

# 不同固定剂保存动物组织标本对 RAPD 反应的影响\*

王义权 周开亚\*\* 徐珞珊 徐国钧

(中国药科大学生药研究室 南京 210009)

**摘 要** 为解决野外采集动物标本时,有效地保存好标本,并方便地带回实验室用于 RAPD 分析的难题,该研究以同一个体的冻存组织为对照,比较了从 4 种不同固定剂保存的组织标本中提取 DNA,并用于 RAPD 扩增。结果表明,用含 50mmol/L EDTA 的 70% 乙醇作为固定剂最好,这种固定剂固定的标本,夏季室温下至少可以保存两个月,不影响其中的 DNA 提取和扩增结果。

**关键词** 固定剂 标本保存 DNA 提取 RAPD

随机扩增多态性 DNA(RAPD)是以聚合酶链反应(PCR)为基础,在 90 年代初发展起来的一种用于检测动植物遗传多态的方法<sup>[1]</sup>,由于其方法简便易行,尤其是在对所研究物种没有任何分子生物学研究资料的情况下,可以对研究对象作基因组 DNA 多态性分析。因此, RAPD 技术很快被用于动植物的遗传育种、基因图谱的构建、品种鉴定、物种形成和系统演化

等方面的研究中<sup>[2~7]</sup>。但在 RAPD 分析中,所

---

\* 国家自然科学基金(39470098)和中国博士后科学基金([1996]2 号)资助项目;

\*\* 南京师范大学生物多样性与分子进化研究室 南京 210097;

第一作者介绍:王义权,男,40 岁,副教授。现在工作单位:南京师范大学生物系 南京 210097;

收稿日期:1997-05-22,修回日期:1997-10-21

用引物短,复性温度低,允许有较高的错配率,影响其稳定性的因素较多<sup>[8~11]</sup>,特别是 RAPD 分析对 DNA 模板质量的要求较高,通常均从新鲜的组织材料中提取高分子量的基因组 DNA 作为模板,如组织新鲜度不够,细胞内的 DNA 发生降解,则难以提得可用于 RAPD 分析的高质量模板 DNA,导致 RAPD 扩增结果不稳定。

在野生动物的研究中,多很难把野外采得的活标本带到实验室,而野外工作条件下取材,在保存和运输途中也不易保持所取材料的新鲜状态,使得 RAPD 分析在野生动物的研究中受到局限。为解决把野外采集到的动物或动物组织标本保存好,并方便地携带至实验室用于 RAPD 分析的困难,我们比较了从不同固定剂固定保存组织标本中提取模板 DNA 对 RAPD 扩增结果的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 动物标本及处理** 黑眉锦蛇 *Elaph taenirua* (♂) 和双斑锦蛇 *E. bimaculata* (♂) 各 1 条,实验室中处死,迅速取肌肉组织 10g 左右,剪成约为 0.5cm<sup>3</sup> 的小碎块,分成 5 份,1 份装入样品袋,置 -20℃ 冰箱中速冻保存。剩下 4 份分别置 4 个盛有约 20ml 含 50mmol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)的 70% 乙醇、70% 乙醇、2.5% 戊二醛和 10% 甲醛的小广口瓶中固定。夏季室温(最高温度 39℃,最低温度 25℃)保存 70 天后用于模板 DNA 的提取。动物解剖时,用于解剖不同个体的解剖器具严格分开和清洗,防止交叉污染。

**1.2 模板 DNA 提取** 经固定剂固定的标本取出后流水冲洗过夜,次日取出,蒸馏水冲洗表面,取约 0.5g 肌肉组织于研钵内,加入液氮研成细粉,分装入 2 个 15ml 的塑料离心管中,每管加入预冷的细胞裂解液(10mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, pH8.0) 4ml,轻摇,悬浮细胞团块;向悬液中加入十二烷基硫酸钠(SDS)使终浓度为 0.8%,再加蛋白酶 K 至终浓度为 100μg/ml,混匀后置 65℃ 水浴中消化

约 4 小时,其间轻摇数次,至溶液完全透明。酚氯仿抽提至上下相间界面上无蛋白质沉淀。吸取上清,加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc(醋酸钠),2 倍体积的 -20℃ 无水乙醇沉淀 DNA。其中经两种 70% 乙醇固定的标本在 DNA 提取过程中,向提取液中缓缓加入 -20℃ 无水乙醇时,界面上出现的絮状 DNA 沉淀可用玻棒缠绕出,绕出的 DNA 用 70% 乙醇洗涤 2 次,室温自然干燥,溶于适量的 TE 缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, pH8.0,灭菌后用)中。而用 2.5% 戊二醛和 10% 甲醛固定的标本在 DNA 提取过程中,向含有 DNA 的上清中加入 -20℃ 无水乙醇时,界面上沉淀的 DNA 用玻棒无法缠绕出,故混匀后置 -20℃ 过夜,次日离心沉淀 DNA,再用 70% 乙醇洗涤 2 次后,凉干,溶于适量 TE 中。同期置 -20℃ 冷冻保存的标本用同样方法作 DNA 对照提取,也可以顺利地绕出 DNA,经 70% 乙醇洗涤后凉干,溶于 TE 中。

**1.3 引物** 所用随机引物为 Operon 公司产品,编号为 I-02(5'GGAGGAGAGG3'),I-06(5'AAGGCGGCAG3')和 I-09(5'TGGAGAGCAG3')。

**1.4 PCR 反应条件和电泳** PCR 反应用试剂、循环参数和电泳条件同前文(见参考文献 2~3),每一反应在同样条件下重复一次,结果稳定。

## 2 结果

对上述 2 个体 5 种不同处理的肌肉标本进行 DNA 提取时发现,冷冻保存的肌肉组织在加入蛋白酶 K 和 SDS 后,提取液立即变得非常粘稠,两种 70% 乙醇固定的肌肉组织提取液也较粘稠,用乙醇沉淀 DNA 时均可以用玻棒绕出 DNA,而用 2.5% 戊二醛和 10% 甲醛固定的肌肉组织提取液自始至终未出现粘稠状态,加入乙醇沉淀 DNA 时因用玻棒无法绕出 DNA,不得不用离心沉淀的方法获得总 DNA。溶解好的模板 DNA 浓度用微量荧光计检测, DNA 浓度在 30~100ng/μl 之间,经 1.2% 的琼脂糖

凝胶电泳检测结果(见图 1)。可见从  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存的新鲜组织标本、含  $50\text{mmol/L}$  EDTA 的  $70\%$  乙醇固定的组织标本和单纯  $70\%$  乙醇固定的组织标本中提得的 DNA 很少降解, 在点样孔内和约  $30\text{Kb}$  处有高分子量的 DNA, 而从  $2.5\%$  戊二醛和  $10\%$  甲醛固定的组织标本中提得的 DNA 已发生较严重的降解。

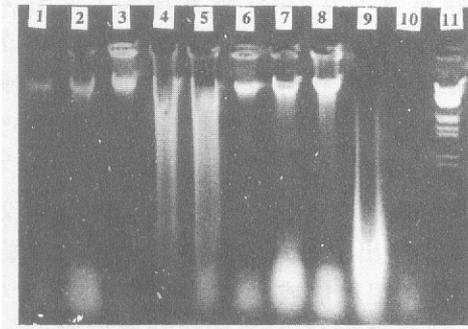


图 1 不同固定剂保存标本中提得的 DNA 琼脂糖凝胶电泳 1~5 黑眉锦蛇 *Elaphe taenirua* (♂), DNA 分别来自冻存和  $50\text{mmol/L}$  EDTA +  $70\%$  乙醇、 $70\%$  乙醇、 $2.5\%$  戊二醛、 $10\%$  甲醛固定的肌肉标本。6~10 双斑锦蛇 *E. bimaculata* (♀), DNA 分别来自冻存和  $50\text{mmol/L}$  EDTA +  $70\%$  乙醇、 $2.5\%$  戊二醛、 $10\%$  甲醛固定的肌肉标本。11 分子量标记;  $\lambda$  DNA/EcoR I + Hind III。(编号说明适用图 2)。

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from specimens preserved in different fixatives.

1~5 *Elaphe taenirua* (♂), DNA extracted from frozen muscle and muscles preserved in  $50\text{mmol/L}$  EDTA +  $70\%$  ethanol,  $70\%$  ethanol,  $2.5\%$  glutaraldehyde and formaldehyde respectively. 6~10 *E. bimaculata* (♀), DNA extracted from frozen muscle and muscles preserved in  $50\text{mmol/L}$  EDTA +  $70\%$  ethanol,  $70\%$  ethanol,  $2.5\%$  glutaraldehyde and formaldehyde respectively. 11 Molecular size marker,  $\lambda$  DNA/EcoR I + Hind III.

从不同固定剂保存蛇肌肉标本中提得的 DNA, 作模板进行 RAPD 扩增, 电泳检测结果(见图 2)。从中可见, 从含  $50\text{mmol/L}$  EDTA 的  $70\%$  乙醇固定的标本中提得的 DNA 和从冻存的标本中提得的 DNA 作模板, 二者扩增结果完全相同, 从单纯  $70\%$  乙醇固定的标本中所提得的 DNA 作模板, 扩增结果也与前者差别不大, 但用从  $2.5\%$  戊二醛和  $10\%$  甲醛固定的标本中提取的 DNA 作模板, 扩增效果很差, 通

常不易扩增出条带来。

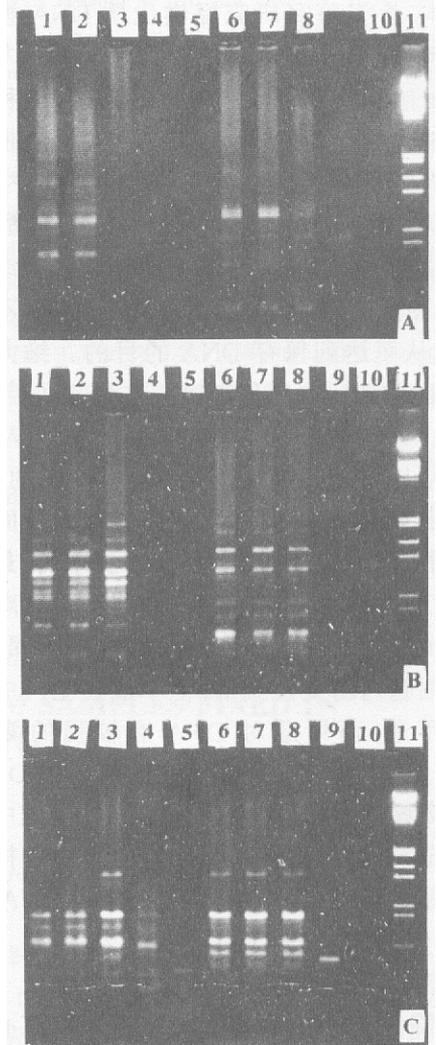


图 2 不同固定剂保存标本中得到 DNA 为模板 RAPD 扩增产物电泳图谱

A. 引物 I-02; B. 引物 I-06; C. 引物 I-09; 编号含义同图 1

Figure 2 Electrophoretic patterns of RAPD products amplified from the template DNA extracted from specimens preserved in different fixatives.

A. Primer I-02; B. Primer I-06; C. Primer I-09.

Numbers refer to Figure 1

### 3 讨论

在野生动物 DNA 分子系统演化关系和物种遗传多样性的研究中, RAPD 是一简便、快捷的方法。但 RAPD 分析对模板 DNA 的质量要求较高<sup>[11~12]</sup>。野外标本采集和运输过程中,

在没有冷冻条件的情况下,如何保存好动物组织标本,为实验室研究提供优质 DNA 模板提取材料,需要寻找一种合适固定组织标本的方法。虽然野外保存标本有多种方法,多种固定剂均能达到固定动物组织标本的目的,但不同固定剂对 DNA 的保存效果不同。细胞内 DNA 的降解主要是 DNA 酶作用的结果,乙醇作为一种常用的固定剂,能迅速地渗透进入组织细胞,凝固蛋白质,使多种水解酶失活,而不损伤 DNA,从而达到保存 DNA 的目的。绝大多数 DNA 酶需要一个二价阳离子作为辅助因子(如  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  等),在 70% 的乙醇中加入适量 EDTA,EDTA 可以迅速抑制 DNA 酶的活性,进一步减少 DNA 的降解。此二种乙醇固定的组织中 DNA 保存均很好,DNA 提取时,最终沉淀的 DNA 均可以用玻棒分离出,无需离心沉淀。10% 的甲醛虽然也是一种常用的固定剂,能使细胞内酶变性失活,但甲醛在空气中易氧化成甲酸,而甲酸对 DNA 有较强的降解作用<sup>[13]</sup>,因此用 10% 甲醛固定的组织中 DNA 仍会被降解。戊二醛虽然是超微结构研究中常用的固定剂,它对细胞膜及细胞内膜质结构有较好的固定作用,但不能迅速地抑制 DNA 酶的活性,使细胞内的 DNA 仍能发生降解。用这两种固定剂中保存的标本提取 DNA 时,因 DNA 降解无法用玻棒绕出,不得不用离心的方法分离出 DNA。经琼脂糖凝胶电泳检测,从同一时间保存在不同固定剂中的肌肉组织中提得的 DNA,证实甲醛和戊二醛固定的标本中 DNA 降解严重,而 70% 乙醇和含 50mmol/L EDTA 的 70% 乙醇固定的标本中 DNA 无严重降解现象。

以取自同一个体用不同固定剂保存的肌肉组织中提得的 DNA 为模板,进行 RAPD 扩增,结果表明,70% 乙醇固定的组织材料已能较好地保存 DNA,从中提得的 DNA 质量较高,与从同一个体冻存的标本中提得的 DNA 分别作模板在同样条件下进行 RAPD 扩增,得到的结果几乎完全相同。如在 70% 的乙醇中加入 50 mmol/L 的 EDTA 则能更有效的防止 DNA 降

解,用从这种固定剂固定的材料中提得的 DNA 作模板,扩增结果与冻存标本完全相同。而 2.5% 戊二醛和 10% 甲醛固定的材料中因 DNA 降解严重,RAPD 扩增较困难,有时虽能扩增出一些片段,但电泳谱带已发生较大变化,且稳定性差。Micheli 等<sup>[11]</sup>认为 RAPD 谱带的稳定性除了与  $\text{Mg}^{2+}$  浓度、引物序列和复性温度等因素有关外,还在很大程度上受到 DNA 提取方法的影响。在分离 DNA 沉淀时,常规方法是离心,但这种方法得到的 DNA 中降解后的小分子 DNA 和 RNA 均较多,这些小分子 DNA 和 RNA 对 RAPD 扩增的可重复性有很大影响,而用玻棒绕出的 DNA 分子量较高,RAPD 扩增出的谱带稳定。本研究中也发现,如在 DNA 提取前或提取过程中,DNA 发生降解,乙醇沉淀 DNA 时无法用玻棒缠绕出,此时用离心沉淀方法得到的 DNA 模板 RAPD 扩增效果差而且不稳定。

因此,为保存好野外采得的标本中 DNA,供实验室研究用,以含有 50 mmol/L EDTA 的 70% 乙醇作为固定剂为好,这种固定剂固定的标本,夏季室温下至少可以保存两个月,而不影响其中的 DNA 提取和扩增。固定后的组织,在路途运输过程中可倒弃固定液,用棉花吸上少量固定剂,保持标本湿润即可达到安全运输的目的。

## 参 考 文 献

- 1 Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, S. V. Tingey. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18(22):6531~6535
- 2 王义权,周开亚,秦树臻. 用 RAPD 标记检测六种蛇基因组 DNA 多态性. *动物学报*, 1996, 42(2):172~181
- 3 王义权,周开亚. 游蛇科(Cloubriidae)10 种蛇的随机扩增多态 DNA 研究. 应用与环境生物学报, 1996, 2(3):271~279
- 4 Ballinger-Crabtree, M. E., W. C. Black IV, B. Miller. Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and population. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1992,

- 47(6):893~901
- 5 Comincini, S., M. Sironi, C. Bandi, C. Giunta, M. Rubini, F. Fontana. RAPD analysis of systematic relationships among the Cervidae. *Heredity*, 1996, **76**:215~221
  - 6 Puterka, G. J., W. C. Black IV, W. M. Steiner, R. L. Burton. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the russian wheat aphid, *Diuraphis nuxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity*, 1993, **70**:604~618
  - 7 Tibayrenc, M., K. Neubauer, C. Barnabe, F. Guerrini, D. Skarecky, F. J. Ayala. Genetic characterization of six parasitic Protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**:1335~1339
  - 8 Bielawski, J. P., K. Moak, D. E. Pumo. Reproducible amplification of RAPD markers from vertebrate DNA. *Bio Techniques*, 1995, **18**(5):856~860
  - 9 Ellsworth, D. L., K. D. Rittenhouse, R. L. Honeycutt. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Bio Techniques*, 1993, **14**(2):214~217
  - 10 Muralidharan, K., E. K. Wakeland. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random-amplified polymorphic DNA PCR. *Bio Techniques*, 1993, **14**(3):362~364
  - 11 Micheli, M. R., R. Bova, E. Pascale, E. D' Ambrosio. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucl. Acids Res.*, 1994, **22**(10):1921~1922
  - 12 秦树臻, 王义权, 鲁亮. 几种动物 RAPD 指纹图谱反应条件的分析. *南京师范大学学报(自然科学版)*, 1996, **19**(2):66~70
  - 13 朱平. PCR 基因扩增实验操作手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1992. 1~619

## THE ANALYSES OF RAPD REACTION AFFECTED BY THE DNA TEMPLATE EXTRACTED FROM SAMPLES FIXED IN DIFFERENT FIXATIVES\*

WANG Yi-Quan ZHOU Kai-Ya\*\* XU Luo-Shan XU Guo-Jun

(Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT** It is difficult to keep biological samples collected from the field fresh and transport safely to laboratory for RAPD analyses. In this study, the DNA templates extracted from muscles kept in different fixatives for more than 70 days in summer were compared in RAPD analyses and the DNA extracted from frozen muscles of same individuals was used as control. The result suggested that the muscle kept in 70% ethanol with 50mmol/L EDTA was quite good for template DNA extraction and RAPD reaction. At least, the sample could be in the fixative for two months at room temperature in summer without affection for DNA extraction and amplification.

**KEY WORDS** Fixatives Sample preservation DNA extraction RAPD

\* supported by NNSFC (No. 39470098) and CPSF ([1996]No 2).

\*\* Department of Biology, Nanjing Normal University Nanjing 210097, China