

两种方法提取柔嫩艾美耳球虫孢子化卵囊 基因组DNA的对比试验*

张志敏, 于三科, 林 青, 余招锋, 翟军军

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为寻找一种合适的提取球虫基因组DNA的方法, 试验采用氯化苄法(BC)和常规提取DNA的方法提取了鸡柔嫩艾美耳球虫孢子化卵囊基因组DNA。氯化苄的化学性质类似于苯酚, 在65℃条件下与蛋白质和几丁质等发生反应, 能够有效地破坏球虫卵囊壁, 可用于大规模提取基因组DNA; 常规方法提取DNA的程序是用蛋白酶K消化处理, 用酚/氯仿抽提, 再用氯仿抽提, 部分步骤需要重复。2种方法对比试验结果表明, 二者均可用于鸡球虫基因组DNA的提取, 所获得的DNA数量和质量都很高, 可用于各种分子生物学实验。但BC法具有简便、快速、经济实用的特点, 更适用于球虫卵囊大量样品的DNA快速提取。

[关键词] 氯化苄; 球虫; 孢子化卵囊; 基因组DNA

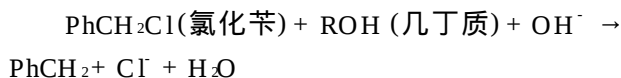
[中图分类号] S858.312.72⁺3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)05-0009-03

随着分子生物学技术在寄生虫研究领域的广泛应用, 为寄生虫病的防治开拓了新的思路, 对球虫病分子生物学的研究也不例外。自20世纪80年代末至90年代初, 国外就开始从分子水平研究鸡球虫基因, 但无论采用哪种分子生物学技术, 都必须提取一定数量的核酸^[1]。在重组疫苗和基因工程疫苗的研究中, 除了要获得一定量的核酸外, 提取方法还应简便易行。

氯化苄(benzyl chloride, BC)是一种疏水性化合物, 化学性质类似于苯酚, 能够与多糖类物质如几丁质、纤维素等末端羟基发生反应, 其化学反应方程式为:



同时, 氯化苄能降解蛋白质, 并可从水相中抽提出蛋白质, 从而能够使DNA从鸡球虫卵囊中提取出来。目前, 用BC法提取核酸的方法在国内外已有报道, 如从细菌、真菌、植物及家蚕体内提取DNA以及从水稻中提取RNA等^[2~5]。在寄生虫方面, 也有人用BC法从微孢子虫体内提取出了基因组DNA。但由于球虫卵囊壁与一般细胞壁的结构有所不同, 因而需要寻求一种不同于常规的提取DNA

的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 虫种 鸡柔嫩艾美耳球虫杨凌株孢子化卵囊, 由西北农林科技大学动物寄生虫学实验室保存提供。

1.1.2 试验动物 尼克红小公雏, 购自西北农林科技大学畜牧站鸡场, 饲养于经高温消毒过的隔离器中, 自由采食和饮水, 饲喂不加任何抗球虫药的饲料, 饲料经高温消毒。

1.1.3 试剂 用BC法提取DNA所用试剂: DNA提取缓冲液(100 mmol/L Tris·Cl, pH 8.0; 40 mmol/L EDTA, pH 8.0); TE缓冲液(10 mmol/L Tris·Cl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0); 100 g/L 十二烷基磺酸钠(SDS); 氯化苄; 醋酸钠 3 mmol/L (pH 5.2); 异丙醇; 乙醇等。

用常规法^[6]提取DNA所用试剂: 细胞裂解液(0.1 mol/L NaCl; 10 mmol/L Tris·Cl, pH 8.0; 100 mmol/L EDTA, pH 8.0); 5 g/L SDS, 100 μg/mL 蛋白酶K; RNA酶; 平衡酚; 酚/氯仿/异戊醇; 乙醇等。

* [收稿日期] 2004-07-20

[基金项目] 西北农林科技大学重点科研项目(0808); 西北农林科技大学青年教师科研专项基金(080807)

[作者简介] 张志敏(1977-), 女, 河南许昌人, 在读硕士, 主要从事动物疫病防治研究。

[通讯作者] 于三科(1957-), 男, 陕西扶风人, 教授, 主要从事动物疫病防治研究。

1.2 方 法

1.2.1 鸡柔嫩艾美耳球虫孢子化卵囊的收集 用单卵囊分离技术增殖纯化的鸡柔嫩艾美耳球虫杨凌株孢子化卵囊,按 1×10^3 /羽接种 14 日龄无球虫小公雏,感染 7 d 后剖杀鸡,收集盲肠。参照蒋建林等^[7]的方法略加改进后进行卵囊的分离和纯化,将其孢子化后置于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 用 BC 法提取球虫基因组 DNA 取柔嫩艾美耳球虫孢子化卵囊 0.5 mL (约 1×10^6 个卵囊)充分洗涤,除去卵囊中的重铬酸钾溶液。加入少量 DNA 提取液,研磨成匀浆。提取 DNA 的步骤为:向匀浆液中加入 400 μ L DNA 提取液,100 μ L 100 g/L SDS 和 200 μ L 氯化苄,混合均匀使之溶解,得到乳浊液;将该液体在 65℃ 水浴中孵育 1.5~2 h,每 15 min 剧烈振荡 1 次;加入 3 mmol/L 醋酸钠 200 μ L (pH 5.2),冰浴上放置 20 min,镜检观察直到 85% 的卵囊破裂,混合物在 4℃ 条件下以 12 000 r/min 离心 15 min;取上清液于另一干净离心管中(若蛋白含量多可用氯仿抽提 1 次),加入 0.6 倍体积的异丙醇,混匀后冰浴上放置 20 min,4℃ 条件下以 12 000 r/min 离心 15 min,所得沉淀即为提取的 DNA;用体积分数 70% 乙醇洗涤 2 次,室温下干燥后加 50 μ L TE 缓冲液溶解,然后在 -20℃ 条件下保存备用。

1.2.3 用常规法提取球虫基因组 DNA 将洗涤好的鸡柔嫩艾美耳球虫孢子化卵囊 0.5 mL 放入研钵中,加入少量细胞裂解液研磨成匀浆。提取 DNA 的步骤如下:向研磨好的匀浆液中加入 700 μ L 细胞裂解液后,将细胞悬液于 50℃ 水浴 3 h,不时旋动悬液;加入 RNA 酶至终浓度为 200 μ g/mL,37℃ 孵育 15 min,冷却至室温;加入等体积平衡酚,缓慢地来回颠倒离心管 10 min,以小心混合两相,形成乳浊液,4℃ 条件下以 12 000 r/min 离心 3 min 使两相分开;将粘稠的水相移至另一干净的离心管中,用等体积酚:氯仿:异戊醇(体积比 25:24:1)混合液抽提 2 次,再用氯仿抽提 1 次除去酚;将全部水相转移至另一离心管中,加 2.5 倍体积无水乙醇于 -20℃ 放置 20 min 后,在 4℃ 条件下以 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,注意保留 DNA 团;用体积分数 70% 乙醇洗涤 2 次,室温下干燥后加 50 μ L TE 缓冲液溶解,于 -20℃ 保存备用。

2 结果与分析

2.1 电泳检测 DNA

将用 2 种方法提取的 DNA 用 10 g/L 的琼脂

糖凝胶电泳检测,结果见图 1。由图 1 可以看出,2 种方法提取的 DNA 均无 RNA 污染,DNA 未出现降解现象。

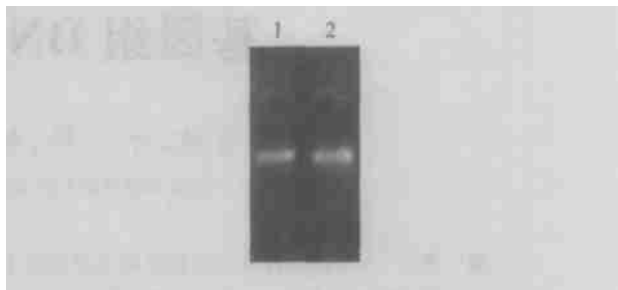


图 1 *Eimeria tenella* 孢子化卵囊基因组 DNA 电泳图谱

1 用常规法提取的基因组 DNA;

2 用 BC 法提取的基因组 DNA

Fig 1 Electrophoresis result of the total genomic DNA from the sporulated oocyst of *Eimeria tenella*

1 Extracted DNA by using the usual method;

2 Extracte DNA by using BC

2.2 紫外分光光度仪检测 DNA

用紫外分光光度仪检测 260 和 280 nm 光吸收,计算球虫基因组 DNA 的纯度,结果 2 种方法的 OD_{260}/OD_{280} 比值均在 1.75~1.80,可进一步说明提取物为 DNA。计算 DNA 的浓度,即 OD_{260} 乘以稀释倍数的 0.05 倍,得 2 种方法的 DNA 浓度分别为 500 和 300 ng/mg。表明上述 2 种方法均可以用于鸡球虫基因组 DNA 的提取;但从提取 DNA 的浓度上看,BC 法提取 DNA 的量多于常规法,说明 BC 法提取鸡球虫基因组 DNA 比常规方法效果要好。

3 讨 论

球虫是一种低等的真核生物,艾美耳属球虫由 900 多种球虫组成,宿主范围很广,包括动物、昆虫及脊椎动物等,但一种球虫只能感染一种宿主^[8]。随粪便排出的球虫卵囊为了能侵入新的宿主,在外界环境中须发育成有感染性的孢子化卵囊。在长期进化过程中,球虫卵囊为了抵抗外界各种不良的环境,卵囊壁由 10 nm 厚的外层壁和 90 nm 厚的内层壁组成^[9,10]。这双层壁由 2 种类型的“壁形成体”(Wall Form Body)组成,即 WFB I 和 WFB II,WFB 由糖蛋白及其内容物构成。关于艾美耳属球虫卵囊壁蛋白的生物化学特征报道不多,这种蛋白及其壁形成体内容物之间形成卵囊双层壁结构的机理还不清楚。由于球虫卵囊壁结构的复杂性和特殊性,为提取球虫 DNA 和 RNA 带来了许多不便,因此寻找一种

合适的提取球虫基因组DNA 的方法显得极为重要。

通过对比试验可以看出, 2 种方法都可用于球虫基因组DNA 的提取, 但是从提取DNA 的量和提取过程上看, BC 法更适用于球虫孢子化卵囊基因组DNA 的提取。用等量的球虫卵囊提取时, BC 法提取的DNA 明显多于常规法。从2 种方法提取DNA 的过程上分析, 用常规法提取DNA 所用试剂较多, 如蛋白酶K、平衡酚、氯仿等, 不仅试剂昂贵, 步骤烦琐, 整个实验操作过程耗时多, 而且对于大规模提取

球虫基因组DNA 也不太经济; 而用BC 法提取鸡球虫DNA 仅需1~2 h, 所用试剂少, 步骤简单, DNA 提取缓冲液为普通化学试剂配制而成, 突出特点为使用了高盐离子溶液。通常情况下, 核酸可与1 价、2 价阳离子形成盐类, 在Tris·Cl 和EDTA 存在下可避免盐与DNA 的共沉淀, 不影响提取DNA 的质量。所以用BC 法提取鸡球虫DNA 既简便、易行, 又保证了提取DNA 的完整性和纯度。因此, 用BC 法提取球虫基因组是一种切实可行的方法, 对大量样品的提取更为经济实用。

[参考文献]

- [1] 汪永庆, 王新国, 徐来祥, 等. 一种动物基因组DNA 提取方法的改进[J]. 动物学杂志, 2001, 36(1): 27- 29
- [2] Hatakayama Y, hauasaka S. A new method of pebrine inspection of silkworm egg using multiprimer PCR[J]. J Invertebr Pathol, 2003, 82(4): 148- 151
- [3] Zhu H, Qu F, Zhu L. H. Isolation of genomic DNA s from plants, fungi and bacteria using benzyyl chloride[J]. Nucleic chloride J Exp Bot, 2001, 52(6): 1575- 1579
- [4] Raina K, Chandlee J M. Recovery of genomic DNA from afungus (*Sclerotinia ham oecarpa*) with high polysaccharide content[J]. Biotechniques, 1996, 21(6): 1030- 1039
- [5] Salah M A, Iciar M. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-basee techniques[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(22): 4692- 4693
- [6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆实验指导[M]. 第3 版. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 译. 北京: 科学出版社, 1999. 463- 469
- [7] 蒋建林, 蒋金书. 柔嫩艾美耳球虫各阶段纯化的改进[J]. 中国农业大学学报, 1996, 1(5): 99- 102
- [8] 蒋金书. 动物原虫病学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000. 165- 174
- [9] Belli S I, W itcombe D, W allach M G. Functional genom ics of gam 56: chaacterisstion of the role of a 56 kilodalton sexual stage antigen in oocyst wall fomation in *Eimeria maxima*[J]. Int J Parasitol, 2002, 32: 1727- 1737.
- [10] Belli S I, W allach M G, Smith N C. Clining and characterization of the 82 kDa tyrosine-rich sexual stage glycoprotein, GAM 82, and its role in oocyst wall fomation in the apicomplexan parasite, *Eimeria maxima*[J]. Gene, 2003, 307: 201- 212

Compara of two methods for extraction of genom ic DNA from *Eimeria tenella* sporulated oocysts

ZHANG Zhi-m in, YU San-ke, L IN Q ing, YU Zhao-feng, ZHA I Jun-jun

(College of A nim al Science and Technology, N orthwestern A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to look for a suitable method for extracting high quality genomic DNA from *Eimeria tenella* sporulated oocysts, the benzyl chloride method was used in comparison with the usual method. Benzyl chloride, which had chemical characteristics similar to phenol, could efficiently break sporulated oocyst wall. The results indicated that, the two methods were efficient for extracting genomic DNA. The quantity and quality of the DNA extracted by these two methods were all high. But the benzyl chloride method was not only simple and fast, but also inexpensive. Therefore, the benzyl chloride method is fit for large-scale preparation of genomic DNA from *E. tenella* sporulated oocysts.

Key words: benzyl chloride; *Eimeria tenella*; sporulated oocyst; genomic DNA