

一种提取蜘蛛基因组 DNA 的有效方法

陈国亮 邵爱云 孟清*

(东华大学生物科学与技术研究所 上海 201620)

摘要: 介绍了用尿素法提取蜘蛛基因组 DNA。通过与其他 DNA 提取方法相比较,证明尿素法具有可在室温条件下进行、DNA 得率高、完整性好、简单快速等优点。以提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,获得预期大小的、高重复、高 GC 含量的编码蜘蛛牵引丝蛋白基因的 DNA 片段。

关键词: 蜘蛛;基因组 DNA;DNA 提取;PCR 扩增

中图分类号:Q81 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2007)06-64-05

A Efficient Method for Extraction of Spiders' Genomic DNA

CHEN Guo-Liang SHAO Ai-Yun MENG Qing*

(*Institute of Biological Sciences and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China*)

Abstract: The present paper deals with the urea lyses method for isolating spiders' genomic DNAs. Compared to other two known methods, this method produced spider genomic DNAs with higher yields and higher integrity. It is also simpler and less time-consuming, involving only room temperature manipulations. High quality genomic DNAs were isolated from spider by this method. Certain spider dragline gene fragments, which contain highly repetitive sequences of high GC contents, were successfully PCR-amplified.

Key words: Spider; Genomic DNA; DNA extraction; PCR amplification

研究表明,蜘蛛牵引丝具有特殊的结构,呈现出非常优良的物理化学性质:强度高(6.4~8.2 cN/dtex),是钢丝的5~10倍;弹性大,断裂伸长为36%~50%,是人造纤维的3~10倍,可以吸收巨大的能量^[1~3];密度低,络新妇属蜘蛛(*Nephila*)的牵引丝密度为1.113~1.129 g/cm³,比蚕丝密度(1.133 g/cm³)还低^[4];抗辐射;耐火、耐热、耐低温,200℃以下表现热稳定性,300℃以上才黄变,在零下40℃时仍有弹性,只有在更低的温度下才变硬^[5];具有独特的三维空间网状结构^[6],可提供机械稳定性和足够的孔穴,通透性高,促进营养物质的流动和吸收;耐疲劳;具有可湿性、电荷分布和亲水性等表面性质^[3~5];具有非凝血酶解性质;具有生物可降解性,是可循环再生的材料^[7]。

鉴于上述特性,蜘蛛丝在军事、航天、建筑、

农业、食品以及医学、保健等领域都有广泛的应用前景,如用作防弹衣、坦克和飞机的装甲、宇航服、桥梁建筑物的复合材料、人工筋腱和缝合线等的高性能生物材料^[3,7]。因此,其结构、功能、以及应用的研究一直是生物学领域研究的热点问题。但是,蜘蛛吐丝量远比家蚕少,且有同类相食的特性^[8],无法像家蚕一样通过驯化的方法高密度养殖,以大量获得蜘蛛丝,于是,利用基因工程的方法获得天然蛛丝蛋白就成为研究开发的必由之路。

基金项目 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(No.2006AA03Z0451);

* 通讯作者,E-mail:mengqing@dhu.edu.cn;

第一作者简介 陈国亮,男,硕士研究生;研究方向:生物化学与分子生物学,E-mail:chengguoliang@mail.dhu.edu.cn。

收稿日期2007-07-05,修回日期2007-09-17

蜘蛛拥有7套产丝腺,分别产生7种不同类型的纤维和胶黏物,这些丝或胶黏物具有不同的理化性质,但其化学本质都是蛋白质,主要由丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸组成^[9,10],构成蜘蛛丝的蛋白质大部分来源于非必需氨基酸。为了获得天然活性的工程蛛丝蛋白,首先必须得到编码这些丝蛋白的完整基因,然后再进行克隆表达,因此,获得高质量的基因组 DNA 是非常重要的。使用传统 SDS 法提取蜘蛛基因组 DNA 需要蛋白酶 K,费时、费力、成本高^[11];用基因组 DNA 提取试剂盒提取蜘蛛基因组 DNA 的成本很高,且商品化的基因组 DNA 提取试剂盒都不是以蜘蛛为标准研制的,提取蜘蛛基因组 DNA 的质量不能保证^[12]。本文以蜘蛛为实验材料,在借鉴其他提取方法的基础上^[12-15],提出一种简便、实用的蜘蛛基因组 DNA 提取方法,为进一步克隆、表达氨基酸编码基因打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料 大腹圆蛛(*Araneus ventricosus*)采自松江大学城周围树丛中,将活体带回实验室,冻存于-80℃冰柜备用。

1.2 试剂及溶液

1.2.1 尿素裂解缓冲液 8 mol/L 尿素,100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),50 mmol/L Na₂EDTA (pH 8.0),0.5 mol/L NaCl。

1.2.2 试剂 10% SDS(十二烷基硫酸钠)+10% LDS(N-十二烷基肌氨酸钠)的预混液,Tris 饱和酚 氯仿 异戊醇(25:24:1),无水乙醇,氯仿,70% 乙醇,5 mol/L NaCl,BME(β 巯基乙醇),TE(0.01 mol/L Tris-HCl,0.01 mol/L EDTA pH = 7.6)。DNA 提取试剂盒(TIANamp Genomic DNA Kit DNA)购自天根生化(Tiangen)。

1.3 方法 取蜘蛛附肢用灭菌双蒸水冲洗后用灭菌滤纸吸干,避免异源生物的干扰^[15]。

1.3.1 尿素法 (1)在高压灭菌的离心管中加入534 μ l 尿素裂解缓冲液 60 μ l 10% SDS + 10% LDS 的预混液(终浓度各为1%)和6 μ l 的

β 巯基乙醇(终浓度为1%),置于冰上预冷。

(2)研磨:取已处理好的蜘蛛附肢肌肉于上述裂解缓冲液中,用特制的与离心管相匹配的小杵充分研磨。(3)裂解:将上述裂解混合液室温放置1h或更长时间,充分裂解。(4)酚 氯仿 异戊醇抽提:加入等体积的酚 氯仿 异戊醇,颠倒混匀,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液。(5)氯仿抽提:在上清液中加入等体积氯仿,颠倒混匀,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液。重复此步,直至水相与有机相的界面处看不到白色的蛋白质层为止。(6)沉淀:DNA 在上清液中加入等体积的异丙醇,用带弯钩的镍丝将 DNA 沉淀挑出,溶于200 μ l TE 中。(7)在上述溶液中加入1/10 体积5 mol/L NaCl 和预冷的2.5 倍体积的无水乙醇,沉淀 DNA,混匀,20℃冰箱内放置30 min,12 000 r/min 离心 15 min,弃上清相。(8)洗涤 DNA:在留有沉淀的离心管中加入70% 无水乙醇1 ml,洗涤 DNA,8 000 r/min 离心 5 min,弃上清相,重复一次。(9)保存:自然干燥,加入100 μ l TE 溶解,冰箱内4℃保存备用。

1.3.2 CTAB 法 CTAB 法^[13]与尿素法的主要区别在于提取缓冲液及裂解温度不同。CTAB 提取缓冲液为:100 ml 2×CTAB 中含 CTAB(十六烷基三乙基溴化铵)2 g,NaCl 0.14 mol,Tris-HCl 0.01 mol (pH 8.0),EDTA 0.02 ml,PVP(聚乙烯吡咯烷酮)2 g;裂解温度为65℃。简要步骤如下:(1)研磨:取已处理好的蜘蛛附肢于装有600 μ l 提取缓冲液和10 μ l BME 的1.5 ml 离心管中,加入少量石英砂,用特制的与离心管相匹配的小杵研磨。(2)裂解:65℃水浴3~5h,其间不时上下颠倒,直至混合液消化得很清亮。抽提、沉淀、洗涤及保存操作可与尿素法的相应步骤相同。详细步骤参见参考文献^[13]。

1.3.3 改进的基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Genomic DNA Kit,Tiangen) 按试剂盒说明提取 DNA,用前在其缓冲液 GA 中加入1/10 体积的0.2 mol/L EDTA。

1.4 DNA 样品的检测 用U-0080D 型分光光度计(HITACHI)测定 DNA 样品在260 nm 和

280 nm 的 OD 值,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA。

1.5 PCR 扩增 参考 Hnman 报道的双世纪圆蛛 (*A. bicentenarius*) 牵引丝基因核苷酸序列 (NCBI G :ABU20328)^[16] 设计引物。引物 1 :5'-CCG CTC GAG CAG CGT CTC GTC TGT CTT CCT G-3' ;引物 2 :5'-CCG GAA TTC AAC AGG AGC AGC AAC CCG AAC TG-3' 。

将 3 种方法提取的 DNA 稀释 200 倍作为模板进行 PCR,扩增蜘蛛牵引丝基因。反应体积为 50 μ l, 38 μ l ddH₂O, 1 μ l 模板 DNA, 引物 1、2 各 1 μ l (10 μ mol/L), 4 μ l 4 \times dNTP (2.5 mmol/L), 5 μ l 10 \times Buffer, 0.5 μ l Long *Taq* DNA 聚合酶 (2.5 U μ l, Tiangen)。PCR 条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 复性 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 末端补平 5 min。

2 结果与讨论

用上述 3 种方法多次并行提取蜘蛛基因组 DNA。为避免操作上的差异,各步操作均由同一人进行,以尿素法和 CTAB 法各提取 10 次,每次平行提取 8 个样本,每个样本约 33 ng 新鲜附肢肌肉,用 DNA 提取试剂盒先后提取

20 次,每次 1 个样本。提取的 DNA 样品用紫外分光光度计、琼脂糖凝胶电泳和 PCR 扩增等方法进行评估,各项结果汇总平均,分别见表 1 和图 1、2。提取的 DNA 样品经 U-0080D 型 Spectrophotometer (HTACH) 测定表明:尿素法和 CTAB 法提取的 DNA 样品 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值均在 1.7~1.9 之间,试剂盒提取的 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值均在 2.3 以上;尿素法提取的 DNA 产率最高,约为 160 ng/ng;CTAB 法提取的 DNA 产率约为 90 ng/ng。

3 种方法提取的蜘蛛基因组 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)。结果显示,尿素法提取的基因组 DNA 大于 23 kb,条带清晰完整,未发生降解(无弥散状条带出现);CTAB 法提取的基因组 DNA 集中在 23 kb 处,条带清晰完整,降解率较低;用 TIANamp Genomic DNA Kit 提取蜘蛛基因组 DNA 时,得到的 DNA 全部降解成约 500 bp 的片段,如果在其缓冲液 GA 中加入 1/10 体积的 0.02 mol/L EDTA,可得到较大分子的基因组 DNA,但降解现象仍较严重,电泳时大部分 DNA 小于 23 kb。可见尿素法提取的效果最好,CTAB 法次之,TIANamp Genomic DNA Kit 最差。

表 1 不同方法提取 DNA 的结果及其用于 PCR 的扩增效率

Table 1 The results of extracting DNA in different methods and the efficiency of PCR amplifications

提取方法 Methods of extraction	提取次数 每次样本数 Times of extraction (Number of samples)	电泳可见率 Visible in Electrophoresis (%)	DNA 的大小 Size of the genomic DNA(kb)	PCR 成功率 Rates of successful PCR amplification (%)
尿素法 Urea extraction method	10 (8)	100	> 23	100
CTAB 法 CTAB extraction method	10 (8)	100	< 23	100
DNA 提取试剂盒* TIANamp Genomic DNA Kit	20 (1)	100	< 23 且降解严重	0

* 此为改进后的试剂盒,改进之前得不到大分子基因组 DNA,所提取的 DNA 全部降解为 500 bp 附近的碎片。

* This genomic DNA extraction kit was modified and improved. The original kit failed to produce large DNA fragment, with most of the resulting DNAs being around 500 bp in size.

高浓度的尿素属中强度变性剂,通过离子间的相互作用,打断蛋白质分子内和分子间的各种化学键,破坏蛋白质的高级结构,以改变它在溶液中的氢键结构,使多肽伸展,暴露亲水基

团。同时,尿素裂解液中加入高浓度的 EDTA (50 mmol/L)、N-十二烷基肌氨酸钠 β 巯基乙醇和 SDS,抑制了大部分 DNA 酶的活性;还原剂 β 巯基乙醇可断开蛋白质分子内二硫键,还可

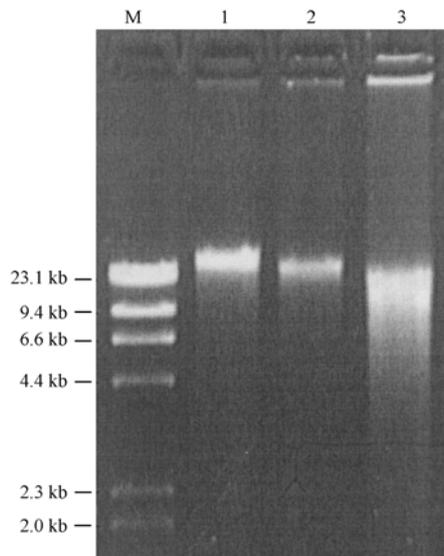


图1 3种方法提取的蜘蛛基因组DNA凝胶图

Fig.1 Gel analysis of spider genomic DNAs isolated using three different methods

M λ DNA *Hind* III DNA 分子量标记;1. 尿素裂解法;
2. CTAB 法;3. TIANamp Genomic DNA Kit 方法。

M λ DNA *Hind* III DNA marker ;1. The urea lyses method ;
2. The CTAB method ;3. The TIANamp Genomic DNA Kit method .

防止 DNA 断裂并重聚为二聚体;N-十二烷基肌氨酸钠和 SDS 是较强的阴离子去垢剂,破坏蛋白内的疏水键,破坏细胞组分,使蛋白质变性,溶解蛋白质。高浓度的尿素与这些试剂联合使用,导致细胞释放的各种 DNA 酶类的裂解变性速度加快,对基因组 DNA 的降解几率降低,同时,肌肉组织在此高浓度的裂解液中不形成沉淀,呈悬浮状,在裂解过程中不用颠倒混匀,避免了流体剪切力对高分子量 DNA 的剪切作用,适合高分子量基因组 DNA 的提取。但要注意,尿素在偏碱性的环境中(pH 8.0~9.0)不稳定,一般不要超过 pH 10.0,作用时间较长或温度较高时(超过 30℃)会裂解形成氰酸盐,对蛋白质肽链的自由氨基进行甲酰化共价修饰,改变蛋白质的等电点。

所提取基因组 DNA 的纯度和完整性直接影响后续 PCR 扩增效果,尤其是蜘蛛牵引丝的编码基因中存在高度重复区,其 GC 含量很高,影响更为严重^[3,17]。采用尿素提取法获得的蜘蛛基因组 DNA 为模板,PCR 扩增多重和高 GC 含量的蜘蛛牵引丝基因,获得预期大小的 DNA 条带,琼脂糖凝胶电泳中条带清晰,并呈现出预期的规律性的重复 DNA 条带(图2)。

蜘蛛基因组 DNA 为模板,PCR 扩增多重和高 GC 含量的蜘蛛牵引丝基因,获得预期大小的 DNA 条带,琼脂糖凝胶电泳中条带清晰,并呈现出预期的规律性的重复 DNA 条带(图2)。

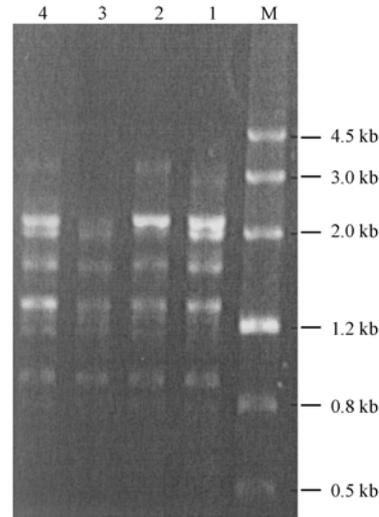


图2 蜘蛛牵引丝基因的PCR扩增

Fig.2 Gel analysis of PCR amplified spider dragline gene fragments

M DNA Marker III ;1~4. 用尿素法在不同时间提取的蜘蛛基因组 DNA 为模板进行 PCR 的产物。

M DNA Marker III ;1~4 show PCR products from four samples of spider genomic DNA respectively that were isolated at different times using the urea lyses method .

用尿素法提取蜘蛛基因组 DNA 与其他方法相比,还具有如下的优点:(1) 裂解过程中不形成沉淀,呈悬浮状,不用颠倒混匀,避免了流体剪切力对高分子量 DNA 的剪切作用,适合高分子量基因组 DNA 的提取;(2) 提取条件宽松:尿素裂解法无需在液氮中研磨,无需用匀浆器匀浆;(3) 操作简便、无需严格的低温:尿素法的提取各步骤均可在室温进行;(4) 无需昂贵的试剂:传统提取方法中用到的蛋白酶 K 及 RNase 酶等价格较昂贵,尿素法中都无需使用,成本低。因而,尿素法不失为一种较好的蜘蛛基因组 DNA 提取方法。

参 考 文 献

- [1] Lazaris A, Arcidiacono S, Huang Y, et al. Spider silk fibers

- spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science* 2002 **295**(5 554) :472 ~ 476 .
- [2] Hnman M B , Jones J A , Lewis R V . Synthetic spider silk : a modular fiber . *Trends in Biotechnology* , 2000 , **18** (9) : 374 ~ 379 .
- [3] Vollrath F . Strength and structure of spiders' silks . *Reviews in Molecular Biotechnology* 2000 **74**(2) :67 ~ 83 .
- [4] 潘志娟,邱芯薇.蜘蛛丝的物理性能研究.苏州大学学报 2003 **23**(1) :18 ~ 22 .
- [5] 潘志娟,陈宇岳,盛家镛.蜘蛛丝的热性能研究.丝绸, 2002 ,(10) :13 ~ 16 .
- [6] 潘志娟,盛家镛,陈宇岳.大腹圆蛛牵引丝的结构与性能分析.中国纺织大学学报 2000 **26**(5) :82 ~ 84 .
- [7] 章文贤,李敏,涂桂云等.组织工程新材料蜘蛛拖丝蛋白的重组培养.中国临床康复,2003 **7**(20) :2 782 ~ 2 784 .
- [8] 潘红平,徐蕴丽,周放等.蜘蛛的人工养殖技术.广西畜牧兽医 2003 **19**(6) :271 ~ 273 .
- [9] Winkler S , Kaplan D L . Molecular biology of spider silk . *Reviews in Molecular Biotechnology* 2000 **74**(2) :85 ~ 93 .
- [10] 潘志娟,刘敏,盛家镛.大腹圆蛛丝蛋白的氨基酸组成分析.丝绸 2003 ,(12) :22 ~ 26 .
- [11] 王龙武,徐克前,罗识奇.基因组DNA提取方法及进展.上海医学检验杂志 2002 **17**(6) :379 ~ 381 .
- [12] 童丽娟,王亚军,潘志崇等.蜘蛛基因组DNA提取方法的比较.动物学杂志 2002 **37**(6) :53 ~ 55 .
- [13] 文菊华,颜亨梅.一种蜘蛛基因组DNA的简易提取方法.蛛形学报 2005 **14**(2) :126 ~ 128 .
- [14] 包英华,白音,谭庆辉等.美花石斛基因组DNA提取方法的比较.热带亚热带植物学报 2007 **15**(2) :147 ~ 151 .
- [15] 赵双宜,吴耀荣,夏光敏.介绍一种简单高效的植物总RNA提取方法.遗传 2002 **24**(3) :337 ~ 338 .
- [16] Hnman M B , Lewis R V . Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin . *Nephila daxipes* dragline silk is a two-protein fiber . *J Biol Chem* , 1992 , **267** (27) : 19 320 ~ 19 324 .
- [17] Pouchkina-Startcheva N N , McQueen- Mason S J . Molecular studies of a novel dragline silk from a nursery web spider , *Euprosthenops* sp . (Pisauridae) . *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 2004 **138** :371 ~ 376 .

欢迎订阅2008 年《动物学杂志》

《动物学杂志》是中国科学院动物研究所、中国动物学会主办的科技期刊,亦是中国自然科学核心期刊。主要报道动物学领域的最新研究成果,介绍有创见的新思想、新学说、新技术、新方法。报道范围既有宏观生态研究,又有微观实验技术。报道层次既有科学前沿性、资料性的,也有技术性、知识性的。稿件内容涉及范围广,实用性强,主要栏目有:研究报告、珍稀濒危动物、技术与方法、研究简报和快讯、科技动态等等。读者对象为动物科学领域的研究、教学、技术、管理人员及广大业余爱好者。

近年《动物学杂志》各项统计指标有了很大的提高,是国内各大数据库及国外著名数据库英国《动物学记录》、美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》收录的源期刊。

《动物学杂志》双月刊,16开,112页,2008年每册定价30元,全年180元,国内外公开发行。国内邮发代号2-422;国外发行代号(Code No.):BM58。全国各地邮局均可订阅。如未能在当地邮局订到,可与编辑部直接联系。本刊对在校学生及个人订户7折优惠(直接与编辑部联系订阅)。

地址:北京市朝阳区大屯路 中国科学院动物研究所内《动物学杂志》编辑部

邮编:100101;电话:(010)64807162;

E-mail :journal@ioz.ac.cn。网址:bird.chinajournal.net.cn;dwzz.ioz.ac.cn。

欢迎投稿、欢迎订阅、欢迎刊登广告。