

一种简单高效稳定的高质量第 X 期鸡胚盘 DNA 提取方法的建立

代敏敏¹, 李德娟¹, 耿琳焯¹, 褚素乔², 郭伟婷², 樊宝良^{1*}

(1. 河北农业大学动物科技学院, 河北 保定 071000; 2. 石家庄市畜牧技术推广站, 石家庄 050030)

摘要: 为了建立快速高效稳定的高质量鸡胚盘 DNA 提取方法, 试验通过收集第 X 期鸡胚胎, 应用酚氯仿抽提法、微量组织 DNA 提取试剂盒法和优化的硅胶膜吸附法分别提取鸡胚 DNA, 所提 DNA 经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳初步检测, 并经 PCR 进一步分析检验, 对不同方法提取 DNA 的稳定性和质量进行评价。结果表明: 微量组织 DNA 提取试剂盒法提取的基因组 DNA 比用酚氯仿抽提法提取 DNA 的方法具有更高的稳定性和更好的质量, 而微量组织 DNA 提取试剂盒法与本试验建立的优化的硅胶膜吸附法提取的基因组 DNA 稳定性和质量相近, 但本试验建立优化的硅胶膜吸附法, 无需蛋白酶 K 消化胚盘组织, 因而优化了步骤降低了成本。试验建立了一个简单高效稳定的高质量低成本的第 X 期鸡胚盘 DNA 提取方法, 为后续的相关研究建立了一个有效的鸡受精蛋胚盘 DNA 提取方法。

关键词: 第 X 期鸡受精蛋胚盘; 微量组织 DNA 提取试剂盒法; 优化的硅胶膜吸附法; 蛋白酶 K; 酚氯仿抽提法; DNA 提取

中图分类号: S831

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2020)02-0048-05

Establishment of a Simple, Efficient and Stable Method for DNA Extraction from Stage X Chicken Blastoderm

DAI Minmin¹, LI Dejuan¹, GENG Linye¹, CHU Suqiao², GUO Weiting², FAN Baoliang^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000; 2. Shijiazhuang Husbandry Technology Extension Station, Shijiazhuang 050030, China)

Abstract: In order to establish a rapid, efficient, stable and high quality chicken blastoderm DNA extraction method, the X stage chicken blastoderm were collected and extracted by phenol chloroform extraction method, Kit Method of DNA extraction from micro tissue and optimized silicone membrane adsorption method respectively. The stability and quality of the extracted DNA were preliminary evaluated by agarose gel electrophoresis of 0.8% and further analyzed by PCR. The results showed that the genomic DNA extracted by Kit Method of DNA extraction from micro tissue was more stable and better quality than that extracted by phenol chloroform extraction method, while the stability and quality of genomic DNA extracted by Kit Method of DNA extraction from micro tissue was similar to that of the optimized silicone membrane adsorption method. However, the optimized silicone membrane adsorption method was established, which did not need protease K to digest the blastoderm tissue, so the steps were optimized and the cost was reduced. The results showed that a simple, efficient and stable DNA extraction method with high-quality and low-cost for X stage chicken blastoderm were established and it can be used in subsequent related studies.

Key words: X stage chicken blastoderm; Kit Method of DNA extraction from micro tissue; Optimized silicone membrane adsorption method; Proteinase K; Phenol-chloroform extraction method; DNA extraction

鸡作为主要家禽之一, 世代周期短, 作为一种

重要的农业经济动物, 是人类主要的蛋白来源^[1-2]。同时, 在禽类转基因方法研究以及发育生物学领域的研究中, 鸡也是一个重要的模式动物^[3]。在发育生物学领域重要的研究内容之一就是应用鸡胚作为研究对象阐明鸡胚发育过程中基因表达调控机理以及胚胎发育异常的分子基础^[4], 在转基因方法建立方面需要对外源基因整合效率进行评估^[5]。开展上述研究都需要提取鸡

收稿日期: 2019-08-07

基金项目: 河北省科技厅重点研发计划项目(19226320D); 河北省现代农业产业技术体系鸡肉鸡产业创新团队项目(HBCT2018150201)

作者简介: 代敏敏(1995-), 男, 在读硕士, 研究方向为动物遗传育种。

通讯作者: 樊宝良, 男, 博士, 教授, E-mail: fanbl119@vip.sina.com

胚DNA,因此建立一个快速高效稳定的高质量鸡胚DNA提取方法对保障上述相关研究结果准确可靠具有重要意义。

母鸡刚产下的受精蛋是在不伤害母鸡的前提下得到最早时期的子代遗传信息,此时的胚盘将分化发育为鸡的各个组织器官,含有鸡的全部遗传信息,Eyal-Giladi H将此发育时期命名为第X期^[6]。受精蛋卵黄表面圆盘状,胚盘颜色浓,且胚盘也略大,未受精蛋的蛋黄表面只见一个小白点,称为胚珠,色浅也小^[7]。剖视受精蛋,可以看到分为两个部分,中央白色部分为胚盘将发育为雏鸡,其他部分为卵黄^[8]。第X期的鸡胚约含有50 000~60 000个细胞,经估算大约含有100 ng DNA。如果方法得当,可以从中提取获得足够用于上述分析的DNA。但不同的DNA提取方法获得DNA的效率和质量差异很大,如果不能快速高效稳定地提取获得高质量的DNA,会对后续研究结果及结论的准确性产生不良影响^[9]。目前提取DNA的方法众多,动物组织DNA提取的经典方法主要有SDS抽提法、酚仿抽提法、高盐沉淀法、离子交换法等^[10],这些方法在提取常规动物组织基因组DNA时都有其本身优势,但是第X期鸡胚盘提取DNA属于微量操作,上述这些方法因DNA提取效率低下很难应用于第X期鸡胚盘的DNA提取^[11]。目前已有的微量组织DNA提取方法需要使用蛋白酶K消化,延长了DNA提取的时间,而且成本较高。本试验通过对比试验,建立了一个无需蛋白酶K消化优化硅胶膜吸附法提取第X期鸡胚中DNA的方法。优化的方法与微量组织DNA提取试剂盒法提取DNA的方法相比具有快速低成本的优点,与以酚氯仿抽提的传统方法相比具有稳定、高效以及高质量的优点,这为后续相关研究提供了一个有效的高质量DNA制备方法。

1 材料与方法

1.1 种蛋

新鲜未孵化的受精太行鸡种蛋38枚,购自赞皇天然农产品有限公司第二种鸡场。

1.2 主要试剂

SDS(分析纯,500 g/瓶)、NaCl(分析纯,500 g/瓶)、EDTA(分析纯,500 g/瓶)、Tris·HCl(分析纯,500 g/瓶)、1 kb DNA ladder(50反应/盒)、异硫氰酸胍(分析纯,500 g/瓶)、Triton-X100(分析纯,100 mL/瓶)等购自上海生工生物工程技术有限公司;微量组织DNA提取试剂盒(50反应/盒)购自

基因生物技术国际贸易(上海)有限公司;硅胶膜吸附柱(微量)购自上海土锋生物科技有限公司;蛋白酶K(10 mg/瓶)、 λ -Hind III digest DNA Marker(100反应/支)购自宝生物工程(大连)有限公司;Tris平衡酚(分析纯,250 mL/瓶)、氯仿(分析纯,500 mL/瓶)、异丙醇(分析纯,500 mL/瓶)、乙醇(分析纯,500 mL/瓶)、dNTPs(High Pure,10 mmol/L)、EasyTaq DNA Polymerase(500 U/支)、10×EasyTaq Buffer(1 mL/支)等购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

台式高速离心机购自金坛区金城春兰实验仪器厂;PCR仪购自美国应用生物系统公司;凝胶成像系统购自美国伯乐生命医学产品有限公司;电泳仪购自北京六一仪器厂。镊子、手术剪、培养皿为本实验室提供并均做无菌处理。

1.4 引物的设计与合成

依据鸡GnRH基因序列(GenBank登录号为408184),应用Oligo 7引物设计软件设计1对引物,引物序列为P1 5'-AGGATCTCTTGTGCCTTCATAGG-3'和P2 5'-ATAGAAAGATCTCCGTCAACTGCAT-3',预扩增产物长度为1 kb,引物由通用生物系统(安徽)有限公司合成。

1.5 第X鸡胚盘组织的获得

收集刚产下种蛋,将蛋黄倒入培养皿,翻转找到胚盘,用手术剪轻轻剪下胚盘,用镊子将胚盘转移至新的1.5 mL离心管中,用手术剪剪碎。

1.6 DNA提取及初步凝胶电泳分析

1.6.1 酚氯仿抽提法提取DNA

向放有剪碎胚盘的离心管中加入200 μ L组织解液(0.5% SDS、0.1 mol/L NaCl、0.1 mol/L EDTA, pH 8.0)再加入蛋白酶K至终浓度100 μ g/mL,移液枪吸打混匀,55 $^{\circ}$ C过夜消化,之后加入等体积的Tris平衡酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),缓慢颠倒混匀5 min,4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min离心10 min,取上清液至一个新的1.5 mL离心管中,加入等倍体积氯仿/异戊醇(24:1),缓慢颠倒混匀5 min,4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min离心10 min,取上清液至一个新的1.5 mL离心管中,加入1/10体积的3 mol/L NaAc(pH 5.4)和2倍体积的无水乙醇。-20 $^{\circ}$ C放30 min,12 000 r/min离心8 min,去掉上清液,加入1 mL 70%乙醇轻轻颠倒离心管2次,去掉上清液,室温挥发残留乙醇,用12 μ L无菌水溶解DNA。取8.5 μ L DNA溶液加入适量上样缓冲液于0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳检查,并用凝胶成像系统拍照。

1.6.2 微量组织DNA提取试剂盒法提取DNA

向放有剪碎胚盘的离心管中加入200 μ L组织裂解液,再加入蛋白酶K至终浓度100 μ g/mL,用移液枪吸打混匀,56 $^{\circ}$ C消化3h,操作方法参照试剂盒说明书。取8.5 μ L DNA溶液加入适量上样缓冲液于0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳检查,并用凝胶成像系统拍照。

1.6.3 优化的微量硅胶膜吸附柱法提取DNA

向放有剪碎胚盘的离心管中加入300 μ L禽血裂解液(2 mol/L 尿素、100 mmol/L Tris·Cl 100 mmol/L EDTA,高压灭菌后,加1%的SDS,pH 8.0),再加入300 μ L裂解结合液(5 mol/L异硫氰酸胍、0.05 mol/L Tris·Cl (pH 6.4)、0.1 mol/L EDTA (pH 8.0)、1.3% Triton-X100),用移液枪吸打至胚盘完全溶解,然后将液相移入硅胶膜吸附柱(微量)中,12 000 r/min离心1 min;弃废液,加入700 μ L漂洗液(80%乙醇),12 000 r/min离心1 min,弃废液,12 000 r/min离心3 min,换灭菌套管,开口挥发乙醇2 min,加入37 $^{\circ}$ C预热无菌水12.5 μ L,室温静置5 min,12 000 r/min离心1 min,收集DNA。取8.5 μ L DNA溶液加入适量上样缓冲液于0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳检查,并用凝胶成像系统拍照。

1.7 提取的DNA进一步PCR检测

用合成的引物分别以不同方法提取的DNA为模板进行PCR扩增。PCR扩增体系:模板DNA 2 μ L, P₁ (5 μ mol/L) 1 μ L, P₂ (5 μ mol/L) 1 μ L, dNTP (10 mmol/L) 2 μ L, 10 \times EasyTaq Buffer 2.5 μ L, EasyTaq DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 灭菌水 16 μ L。PCR扩增程序:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s, 64 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min共40个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min,然后降至4 $^{\circ}$ C。每组PCR反应设置1个阳性对照(以之前提取的鸡血液基因组DNA为模板)和一个阴性对照(以水为模板)。取5 μ L PCR产物,用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测,并用凝胶成像系统拍照。

2 结果与分析

2.1 第X期鸡胚盘组织的获得

由图1可知,受精蛋的胚盘要明显大于未受精的蛋,且颜色更深。

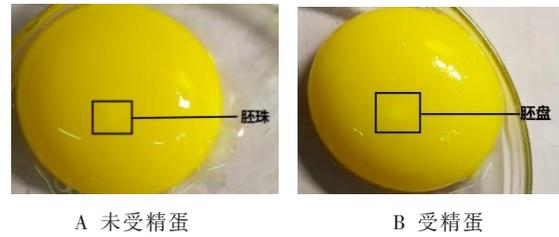
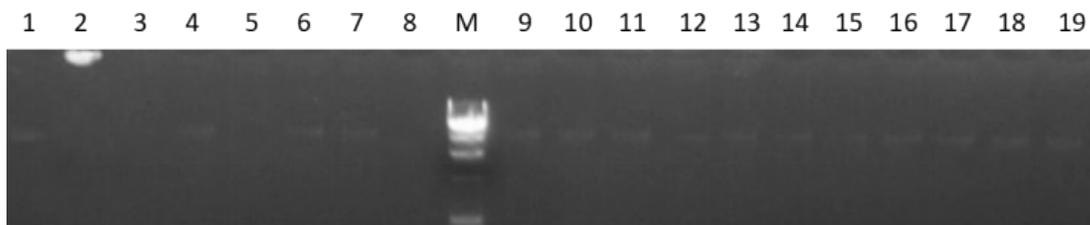


图1 未受精蛋和受精蛋的卵黄

2.2 提取的DNA凝胶电泳

由图2可知,酚氯仿抽提的8个样品中有4个样品基因组DNA凝胶电泳几乎看不到DNA条带,另外4个有较弱的DNA带,而且有一个样品在点样孔处有不明杂质。而微量组织DNA提取试剂盒法提取的10个样品基因组DNA凝胶电泳都有DNA条带,且亮度比较一致,这初步说明与微量组织DNA提取试剂盒法相比用酚氯仿抽提法提取的第X期胚盘DNA产量不够稳定、纯度也不一致。出现上述结果的主要原因可能在于第X期胚胎细胞数量少,DNA含量低,使用传统的酚氯仿抽提法提取DNA时,转移抽提后上层水相时都会存在误差,而且乙醇沉淀DNA时,由于DNA量太低肉眼难以看到,因此在去除乙醇沉淀后的上清液以及用70%乙醇洗涤时很容易导致DNA沉淀丢失,在最后用水溶解DNA时由于无法看到DNA沉淀的位置,导致无法保障全部DNA沉淀都能得到溶解,这些都可能用传统酚氯仿抽提法提取第X期胚胎DNA产量不稳定。另外,由于酚氯仿抽提法很难彻底去除蛋白和其他一些杂质,在操作中不同样品会存在一些操作误差,这也会导致提取得到的DNA纯度存在差异,尤其是提取微量样品时为了尽量减少DNA的损失,会尽量多地转移抽提后的上层水相,会增加将有机相和水相间杂质带入所取的含有DNA的水相中的几率,从而导致所提取的DNA纯度难以保障。

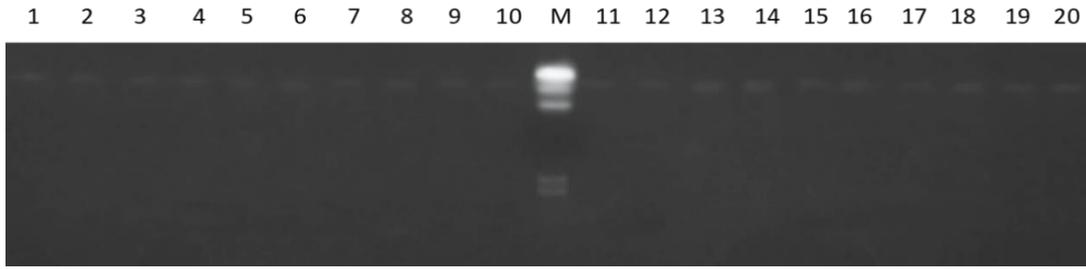


1~8:酚氯仿抽提法提取的DNA;M: λ -Hind III digest DNA Marker;9~19:微量组织DNA提取试剂盒法提取的DNA

图2 应用酚氯仿法和微量组织DNA提取试剂盒法提取的第X鸡胚盘提取DNA电泳结果

由图3可知,微量组织DNA提取试剂盒法和优化的硅胶膜法提取新鲜胚盘DNA,均能看到成型的DNA带,而且产量基本一致。初步说明优化

的硅胶膜吸附法与微量组织DNA提取试剂盒法相比具有相近的效果。



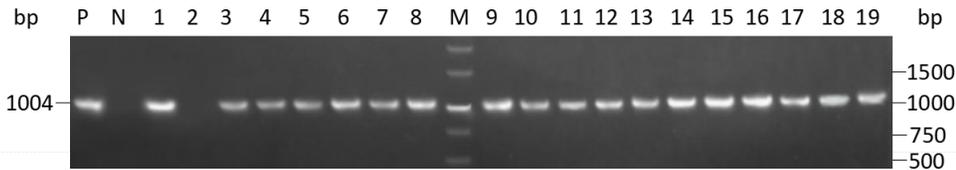
1~8:微量组织DNA提取试剂盒法提取的DNA;M: λ -Hind III digest DNA Marker;9~19:优化的硅胶膜法提取的DNA

图3 微量组织DNA提取试剂盒法和优化的硅胶膜吸附法提取的第X鸡胚盘提取DNA电泳结果

2.3 以不同方法提取的DNA进一步PCR扩增

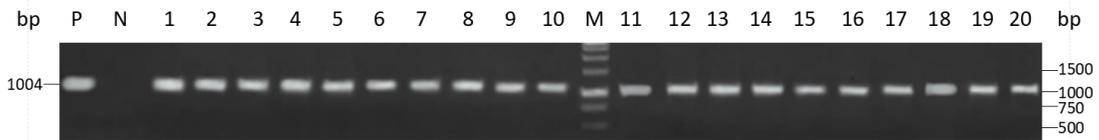
由图4和图5可知,用蛋白酶K消化然后通过酚氯仿抽提纯合获得的DNA有1个没有扩增出产物。而阳性对照P以及以常规硅胶膜吸附法和优化的硅胶膜吸附法提取DNA都有正确扩增产物。这进一步证实了2.2的推测。说明传统的酚氯仿抽提法用于提取第X期鸡胚盘DNA产量稳定性

和质量很难得到保障,容易出现假阴性现象,导致试验结果和结论的可靠性受到影响,因此不适合用于第X期鸡胚盘DNA的提取。而微量组织DNA提取试剂盒法和优化的硅胶膜吸附法具有更好的产量稳定性和更高的质量,能够获得满足后续研究需要的高质量的DNA。



P:阳性对照;N:阴性对照;1~8:酚氯仿抽提法提取DNA PCR产物;M:1kb DNA ladder;9~19:微量组织DNA提取试剂盒法提取DNA PCR产物

图4 以不同方法提取的鸡X期胚胎DNA为模板PCR扩增产物电泳结果



P:阳性对照;N:阴性对照;1~10:微量组织DNA提取试剂盒法DNA PCR产物;M:1kb DNA ladder;11~20:优化的硅胶膜吸附法提取DNA PCR产物

图5 以不同方法提取的鸡X期胚胎DNA为模板PCR扩增产物电泳结果

3 讨论与结论

成功地从不同类型的样品中提取得到高质量的DNA是很多相关分子生物学研究的前提和基础。对于不同类型的样品前人建立了一些特有的高效提取DNA方法。然而从第X期鸡胚盘样品中提取DNA的方法还未见有针对性的研究。而第X期鸡胚具有一定的特殊性,一是该样品细胞数量少,只有50 000~60 000个细胞,而且在取样中不可避免地会有蛋黄蛋白的混入,其蛋白含量较高,如不能充分使蛋白变性使之与DNA分离,可能会对DNA提取产生影响,使得提取的DNA产

量和质量不稳定而影响后续研究结果的可靠性。在前人的研究中,提取微量组织DNA多采用蛋白酶K消化,再利用经典的酚氯仿抽提抽提方法提取DNA,如孙研研等^[12]在鸡胚注射外源基因探讨转基因鸡制备方法可行性实验提取鸡胚DNA、李文明^[13]在研究胚胎死亡相关基因以及Casaril A E^[14]在提取沙蝇DNA用于基因分型,都采用了上述DNA提取的方法,结果显示用这种方法提取的第X期鸡胚DNA和沙蝇基因组DNA产量和质量不够稳定。本试验也尝试使用这一方法进行第X期鸡胚胎DNA的提取,得到了类似的结果,说明传统的酚氯仿抽提法不适合用于第X期鸡胚胎

DNA的提取。

硅胶膜吸附法是最近出现的一种基因组DNA提取的方法。避免了传统的酚氯仿抽提法存在的一些缺陷,能够获得稳定高质量的DNA。这一方法应用于从动物组织中提取DNA非常有效。但微量组织DNA提取试剂盒法提取动物组织DNA的方法中,因使用的组织裂解液并不能完全裂解组织细胞,常需要使用蛋白酶K消化组织样,而蛋白酶K消化组织样一般需要2~3 h,耗时长而且蛋白酶K价格高昂导致成本较高。而本实验中所用材料为细胞数量很少的第X期鸡胚,尝试对微量组织DNA提取试剂盒法提取DNA的方法进行优化,使用更强的去污剂破坏细胞、使用更强的蛋白变性剂组合使蛋白质充分变性并与DNA分离来代替蛋白酶K消化组织样的步骤。这样可优化DNA提取的步骤,使DNA提取更加快速,还能降低成本,因此本研究尝试使用含有更强蛋白变性能力的尿素的禽血裂解液^[15]代替组织裂解液,以及使用含有高蛋白质变性能力和具有离液剂作用的异硫氰酸胍^[16]以及含有更好的能够溶解细胞膜的非离子表面活性剂Triton X100^[17]的裂解结合液处理胚盘来替代蛋白酶K和微量组织DNA提取试剂盒的结合液。试验结果显示取得了良好的效果。DNA提取产物电泳结果初步显示新建立的优化的硅胶膜吸附法提取基因组DNA产量和质量基本和使用蛋白酶K消化的微量组织DNA提取试剂盒法相近,PCR检测结果显示优化硅胶膜提取DNA法和微量组织DNA提取试剂盒法提取的DNA质量都比较理想,比用传统的蛋白酶K消化然后经酚氯仿抽提纯化的方法提取的DNA产量更稳定质量也更好。

从上述分析可以看出用本研究建立的优化的硅胶膜吸附法提取第X期鸡胚盘DNA的方法,省去价格昂贵的蛋白酶K消化的步骤,提取获得的DNA具有和微量组织DNA提取试剂盒法相似的稳定、高效、高质量的效果,一方面降低了提取DNA的成本,相较于微量组织DNA提取试剂盒法,此方法平均每个反应可以节约13~14元,也节约了消化的时间,而与传统的蛋白酶K消化后酚氯仿抽提纯化的方法相比具有更高的产量稳定性和更高的质量。因此本研究建立了一个快速高效稳定的高质量第X期鸡胚盘DNA提取方法。为后续的相关研究建立了一个良好的DNA提取方

法。

参考文献:

- [1] Speedy A W. Global production and consumption of animal source foods[J]. *J Nutr*, 2003, 133(11 Suppl 2):4048S-4053S.
- [2] 刘海斌,赵月平,吴占福. 塞北乌骨鸡蛋营养成分分析[J]. *吉林农业科学*, 2009, 34(3):49-50, 57.
- [3] Bourikas D, Stoeckli E T. New tools for gene manipulation in chicken embryos[J]. *Oligonucleotides*, 2003, 13(5):411-419.
- [4] Torkashvand Hossein, Fathi, et al. The in vitro effect of chick embryo extract on mice pre-antral follicles[J]. *Veterinary research forum: an international quarterly journal*, 2019, 10(3): 213-219.
- [5] 孙研研,郑江霞,徐桂云,等. 外源基因导入鸡胚的两种显微注射方法的比较[J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18(5): 938-943.
- [6] Eyal-giladi H, Kochav S. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology[J]. *Dev Biol*, 1976, 49(2): 321-337.
- [7] Takehiko Y, Lekh R J, Hajime H, et al. *Hen Eggs: Basic and Applied Science*[M]. Boca Raton: CRC Press, 1996: 1-12.
- [8] 孙英民. 慢病毒载体制备转基因鸡技术平台的建立[D]. 保定:河北农业大学, 2011.
- [9] 魏莉莉. 早期鸡胚活性粗提物的初步应用研究[D]. 郑州:河南农业大学, 2015.
- [10] 杜 艳,陈复生,陈 晨,等. 转基因检测中大豆蛋白DNA提取方法筛选及其lectin基因降解分析[J]. *食品科学*, 2020(4):102-111.
- [11] 闫振天,司风玲,鲜鹏杰,等. 基于Chelex-100和蛋白酶K的蚊虫足样本DNA提取技术[J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 34(5):26-31.
- [12] 孙研研,蒋 斌,郑江霞,等. 胚盘下腔注射法将外源质粒pEGFP-N1导入鸡胚的研究[J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18(4):760-765.
- [13] 李文明. 鸡胚胎死亡相关基因的研究及胚盘性别鉴定技术的建立[D]. 武汉:华中农业大学, 2008.
- [14] Casaril A E, De Oliveira L P, Alonso D P, et al. Standardization of DNA extraction from sand flies: Application to genotyping by next generation sequencing[J]. *Exp Parasitol*, 2017, 177: 66-72.
- [15] 李向荣,陈得军,杨海艳,等. 尿素诱导牛血红蛋白变性的微量热和平衡透析研究[J]. *中国科学:化学*, 2010, 40(9): 1415-1421.
- [16] Piotr C, Nicoletta S. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(2): 581-585.
- [17] 贾 怡,周 斌,吕梅励,等. Triton X-100快速提取甲醛固定、石蜡包埋组织内DNA的方法[J]. *刑事技术*, 2003(6):6-8, 23.

(责任编辑:王 昱)