

非伤害性取样方法获取的拟穴青蟹 DNA 质量研究*

Study on the Quality of Genomic DNA from *Scylla paramamosain* by Nondestructive Sampling

蔡小辉¹, 彭银辉¹, 文 雪¹, 彭重威², 宋忠魁¹

CAI Xiao-hui¹, PENG Yin-hui¹, WEN Xue¹, PENG Chong-wei², SONG Zhong-kui¹

(1. 广西海洋研究所广西海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000; 2. 钦州学院北部湾海洋保护与开发利用实验室, 广西钦州 535000)

(1. Guangxi Key Laboratory for Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai, Guangxi, 536000, China; 2. Key Laboratory of Guangxi for Marine Protection and Exploitation and Utilization of Beibu Gulf, Qinzhou University, Qinzhou, Guangxi, 535000, China)

摘要: 选取5只采自广西北海的野生拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*), 分别采用非伤害性(血淋巴)和伤害性(肌肉组织)取样方法提取基因组 DNA 进行 COI 扩增和 ISSR 扩增, 检测 DNA 质量。结果表明, 非伤害性(血淋巴)和伤害性(肌肉组织)取样方法获得的拟穴青蟹全基因组 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 分别为 1.75~2.01 和 1.81~1.94, 全基因组 DNA 纯度均较高, 质量不相上下。同时, 两种取样方法获取的 DNA 扩增片段大小均在 600bp 左右, 同一个体扩增带型也是一致的。非伤害性(血淋巴)取样方法提取的基因组 DNA, 在质量上可以媲美伤害性取样(肌肉组织)提取的 DNA, 可以用于其它分子生物学实验研究。

关键词: 取样方法 非伤害性 DNA 质量 拟穴青蟹

中图分类号: Q173 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2010)02-0143-03

Abstract: The genomic DNA of five *Scylla paramamosain* which collected from Guangxi Beihai were obtained by nondestructive and destructive sampling and evaluated using the quality of genomic DNA and PCR amplification concerning target gene and ISSR. The result showed that the OD_{260}/OD_{280} of the genomic DNA obtained by nondestructive and destructive sampling were 1.75~2.01 and 1.81~1.94, respectively, which indicated that the quality and the purity of genomic DNA obtained by two different sampling were roughly the same. At the same time, the length of target gene were about 600bp and the band patterns of ISSR of the same one were identical by either nondestructive or destructive sampling. There is no qualitative difference between the genomic DNA from nondestructive and destructive sampling. The genomic DNA from nondestructive sampling can be used in other molecular biology studies.

Key words: sampling method, nondestructive, the quality of genomic DNA, *Scylla paramamosain*

获取 DNA 通常可以采用3种取样方法, 即非损伤性取样、非伤害性取样和伤害性取样^[1]。非损伤性取样在陆生珍稀动物保护遗传学研究中得到广泛应用, 但是存在获得 DNA 量少、降解严重而且容易受外源基因污染等缺点^[2,3]。非伤害性取样, 即通过捕捉动物抽取血液、采集毛发或尾部皮肤等材料提取

DNA, 具有对研究对象伤害性小、所得 DNA 质量较高等优点。伤害性取样是通过杀死动物获得新鲜肌肉、肝脏或者脾等组织用于提取 DNA, 对生物资源迫害程度大, 不利于野生资源保护^[3]。多数学者已经倾向于考虑非伤害性取样方法在实际中的应用, 如梁利群等^[4]从转基因鱼的鳍条中抽提 DNA, 可用于 Southern Blot 杂交; Wasko 等^[5]以尿素处理不同种类鱼的鳍条和鳞片, 并从其中提取 DNA, 应用于 RAPD 分析和 DNA 测序; Pidancier 等^[6]选择两栖动物口腔粘液作为供试材料提取 DNA, 扩增出目的基因片段和开展微卫星标记分析; 文献^[7]从蝙蝠活

收稿日期: 2009-10-13

修回日期: 2010-01-12

作者简介: 蔡小辉(1982-), 女, 硕士, 主要从事遗传育种研究。

* 广西教育厅科研课题(200809MS095)和广西海洋生物技术重点实验室开放基金(GKLMBT-0801)资助。

体裁剪小块翼膜抽提 DNA,并用于隐种的研究。

拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 属甲壳类十足目梭子蟹科青蟹属,是我国东南沿海青蟹属优势种^[8]。拟穴青蟹在我国长江口以南的沿海省份均有分布,其肉质细嫩、味鲜美、营养丰富,是我国传统的海珍品。人们已利用分子生物学技术对拟穴青蟹展开了一系列研究,涉及到种质资源和系统进化等^[9~12]。作为研究首要步骤的取样方法,多数学者习惯采取伤害性取样方法,即通过解剖分离拟穴青蟹螯足或步足肌肉提取基因组 DNA。伤害性取样方法在拟穴青蟹研究中的应用既提高了研究成本,又不利于拟穴青蟹野生资源的保护。本文首次尝试建立拟穴青蟹非伤害性取样方法,为拟穴青蟹的分子生物学研究,尤其为遗传背景的认知和分子标记辅助选育提供技术参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料与取样方法

选取5只采自广西北海的野生拟穴青蟹作为实验材料。拟穴青蟹体重120g左右,鲜活好动。血淋巴采集:事先用75%酒精擦拭采血部位,再将一次性注射器(1ml)刺破第3步足基节关节膜,插入深度约5mm,抽取100 μ l血淋巴并立即注入装有ACD抗凝剂的灭菌离心管中,轻轻振荡使其与抗凝剂充分混匀。拟穴青蟹抽取血淋巴后,将其腹部朝上平放于水平桌面上很快能翻身活动,个体活力并未受到影响,抽取拟穴青蟹的微量血淋巴没有对其造成伤害,达到非伤害性取样的目的。肌肉组织采集:使用消毒过的解剖剪剥离螯足肌肉约50mg,置于灭菌离心管备用。拟穴青蟹抽取肌肉组织后,将其腹部朝上平放于水平桌面上不能翻身活动,个体活力受到影响,抽取拟穴青蟹的肌肉组织对其造成了伤害,属于伤害性取样。

1.2 全基因组 DNA 提取

采用常规方法(包括 SDS/蛋白酶 K 裂解、酚/氯仿抽提等)从100 μ l血淋巴和50mg肌肉组织中分离全基因组 DNA,空气晾干,无菌双蒸水溶解,置于-20 $^{\circ}$ C备用。采用核酸蛋白测定仪(Eppendorf, Germany)测定总 DNA 浓度,以1.0%琼脂糖凝胶电泳(0.5 \times TBE)检测其质量。

1.3 COI 扩增

参考路心平等^[12]设计的拟穴青蟹 mtDNA COI 引物(Mtd-10-sp-5'-CTG ATT CTT TGG TCA CCC AGA AGT-3'; CLN-2769-sp-5'-TTA AGT

CCT AGA AAA TGT TGG GGA A-3'),合成拟穴青蟹 COI 引物并进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:10 \times PCR buffer 5.0 μ l,模板 DNA 用量为11ng, Taq DNA 聚合酶为1U, Mg²⁺浓度为1.5mmol/L, dNTP 浓度为0.5mmol/L,引物浓度为0.1 μ mol/L,加水至50 μ l;反应程序:94 $^{\circ}$ C预变性10min;94 $^{\circ}$ C变性45s,57 $^{\circ}$ C退火45s,72 $^{\circ}$ C延伸1min,37个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min,4 $^{\circ}$ C保存。PCR 反应在 AG 22331型 PCR 扩增仪(Eppendorf, Germany)上进行。PCR 扩增产物以1.5%琼脂糖凝胶电泳(0.5 \times TBE)检测,自动凝胶成像仪(Alpha innotech, USA)观察拍照。

1.4 ISSR 反应

以本实验室筛选出的 ISSR 引物846(CA)₈RT (R 为 G 或 A)对两类取样方法所获模板 DNA 进行 PCR 扩增。反应条件:10 \times PCR buffer 2.5 μ l,模板 DNA 用量为11ng, Taq DNA 聚合酶为0.75U, Mg²⁺浓度为1.5mmol/L, dNTP 浓度为0.2 mmol/L,引物浓度为0.8 μ mol/L,加水至25 μ l;反应程序:94 $^{\circ}$ C预变性5min;94 $^{\circ}$ C变性30s,60.4 $^{\circ}$ C退火45s,72 $^{\circ}$ C延伸1min,38个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min。PCR 反应在 EDC-810型热循环仪(东胜创新,中国)上进行。ISSR 扩增产物检测方法与 COI 扩增产物检测方法相同。

2 结果与分析

2.1 全基因组 DNA 电泳结果

从图1的1 μ l点样电泳结果来看,采用两类取样方法所获取的全基因组 DNA 在质量上不相上下。血淋巴和肌肉组织全基因组 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 分别为1.75~2.01和1.81~1.94,血淋巴和肌肉组织的全基因组 DNA 纯度均较高。



图1 拟穴青蟹血淋巴和肌肉全基因组 DNA 电泳图谱
1、3、5、7、9为血淋巴全基因组 DNA;2、4、6、8、10为肌肉全基因组 DNA;M 为标准分子量。

2.2 COI 扩增结果

图2目的基因 COI 片段扩增结果显示,来自血淋巴和肌肉组织的 DNA 扩增片段大小均在600bp左右,与预期片段大小相符。

2.3 ISSR 扩增结果

从图3可以看出,同一个体的血淋巴和肌肉的扩增带型是一致的,表明非伤害性提取的 DNA 用于遗传结构分析能获得可信的结果。

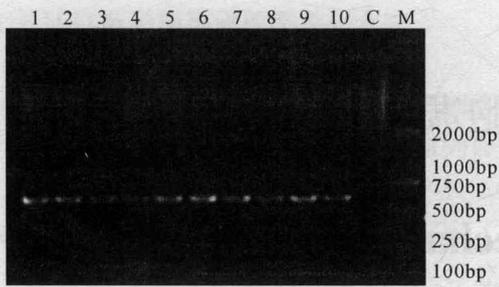


图2 拟穴青蟹血淋巴和肌肉 COI 电泳图谱
1、3、5、7、9为血淋巴 COI 图谱;2、4、6、8、10为肌肉 COI 图谱;C 为阴性对照;M 为标准分子量。

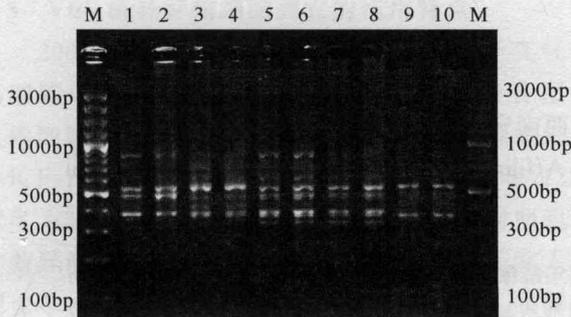


图3 拟穴青蟹血淋巴和肌肉 ISSR 电泳图谱
1、3、5、7、9为血淋巴 ISSR 电泳图谱;2、4、6、8、10为肌肉 ISSR 电泳图谱。1和2,3和4,5和6,7和8,9和10为同一个体;M 为标准分子量。

3 结束语

本文以 COI 片段扩增和 ISSR 扩增作为评价手段,证明了对拟穴青蟹进行非伤害性取样(抽取微量血淋巴)提取的基因组 DNA,在质量上可以媲美伤害性取样(剥离肌肉)提取的基因组 DNA,说明非伤害性取样可以用于分子生物学实验。

针对不同动物建立非伤害性取样方法,供试组织并不是统一的。譬如,梁利群等选择鱼的鳍条, Pidancier 等选择两栖动物的口腔粘液作为供试材料^[4,6]。本研究通过采集拟穴青蟹的血淋巴,建立非伤害性取样方法,适宜对象是拟穴青蟹,可以为保护生物学研究和分子选育研究提供技术参考。

致谢:

衷心感谢广西红树林研究中心阎冰研究员在技

术和理论上给予的大力支持和协助。

参考文献:

[1] Taberlet P, Waits L P, Luikart G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap[J]. Trends Ecol Evol, 1999, 14: 323-327.

[2] 陈璐, 岳曦. 非损伤性取样研究进展[J]. 四川动物, 2007, 26(1): 224-226.

[3] 李明, 魏辅文, 饶刚, 等. 非损伤性取样法在保护遗传学研究中的应用[J]. 动物学报, 2001, 47(3): 338-342.

[4] 梁利群, 孙孝文, 王鹏, 等. 利用鳍条提取样品总 DNA 初探[J]. 生物技术, 1994, 4(1): 45-46.

[5] Wasko A P, Martins C, Oliveira A C, et al. Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales [J]. Hereditas, 2003, 138: 161-165.

[6] Pidancier N, Miquel C, Miaud C. Buccal swabs as a non-destructive tissue sampling method for DNA analysis in amphibians [J]. Herp Journal, 2003, 13: 175-178.

[7] Kaňuch P, Hájková P, Řehák Z, et al. A rapid PCR-based test for species identification of two cryptic bats *Pipistrellus pipistrellus* and *P. pygmaeus* and its application on museum and dropping samples [J]. Acta Chiropterol, 2007, 9(1): 277-282.

[8] 高天翔, 王玉江, 刘进贤, 等. 基于线粒体 12S rRNA 序列探讨 4 种青蟹系统发育关系及中国沿海青蟹的分类地位 [J]. 水产学报, 2005, 29(3): 313-317.

[9] 马凌波, 张凤英, 乔振国, 等. 中国东南沿海青蟹线粒体 COI 基因部分序列分析 [J]. 水产学报, 2006, 30(4): 463-468.

[10] 林琪, 李少箐, 黎中宝, 等. 中国东南沿海青蟹属不同种类的 mtDNA COI 基因序列分析及其系统发育 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2008, 47(2): 268-273.

[11] 吉鹏宇, 沈琪, 唐小林, 等. 六个青蟹群体的线粒体 16S rRNA 和 COI 基因部分序列差异 [J]. 海洋湖沼通报, 2008(4): 69-77.

[12] 路心平, 马凌波, 乔振国, 等. 利用线粒体 DNA 标记分析中国东南沿海拟穴青蟹种群遗传结构 [J]. 水产学报, 2009, 33(1): 15-23.

(责任编辑: 韦廷宗 邓大玉)

(上接第 142 页)

[10] Whitman W B, Coleman D C, Wiebe W J. Prokaryotes: The Unseen majority [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(12): 6578-6583.

[11] 田新玉, 徐毅, 刘洪灿, 等. 嗜盐嗜碱杆菌属的一个新种 [J]. 微生物学报, 1997, 37(1): 1-6.

[12] 田新玉, 刘洪灿, 郭金昌. 青岛东风盐场中极端嗜盐古细菌的特性 [J]. 应用与环境生物学报, 1998, 44(2):

175-178.

[13] 徐美秀, 王凤平, 肖湘. 深海沉积物样品中古菌的 16SrDNA 分析 [J]. 自然科学进展, 2003, 13(6): 598-603.

[14] 李涛, 王鹏, 王品先. 南海西沙海槽表层沉积物微生物多样性 [J]. 生态学报, 2008, 28(3): 1166-1173.

[15] 陈皓文, 孙修勤. 发展和应用分子微生物学技术, 开发未知海洋细菌 [J]. 自然杂志, 2002, 24(3): 129-134.

(责任编辑: 尹 闯)