实验。

1.2.2 PCR 扩增 为了验证提取物是目标 DNA 及其作为 PCR 扩增模板的有效性,对提取

的 DNA 进行了 PCR 扩增,并与已知目的片段进行比对。PCR 扩增反应体系 50 μl,包括 25~50 ng 以上的 DNA, 2.5 U *Taq* 酶(Promega 公司, 5 U), 5 μl 10× buffer, 5 μl 25 mmol/L MgCl₂, 1 μl 20 μmol/L primers, 5 μl 2 mmol/L dNTPs (Promega 公司)。用于扩增 mtDNA 控制区的引物参照 GenBank 勺鸡线粒体控制区序列(AF230310)设计:上游 5'-cgaagtcacatctgtgcgttattctac-3' 和下游 5'-aatgtttgttctcgaggtttgttc-3',引物由上海生物工程技术公司合成,扩增产物约 420 bp。扩增反应每个循环条件为:变性,94℃,40 s;退火,54℃,40 s;延伸,72℃,40 s;反应前 95℃预变性 4 min,25 个循环后在 72℃延伸 5 min,4℃保存。对 PCR 产物进行纯化,纯化试剂盒购于 V-gene 公司,纯化产物由上海博亚生物技术公司(BioAsia)测序。

2 结果

2.1 DNA 提取结果 包括重复实验样品在内的总 DNA 提取物经琼脂糖凝胶电泳检测,结果

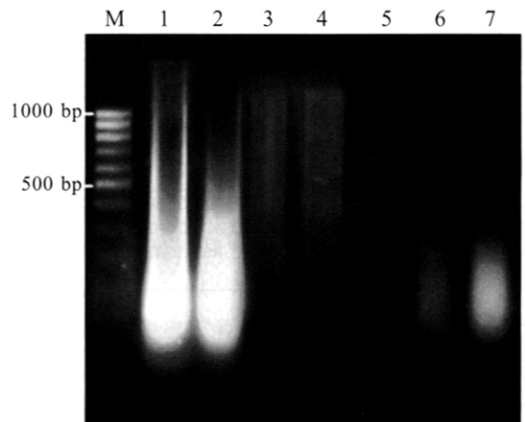


图 1 提取的总 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 The agarose electrophoresis patterns of the extracted total DNAs

M:100 bp 分子量标记;1、2.标本的皮肤组织;3、4.标本的羽毛;5.阴性对照;6、7.标本的皮肤组织,依照饶刚等^[1]方法提取。

M:100 bp molecular weight marker; 1、2.The DNAs extracted from the dried skin of specimens; 3、4.The DNAs extracted from the feathers of specimens; 5.Negative control; 6、7.The DNAs extracted from the dried skin of specimens using the method of Rao^[1].

如下(图 1 给出代表性的电泳图谱):27 个皮肤组织样品有 16 个有明显条带(约占 60%),且片段较长,但也含有较多的短片段(泳道 1、2);27 个羽毛样品有 24 个有明显条带(约占 90%),条带中的短片段较少(泳道 3、4);按陈旧皮张 DNA 提取方法^[1]提取的 27 个皮肤组织样品全部有条带出现,但全部是小于 300 bp 的短片段(泳道 6、7)。

2.2 PCR 的扩增结果 扩增结果见图 2。使用本方法从鸟类剥制标本皮肤组织和羽毛中提取的 DNA 扩增结果分别如泳道 3、4 和 5、6 所示,均可扩增出约 400 bp 的条带。泳道 1 阴性对照无条带,表明 DNA 提取过程和 PCR 扩增过程未受到外源 DNA 的污染,泳道 2 是从新鲜肌肉组织提取 DNA 的阳性对照。标本 DNA 扩增产物的测序结果和阳性对照与 GenBank 已知勺鸡线粒体 DAN 控制区序列比对,证明所扩增序列为目的 DNA。比对结果见表 1。

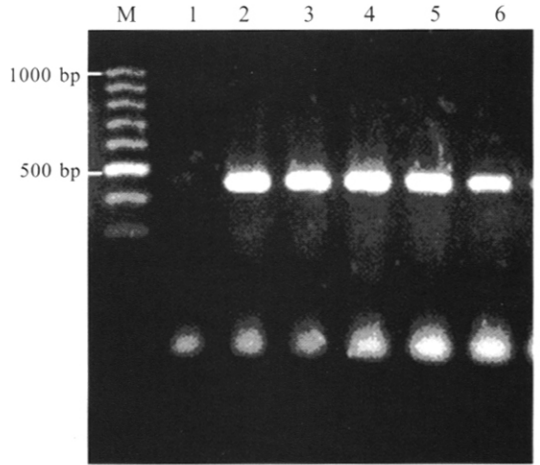


图 2 提取的 DNA 扩增结果

Fig.2 PCR results of the extracted DNAs

M:100 bp 分子量标记; 1. 阴性对照; 2. 阳性对照; 3、4. 标本的皮肤组织; 5、6. 羽毛。

M: 100 bp molecular weight marker; 1. Negative control; 2. Control amplification; 3、4. The dried skin of specimens; 5、6. The feather of specimens.

表 1 勺鸡线粒体控制区目标序列比对

Table 1 Alignment of the Koklass mtDNA partial sequences of the control region

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1	CTAAGCCATTATATGTA	AAAGGACATAC	TATCTAT	TATCCCATTTCT	CCCAATGTAC	ACTCGT	GCATGCTCT	AAACACCT	AAACAGCT	CAGACTACCAT
2	CTAAGCCATTATATGTA	AAAGGACATAC	TATCTAT	TATCCCATTTCT	CCCAATGTAC	ACTCGT	GCATGCTCT	AAACACCT	AAATAGCT	CAGACTACCAT
3	CTAAGCCATTATATGTA	AAAGGACATAC	TATCTAT	TATCCCATTTCT	CCCAATGTAC	ACTCGT	GCATGCTCT	AAACACCT	AAATAGCT	CAGACTACCAT
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
1	AAC TTGGTACAGAA	CCCAAGAGAC	CCATGATAT	GAATGGTTAC	AGGACATA	AGCTCCAAT	TCCTTATGTT	CTAGTTCAT	TTGGCTAT	GCATGCTGCTGTA
2	AAC TTGGTACAGAA	CCCAAGAGAC	CCATGATAT	GAATGGTTAC	AGGACATA	AGCTCCAAT	TCCTTATGTT	CTAGTTCAT	TTGGCTAT	GCATGCTGCTGTA
3	AAC TTGGTACAGAA	CCCAAGAGAC	CCATGATAT	GAATGGTTAC	AGGACATA	AGCTCCAAT	TCCTTATGTT	CTAGTTCAT	TTGGCTAT	GCATGCTGCTGTA
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
1	AGATGGATTTAT	TGATGTA	CACTCA	AGAGAT	CAGCA	CCOCTGC	TGTAAT	GTA	CTT	CATGACTAGCTTC
2	AGATGGATTTAT	TGATGTA	CACTCA	AGAGAT	CAGCA	CCOCTGC	TGTAAT	GTA	CTT	CATGACTAGCTTC
3	AGATGGATTTAT	TGATGTA	CACTCA	AGAGAT	CAGCA	CCOCTGC	TGTAAT	GTA	CTT	CATGACTAGCTTC
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
1	TG	CCCTCT	GTCTTT	TGG	CGCTCT	GGTTC	CTGGT	CAG	GAACAT	CCCGTGT
2	TG	CCCTCT	GTCTTT	TGG	CGCTCT	GGTTC	CTGGT	CAG	GAACAT	CCCGTGT
3	TG	CCCTCT	GTCTTT	TGG	CGCTCT	GGTTC	CTGGT	CAG	GAACAT	CCCGTGT
	410									
1	TTCTAC	CCCTTT	TCAG	TC						
2	TTCTAC	CCCTTT	TCAG	TC						
3	TTCTAC	CCCTTT	TCAG	TC						

1. GenBank 已知勺鸡控制区目标 DNA 序列; 2. 阳性对照; 3. 标本。

1. The sequence from GenBank; 2. The sequence of the control amplification; 3. The sequence of the extracted DNA obtained by using our method.

3 讨 论

3.1 鸟类剥制标本 DNA 的特征 图 1 中泳道 6 和 7 是按陈旧皮张 DNA 提取方法^[1]提取的 DNA,由于标本制作过程中防腐处理和长时间保存严重影响 DNA 的质量,因此电泳图谱仅有分子量较小的拖尾部分,为降解的 DNA。相对饶刚等^[1]的方法,本实验提取的 DNA 片段较大、量也较多。鸟类皮张较薄,标本制作过程中,为了脱水、防止霉变要加大量的药剂,如 CaCl_2 、硼酸,这些药剂可能对皮肤组织和羽毛有破坏作用。标本在长期保存过程中,氧化、辐射等作用会改变 DNA 的亚硝酸基和分子骨架^[5];去氨基、脱嘌呤和其他水解过程会造成 DNA 分子的不稳定和断裂,导致标本所含的 DNA 片段短、含量少^[5]。

3.2 鸟类剥制标本 DNA 提取预处理和抽提过程的改进 关于生物标本 DNA 的提取,许多学者做过研究,但往往存在着样品用量大、实验周期长、操作步骤繁琐等不足^[1]。对于小型动物标本,样品用量大则会对标本产生明显的损害;实验周期长则会增加 DNA 在提取过程中的降解,操作步骤复杂会造成提取过程中 DNA 得率的降低。

基因组 DNA 的有效提取是进行任何 DNA 后续实验工作的前提和基础^[6]。标本 DNA 大多降解,常规的 DNA 提取方法,很难从标本中有效提取 DNA。本实验对常规提取方法进行了改进:①样品用量减少,在很大程度上克服了小型动物取材难的问题,减少 DNA 提取和纯化的时间,降低了混入 DNA 抑制剂的量;②预处理用无水乙醇浸泡,去除皮肤表层残留的脂溶性成分,同时对皮肤组织和羽毛进行了清洗及消毒^[6];③用高浓度 Na 盐浸泡液浸泡,可软化组织,减少消化时间,此外高浓度金属离子可抑制 DNA 的降解^[7];④在抽提 DNA 时使用酚/氯仿/异戊醇和氯仿先后进行抽提,可以有效去除残留在 DNA 中的蛋白酶 K、酚等影响 PCR 扩增的杂质^[8]。好的 DNA 沉淀为白色,干后透明。如干后仍呈白色,则表示蛋白质较多,若呈黄色

至棕色,则是有多酚类杂质;若呈现胶冻状,含有多糖类物质^[6]。在从皮肤组织提取 DNA 的过程中,经常在乙醇沉淀离心一步,管底有黄色或其他较深颜色,因此表明残留有酚类物质^[6],可重复氯仿抽提过程,如管底出现胶冻状,则注入无菌水,再加入 0.35 倍体积的无水乙醇,迅速混匀,多糖会先沉淀^[9]。

无水乙醇浸泡和浸泡液浸泡两个步骤,减少了基因组 DNA 提取过程中可能造成的机械断裂^[10],是方法的关键。当剪碎的标本皮肤组织置于无水乙醇中时,可能去除了皮肤组织表面的脂溶性物质。脂肪是水不溶性的,如不去除,会影响标本与浸泡液和消化液的充分接触,造成消化不良,降低提取的 DNA 量,并且浪费标本。同时无水乙醇去除了标本表面的污染。标本在制作和保存过程中失水,用高浓度 Na 盐浸泡液,主要目的是软化组织、减少消化时间,同时浸泡液去除残留在标本皮肤组织和羽毛中的无水乙醇。

3.3 实验问题讨论 从标本中提取的 DNA 成分复杂,即使置于低温冰箱,长时间放置也可能变性。所以对于从标本中提取的 DNA 要及时进行下一步实验,也可分装保存,避免反复冻融。另外,从标本中提取的 DNA 溶液,可能存在成分不均一的现象,在利用标本 DNA 进行后续实验时,要将溶液完全溶解,混匀后吸取。

本试验分别从 9 个剥制标本的皮肤组织和羽毛中提取 DNA,并将提取的 DNA 进行 PCR 扩增,各做两次重复实验。统计扩增产物表明,从皮肤组织中提取的 DNA 扩增成功率达到 60% 左右,从羽毛中提取的 DNA 扩增成功率可达 90%。作者认为导致从标本皮肤组织提取的 DNA 扩增成功率不高的原因可能为抑制剂的干扰^[11]。

致谢 感谢安徽师范大学吴孝兵教授提供部分样品。

参 考 文 献

[1] 饶刚,李明,牛屹东等.陈旧皮张中 DNA 提取的新方法.

- 动物学杂志 2001 **36**(34) 53 ~ 57.
- [2] 杜世章, 陈立侨. 从动物固定标本中提取 DNA 的方法研究. *四川大学学报* 2004 **41**(4) 893 ~ 895.
- [3] Marton R H, Begona Martinez-cruz, Juan J, *et al.* An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology* 2005 **36**(1) 84 ~ 88.
- [4] 张迎春, 刘波, 郑哲民等. 不同保藏处理的昆虫标本 DNA 提取及其随机扩增多态 DNA 反应. *昆虫学报*, 2002 **45**(5) 693 ~ 695.
- [5] 庞峻峰, 张亚平. 标本 DNA 研究进展. *动物学研究*, 2001 **22**(6) 490 ~ 496.
- [6] 邵鹏柱, 曹晖. *中药分子鉴定*. 上海: 复旦大学出版社, 2004, 49 ~ 67.
- [7] 王义权, 周开亚, 徐珞珊等. 不同固定剂保存动物组织标本对 RAPD 反应的影响. *动物学杂志*, 1999 **34**(1) 33 ~ 37.
- [8] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. *分子克隆实验指南*(第三版). 北京: 科学出版社 2002 468 ~ 469, 1 587.
- [9] Michaels S D, John M C, Amasino R M. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. *Bio Techniques* 1994 **17**(2) 274 ~ 276.
- [10] 朴美花, 陈学新, 何俊华. 膜翅目昆虫干标本的基因组 DNA 提取. *动物分类学报* 2002 **27**(4) 672 ~ 676.
- [11] Fernando R, Vidya T N C, Dangolla A, *et al.* Reliable noninvasive genotyping: fantasy or reality? *Journal of Heredity* 2003 **94**(2) 115 ~ 123.