

# 一种适于 PCR 扩增的快速提取猪基因组 DNA 的碱裂解法

赵金艳<sup>1</sup> 刘 榜<sup>2,3</sup> 王文君<sup>2,3</sup> 张 宇<sup>2,3</sup> 张庆德<sup>3,4</sup>

1.河南牧业经济学院动物科技学院,郑州 450046;

2.华中农业大学农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室,武汉 430070;

3.生猪健康养殖协同创新中心,武汉 430070; 4.华中农业大学实验动物中心,武汉 430070

**摘要** 以大白猪背最长肌、脾脏、耳组织为材料,用碱裂解法和酚-氯仿法分别提取猪基因组 DNA,用紫外分光光度计、琼脂糖凝胶电泳、PCR 扩增检测 DNA 的产量和质量,结果发现 2 种方法提取的 DNA 产量没有明显差异。通过猪 *MC4R*、*TEF-1* 基因特异引物进行 PCR 扩增均能得到目的条带。碱裂解法提取的 DNA 原液稀释 5 倍、10 倍后作为模板均获得了较为稳定的扩增产物。该结果表明,简单、快速、无毒的碱裂解法适用于动物定性 PCR 检测时 DNA 的提取。

**关键词** 猪基因组 DNA; 碱裂解法; 酚-氯仿法; PCR 扩增

**中图分类号** S 828 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)04-0090-05

提取动物基因组 DNA 的方法有多种,其中经典的方法有酚抽提法、甲酰胺裂解法、异丙醇沉淀法、盐酸胍裂解玻璃棒缠绕法及酚-氯仿法等<sup>[1]</sup>,这些方法都能获得高质量 DNA;但是提取过程繁琐,技术、设备要求高、耗时长,且有的试剂具有一定的毒性。在经典的 DNA 提取方法上经过改进、优化出现了盐析法<sup>[2]</sup>、试剂盒提取法<sup>[3]</sup>、颗粒吸附法<sup>[4-6]</sup>,但仍需要特殊设备(高速冷冻离心机)并以高成本为代价。DNA 提取方法经进一步改进出现了快速提取法,可在无高速冷冻离心机等设备条件下实现基因组 DNA 的快速提取,如碱裂解法<sup>[7]</sup>。使用这种方法成本低、提取所用试剂无毒,操作简单,尤其适合现场操作,并且提取的 DNA 可用于常规 PCR 扩增。

近些年碱裂解法和改良的碱裂解法在动物基因组 DNA 提取中主要用于动物血液<sup>[8]</sup>、动物组织<sup>[9-10]</sup>、动物药品<sup>[11]</sup>等样品的 DNA 快速提取。本研究以猪肌肉组织、脾脏、耳组织为材料,用酚-氯仿法和碱裂解法分别提取基因组 DNA,检测 DNA 的产量和质量,并利用猪 *MC4R* 和 *TEF-1* 基因的引物进行 PCR 扩增以对 DNA 提取质量进行检测,并综合对比 2 种 DNA 提取方法对猪 3 种组织样品的

提取效果,以期为猪基因组 DNA 快速提取时样品采集及方法筛选提供可靠的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料、主要仪器及试剂

大白猪的背最长肌、脾脏、耳组织(活体取样)均由华中农业大学农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室刘榜教授课题组提供,所有材料用 75%乙醇浸泡, -20℃ 冰箱保存。

主要仪器设备:台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司)、冷冻低温超速离心机(德国 Eppendorf 公司)、NanoDrop 2000 超微量紫外可见分光光度计核酸蛋白测定仪(美国 Thermo 公司)、PCR 仪(美国 BioRad 公司)、凝胶成像系统(美国 BioRad 公司)。

主要试剂:琼脂糖(西班牙 Biowest Agarose), gelred(美国 Biotium 公司), 2× Power Taq PCR MasterMix(北京百泰克生物技术有限公司), BM2000 DNA Marker( Biomed ),其他试剂均为国产分析纯。*MC4R*、*TEF-1* 基因的 PCR 引物由擎科生物技术有限公司(武汉)合成。

### 1.2 猪基因组 DNA 提取方法

1)碱裂解法。参考文献<sup>[7]</sup>方法并适当改进,具

收稿日期: 2016-09-24

基金项目: 湖北省科技支撑计划项目(2014ABA033;2014ABA025)

赵金艳, 硕士, 副教授. 研究方向: 动物遗传育种. E-mail: jinyanzhao@126.com

通信作者: 张庆德, 高级工程师. 研究方向: 动物养殖. E-mail: qdzhang@mail.hzau.edu.cn

体步骤为:取出一20℃冰箱保存的背最长肌、脾脏、耳组织样品,用吸水纸将表面吸干,3种组织各称取3份0.05g样品后于吸水纸上按压,尽量去除样品中残留的乙醇,样品置于2mL的Eppendorf管中,加入500μL的0.2mol/L NaOH,用小手术剪刀剪碎样品,颠倒混匀后用泡沫浮漂使其浮于盛有沸水的烧杯中10min,取出静置5min,吸取上清液200μL作为DNA提取原液,取部分DNA原液用1.0mol/L Tris-HCl (pH=8.0)分别稀释5、10、20、50、100倍作为后续PCR检测的模板,存放于-20℃备用。

2) 酚-氯仿法。取样及前处理同碱裂解法,参考酚-氯仿法<sup>[1]</sup>提取猪基因组DNA,用500μL灭菌双蒸水溶解后存放于-20℃备用。

### 1.3 2种方法提取的基因组DNA质量检测

1) 紫外可见分光光度计检测。将碱裂解法、酚-氯仿法提取的DNA原液经NanoDrop 2000超微量紫外可见分光光度计核酸蛋白测定仪检测,同时将酚-氯仿法提取的DNA分别稀释为100、50、20、10、5、1ng/μL作为后续PCR检测的模板,保存于-20℃备用。

2) 琼脂糖凝胶电泳检测。将碱裂解法、酚-氯仿法提取的DNA原液各5μL与2μL加有Gelred的Loading Buffer混匀,BM2000 DNA Marker作为分子质量标记,利用1%琼脂糖凝胶在电压120V条件下电泳1h,凝胶成像系统照相检测。

3) PCR及电泳检测。为检验碱裂解法提取的猪基因组DNA能否用于PCR检测及筛选合适的模板浓度,以酚-氯仿法提取的基因组DNA 100、50、20、10、5、1ng/μL 6个质量浓度作为对照,对应碱裂解法提取的基因组DNA原液、5倍、10倍、20倍、50倍和100倍稀释液,以猪MC4R、TEF-1为目标基因进行PCR检测。MC4R引物<sup>[12]</sup>上游序列为5'-AGCGGGTTGGAATCATCATC-3',下游序列为5'-CACCCAGGGGATAGCAACAG-3',片段大小为480bp;TEF-1引物<sup>[13]</sup>上游序列5'-GGCAGGAGCAGTGCTAACAG-3',下游序列为5'-GCGAGTCCGAGGCAAACCTTC-3',片段大小为118bp。PCR扩增反应总体体系为20μL,体系如下:2×Power Taq PCR MasterMix 10μL,上下游引物各0.4μL(引物终浓度为0.2μmol/L),酚-氯仿法提取DNA的6个浓度稀释液各2μL作为模板,碱裂解法提取的DNA原液及体积倍比稀释液各

2μL作为模板,每个浓度做2个平行,每个反应管中加7.2μL灭菌双蒸水。MC4R引物反应程序为:95℃ 5min;94℃ 30s,56℃ 30s,72℃ 25s,30个循环;72℃延伸5min。TEF-1引物反应程序为:95℃ 5min;94℃ 30s,62℃ 30s,72℃ 10s,30个循环;72℃延伸5min。扩增产物5μL与2μL加有Gelred的Loading Buffer混匀,BM2000 DNA Marker作标准对照,用2%琼脂糖凝胶在120V电压条件下电泳30min,然后凝胶成像系统照相检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫外可见分光光度计检测结果

NanoDrop 2000超微量紫外可见分光光度计核酸蛋白测定仪检测结果显示,2种方法提取猪的肌肉、脾脏、耳组织DNA的浓度均较高,尤其是脾脏获得的DNA产量最高,肌肉次之,耳组织的产量最低。不同方法提取3种组织所获得的DNA产量没有明显规律性;碱裂解法提取的肌肉DNA产量略高于酚-氯仿法,但差异不显著( $P>0.05$ )。碱裂解法提取的脾脏DNA产量低于酚-氯仿法( $P<0.05$ )。碱裂解法提取的耳组织DNA产量高于酚-氯仿法( $P<0.05$ )。碱裂解法提取DNA的 $D_{260}/D_{280}$ 比值略低于酚-氯仿法,但差异不显著( $P>0.05$ )。碱裂解法提取的3种组织DNA的 $D_{260}/D_{230}$ 值均低于1.0,均与酚-氯仿法的 $D_{260}/D_{230}$ 值之间存在显著差异( $P<0.05$ ),这主要是由于没有使用任何纯化DNA的处理,盐类、碳水化合物混在其中导致 $D_{230}$ 值偏高引起的。具体检测结果见表1。

### 2.2 琼脂糖凝胶电泳检测结果

碱裂解法和酚-氯仿法提取的基因组电泳结果如图1所示,酚-氯仿法提取的猪肌肉、脾脏、耳组织的基因组DNA均有较清晰的条带,脾脏DNA和耳组织DNA有降解的小片段拖尾。碱裂解法只有脾脏基因组DNA有条带,但条带区域宽并且不如酚-氯仿法条带清晰,肌肉、耳组织的基因组DNA则由于产量相对低和杂质的阻滞在电泳图中没有条带。

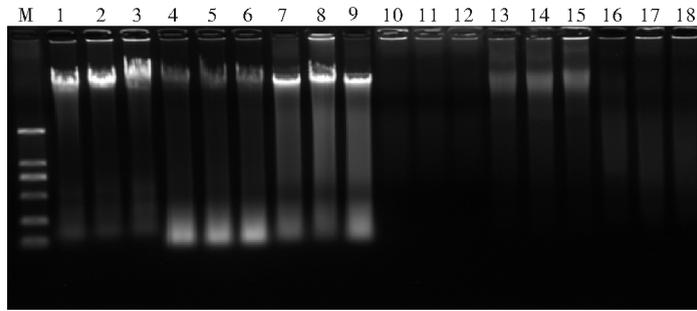
### 2.3 PCR检测结果

碱裂解法和酚-氯仿法提取的基因组DNA作模板的PCR扩增结果如图2所示,酚-氯仿法提取的3种组织DNA模板量为200、100、40、20ng时扩增获得的产物均能够达到琼脂糖凝胶电泳的检出

表 1 2 种方法提取猪基因组 DNA 结果比较  
Table 1 Comparison of pig genomic DNA extracted by two methods

材料 Materials	方法 Methods	DNA/(ng/mL)	$D_{260}$	$D_{280}$	$D_{260}/D_{280}$	$D_{260}/D_{230}$
肌肉 Muscle	碱裂解法 Alkaline lysis	1 773.43±428.66	36.47±8.22	18.83±4.30	1.88±0.08	0.77±0.20a
	酚-氯仿法 Phenol-chloroform	1 664.36±753.33	33.29±15.07	16.56±7.67	2.02±0.03	1.78±0.01b
脾脏 Spleen	碱裂解法 Alkaline lysis	2 265.81±148.03a	45.35±3.01	24.33±1.84	1.86±0.02	0.66±0.02a
	酚-氯仿法 Phenol-chloroform	2 987.53±126.18b	59.75±2.53	31.40±1.16	1.90±0.01	2.06±0.06b
耳组织 Ear	碱裂解法 Alkaline lysis	1 097.10±54.92a	21.94±1.10	11.81±0.67	1.86±0.02	0.36±0.11a
	酚-氯仿法 Phenol-chloroform	837.30±200.98b	16.75±4.02	8.56±2.07	1.96±0.01	2.05±0.16b

注:不同字母表示不同方法差异显著( $P < 0.05$ ) Note: Mean values with different letters in different methods differ significantly ( $P < 0.05$ ).



M:BM2000 DNA marker.泳道 1~9 为酚-氯仿法提取的 DNA,其中 1~3 为肌肉 DNA,4~6 为脾脏 DNA,7~9 为耳组织 DNA;泳道 10~18 为碱裂解法提取的 DNA,其中 10~12 为肌肉 DNA,13~15 为脾脏 DNA,16~18 为耳组织 DNA。M:BM2000 DNA marker, lane 1-9. Genomic DNA extracted by phenol-chloroform, 1-3. Genomic DNA of muscle, 4-6. Genomic DNA of spleen, 7-9. Genomic DNA of ear; lane 10-18. Genomic DNA extracted by alkaline lysis, 10-12. Genomic DNA of longissimus dorsi, 13-15. Genomic DNA of spleen, 16-18. Genomic DNA of ear.

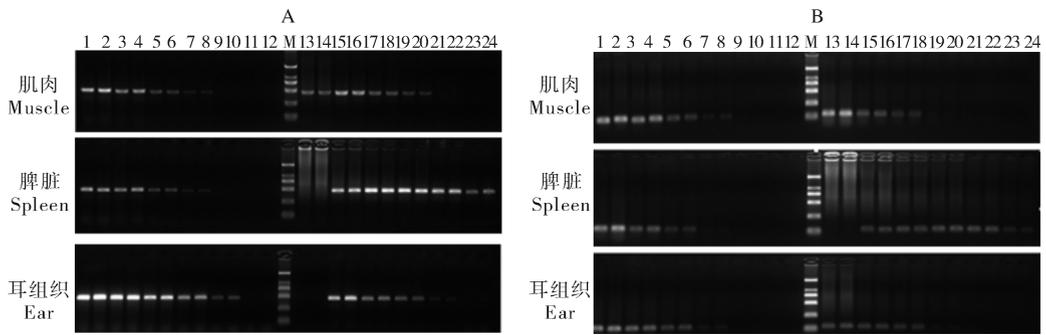
图 1 2 种方法提取的猪基因组 DNA 电泳图

Fig.1 Agarose electrophoresis results of pig genomic DNA extracted by two methods

量,随着模板量减少,电泳条带变暗,其中模板量为 100 ng 时扩增产物的电泳条带最整齐、清晰。碱裂解法提取的 3 种组织 DNA 原液经 5、10、20 倍稀释作模板时扩增获得的产物电泳能够检测到清晰的条带,其中原液进行 5 倍稀释作模板扩增产物电泳效果最理想。

2 种方法提取的基因组 DNA 作模板经 *MC4R* 和 *TEF-1* 基因引物进行 PCR,扩增产物检测结果显示:酚-氯仿法提取的 3 种组织基因组 DNA 模板量为 200、100、40、20 ng 时,电泳均能检测到产物的目的条带;碱裂解法提取的基因组 DNA 不同组织同等倍数稀释 PCR 结果有差异:猪肌肉基因组

DNA 原液、5 倍、10 倍稀释作为模板扩增产物均有明显的电泳条带,其中以 5 倍稀释条带最清晰;脾脏基因组 DNA 5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍稀释模板 PCR 扩增均有清晰的目的条带,DNA 原液没有扩增出目的条带,可能是由于模板浓度太高,抑制了 PCR 反应所致;耳组织基因组 DNA 5 倍、10 倍、20 倍稀释模板 PCR 扩增产物电泳检测有目的条带,其中 5 倍稀释模板 PCR 扩增目的条带最清晰。综合图 2 中 A、B 两图可知,不同组织碱裂解法提取的基因组 DNA 作模板,使 2 个基因引物都能成功扩增的 DNA 原液稀释倍数是 5 倍和 10 倍,其中以 5 倍稀释效果最理想。



M:BM2000 marker, marker 左侧酚-氯仿法提取的 DNA 模板质量浓度,泳道 1~2,3~4,5~6,7~8,,9~10,11~12 分别为 100、50、20、10、5、1 ng/ $\mu$ L。Marker 右侧为碱裂解法提取的 DNA 模板稀释倍数为:泳道 13~14,15~16,17~18,19~20,21~22,23~24 分别为原液、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍稀释。M:BM2000 marker, the left of marker are amplification product with different concentration DNA extracted by phenol-chloroform, lane 1-2,3-4,5-6,7-8,9-10,11-12 is 100,50,20,10,5,1 ng/ $\mu$ L respectively. The right of marker are amplification product with different dilution ratios DNA extracted by alkaline lysis, lane 13-14,15-16,17-18,19-20,21-22,23-24 is original sample liquid,5,10,20,50,100 times dilution respectively.

图2 猪不同组织 2 种 DNA 提取方法用于 *MC4R* (A)、*TEF-1* (B) 基因 PCR 检测结果

Fig.2 PCR detection results for pig different tissues genomic DNA extracted by two methods using *MC4R* (A) and *TEF-1* (B) primer amplification

### 3 讨论

#### 3.1 碱裂解法和酚-氯仿法提取猪基因组 DNA 方法的对比

碱裂解法需要 3 种试剂,提取成本低廉,每个样品消耗的试剂和耗材价格约为 0.20 元。所用试剂无毒、常见,购买、贮存、携带不受限制。碱裂解法提取 DNA 所用时间短,得到可用 DNA 只需 20 min。操作过程在常温环境中进行,不需要大型设备,尤其适合现场或实验条件受限的环境下提取动物样品 DNA。酚-氯仿法使用 9 种试剂,提取成本较高,1 个样品消耗的试剂和耗材价格约需 1.0 元。使用的苯酚、氯仿均有毒,操作时需要注意人员的安全防护,蛋白酶 K 需要冷冻贮存,苯酚需要避光冷藏、防止氧化,不便于汽车、火车等常见交通工具携带,不适合现场检测使用。酚-氯仿法提取过程大约需要 3~4 h,待到洗涤用乙醇挥发殆尽、DNA 彻底溶解能够使用至少需要 12~24 h,且过程中需要通风厨、水浴锅、低温高速离心机等设备,更适合实验条件较好的实验室采用。本试验采用的碱裂解法加热过程在盛有热水的烧杯中进行,取代了文献中水浴锅加热,并且省略了离心过程<sup>[7,9-10]</sup>,精简了仪器并缩短了提取时间,更适合生产现场操作。

#### 3.2 碱裂解法提取的 DNA 作模板 PCR 效果理想

比较碱裂解法和酚-氯仿法提取的猪肌肉、脾脏、耳组织基因组 DNA,碱裂解法提取的基因组 DNA 在浓度检测时虽然产量和纯度不高(表 1,

图 1),但不影响常规 PCR 检测的效果(图 2),PCR 扩增目的片段大小不同的 2 个基因时,碱裂解法提取的 DNA 模板均获得了清晰的、单一的目的条带,没有产生非特异性条带,并且 3 种组织样品的基因组 DNA 提取液的 5 倍、10 倍、20 倍稀释液作模板扩增得到的目的条带亮度均非常明显,能够满足检测要求。这可能是由于 DNA 经过碱裂解后,*Taq* 聚合酶更易于接近目的片段,对于 G、C 富集区 DNA 扩增具有明显的增强效果<sup>[14]</sup>。对比同质量肌肉、脾脏、耳组织碱裂解法提取基因组 DNA 的产量,脾脏是最高的,提取原液在进行 50 倍、100 倍稀释时作为 PCR 扩增模板依然能够检测到明显的目的条带,所以在实验条件允许时,用碱裂解法取脾脏作为提取样本快速提取 DNA,产量高、效果好,如果需要活体取样则耳组织是最佳的选择样本;用酚-氯仿法提取 3 种组织样品的 DNA 产量、纯度都很高,除了做定性 PCR 检测的模板外,还可以做酶切、分子杂交等其他分子生物学实验。

碱裂解法提取猪基因组 DNA 简单、快速、成本低,像肌肉、脾脏、耳组织等动物组织只在细胞数量上有差别,在基因组 DNA 提取质量上无差别,所以碱裂解法提取的基因组 DNA 适合进行定性 PCR 检测。目前转基因动物产品的鉴定、动物源性食品的检测,一般都要求现场快速给出结论,因此,碱裂解法提取基因组 DNA 可以推及其他动物种类进行定性 PCR 检测时使用。

## 参 考 文 献

- [1] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯著 T. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 等, 译. 北京: 科学出版社, 1992: 463-469.
- [2] LAITINEN J, SAMARUT J, HOLT TA E. A nontoxic and versatile protein salting-out method for isolation of DNA[J]. *Bio-techniques*, 1994, 17(2): 316, 318, 320-322.
- [3] SCHERCZINGER C A, BOURKE M T, LADD C, et al. DNA extraction from liquid blood using QIAamp[J]. *Journal of forensic sciences*, 1997, 42(5): 893-896.
- [4] PICHLER F B, DAEBOUT M L, BAKER C S. Nondestructive DNA extraction from sperm whale teeth and scrimshaw[J]. *Mol ecology notes*, 2001, 1(1/2): 106-109.
- [5] CALDARELLI-STEFANO R, VAGO L, BONETTO S, et al. Use of magnetic beads for tissue DNA extraction and IS 6110 Mycobacterium tuberculosis PCR [J]. *J Clin Pathol Mol Pathol*, 1999, 52(3): 158-160.
- [6] PINTO A P, VILLA L L. A spin cartridge system for DNA extraction from paraffin wax embedded tissues[J]. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 1999, 51(1): 48-49.
- [7] RUDBECK L, DISSING J. Rapid simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR[J]. *Biotechniques*, 1998, 25: 588-592.
- [8] SJOHOLM M I L, DILLNER J, CARLSON J. Assessing quality and functionality of DNA from fresh and archival dried blood spots and recommendations for quality control guidelines [J]. *Clinical chemistry*, 2007, 53(8): 1401-1407.
- [9] MELDGAARD M, BOLLEN P J, FINSEN B. Non-invasive method for sampling and extraction of mouse DNA for PCR[J]. *Laboratory animals*, 2004, 38(4): 413-417.
- [10] GIRISH P S, HAUNSHI S, VAITHIYANATHAN S, et al. A rapid method for authentication of buffalo (*Bubalus bubalis*) meat by alkaline lysis method of DNA extraction and species specific polymerase chain reaction [J]. *Journal of food science and technology*, 2013, 50(1): 141-146.
- [11] 陈康, 蒋超, 袁媛, 等. 快速 PCR 方法在蛇类药材真伪鉴别中的应用[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(19): 3673-3677.
- [12] KIM K S, LARSEN N, SHORT T, et al. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits [J]. *Mammalian genome*, 2000, 11: 131-135.
- [13] 韩雪蕾, 杨华威, 王维民, 等. 猪 IGF2, MC4R, JHDM1A, TEF-1 基因多基因标记遗传效应研究 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(8): 1694-1701.
- [14] AGAWAL R K, PERL A. PCR amplification of highly GC-rich DNA template after denaturation by NaOH [J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(22): 5283-5284.

## A rapid alkaline lysis method of extracting pig genomic DNA for PCR amplification

ZHAO Jinyan<sup>1</sup> LIU Bang<sup>2,3</sup> WANG Wenjun<sup>2,3</sup> ZHANG Yu<sup>2,3</sup> ZHANG Qingde<sup>3,4</sup>

1. Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China;

2. Key laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

3. The Cooperative Innovation Center for Sustainable Pig Production, Wuhan 430070, China;

4. Experimental Animal Centre, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** Alkaline lysis and conventional phenol-chloroform extraction methods were adopted to extract genomic DNA from the longissimus dorsi muscle, spleen and ear tissues from Large White pigs. The quantity and quality of DNA were determined by ultraviolet spectrophotometer, agarose gel electrophoresis and PCR amplification. The results showed that there was no significant difference of DNA quantity between the two DNA extraction methods. The gene fragments of *MC4R* and *TEF-1* could be obtained by PCR amplification using genomic DNA extracted by the two different extraction methods. Most importantly, the amplification results were relatively stable when using 5 and 10 times diluted DNA extracted by alkaline lysis method. Therefore, the simple, rapid and non-toxic alkaline lysis method can be widely used in extraction and determination of DNA for qualitative analysis in animals.

**Keywords** pig genomic DNA; alkaline lysis; phenol-chloroform; PCR amplification

(责任编辑:边书京)