

“十一五”国家重点图书出版规划



应用生物技术大系

Comprehensive Series of Applied Biotechnology



水产生物DNA分子标记技术

刘云国 等 编著



科学出版社
www.sciencep.com

应用生物技术大系

水产生物 DNA 分子标记技术

刘云国 等 编著



内 容 简 介

本书首先介绍了水产生物核酸分子的提取、纯化和定量方法,总结了各种 DNA 分子标记技术的原理及操作步骤,同时介绍了水产生物 DNA 分子标记开发技术、水产生物育种技术、水产生物遗传作图技术、DNA 条形码技术及 LAMP 技术在水产中的应用,概述了水产生物信息学产生的背景及其主要研究内容。同时,重点阐述了不同 DNA 分子标记技术在鱼类、虾类、贝类、藻类中的应用进展,主要从遗传背景分析、遗传多样性研究、分子系统进化及系谱探讨、种质资源鉴定、基因标记、QTL 定位、分子标记辅助育种、遗传图谱构建、基因定位克隆、基因组学和比较基因组学、功能基因克隆、性别相关分子标记研究等方面进行了系统综述,内容涵盖了相关领域的最新研究成果。

本书可供海洋、水产领域高等院校教师和学生、科研院所研究人员以及农业、水产部门的管理者参考阅读。

图书在版编目 (CIP) 数据

水产生物 DNA 分子标记技术/刘云国等编著. —北京:科学出版社, 2009

(应用生物技术大系)

ISBN 978-7-03-023581-7

I. 水… II. 刘… III. 水产生物-脱氧核糖核酸-研究 IV. S968 Q523

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009)·第 192258 号

责任编辑:莫结胜 刘 晶/责任校对:张怡君

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新蕾印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009 年 4 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2009 年 4 月第一次印刷 印张:17 1/4

印数:1—1 500 字数:403 000

定价:60.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换<新蕾>)

编著委员会

主 编 刘云国

副主编 刘贤德 高 焕 李朝霞 杜长青

委 员(按姓氏笔画排序)

马 云	马维兴	王英超	田永盛	石启龙
任国诚	任国艳	刘春英	刘 洋	刘凌霄
孙百晔	孙修勤	张玉喜	张 健	张家松
李八方	李方正	李正义	李 伟	李 宏
李俊峰	李 静	汪东风	沙珍霞	房保海
林 洪	范玉顶	郑风荣	郑法新	胡自民
姜英辉	祝素珍	赵丽青	唐 静	栾 生
秦艳杰	贾俊涛	高天翔	龚小玲	程培周
雷质文	鲍宝龙	阚世红	魏晓棠	



序

水产生物技术正日益成为世界各国研究开发的重点和水产科技竞争的焦点。世界各国政府，特别是发达国家纷纷抢占水产生物技术及其产业的制高点。美国自 1997 年开始投巨资开展水产生物技术研究，其重点是 5 种养殖动物（沟鲰、大麻哈鱼、罗非鱼、对虾及牡蛎）的基因组作图和全序列分析（即结构基因组计划），目前已取得重大进展。近十多年来，水产养殖业迅猛发展，养殖的种类、数量越来越多，养殖的面积和规模越来越大。如何有效地挖掘海洋鱼类资源的潜力，选育、改良和培育出生长快、肉质好、抗逆性强的优良品种是当前水产育种的主要任务。DNA 分子标记是以脱氧核糖核酸的多态性为基础的遗传标记，它能够稳定遗传，且遗传方式简单，可以反映生物的个体和群体特征。与形态学标记、细胞学标记、生理生化标记相比，由于它具有标记位点多、特异性强、标记稳定可靠、遗传信息量大、实验重复性强等特性，且不受生物的年龄、发育阶段、性别和养殖环境条件的影响，因此，自问世以来备受遗传学家和育种学家的青睐。目前，它已被应用在水产生物的基因定位、品种鉴定、资源评价、物种亲缘关系和系统演化分析、分子标记辅助选择等诸多方面，展现出了广阔的应用前景。

水产资源的开发利用是农业经济的一个重要组成部分。目前大多数水产动物的捕捞量已经超出了可持续发展的限量。与农作物相比，水产动物的家养化过程要远远落后，大部分品种的养殖还是依赖野生种群；很多品种很少或根本没有经过选育。一些养殖品种流行病的暴发和大规模死亡都说明了对水产动物进行选育和遗传改良的迫切性和必要性。传统的选育非常缓慢，而且具有不确定性，未来的遗传改良要更多地依赖于各种 DNA 分子标记手段。今后水产养殖动物如抗病、生长、品质等重要数量性状，将不仅仅依赖分子标记辅助育种，而且要在继续提高遗传连锁图谱密度的基础上，充分利用比较基因组学的手段，把分子标记精细定位到图谱上，最终定位克隆数量性状的基因。

该书全面系统地介绍了各种分子标记的原理、操作流程、优缺点以及它们在水产生物研究中的应用，涵盖了相关领域的最新研究成果和实例，非常值得读者参考借鉴，是以为序。

陈松林

研究员

中国水产科学研究院水产生物技术领域首席科学家

2008 年 11 月



前 言

标记技术是根据物体所具有或者被具有的特性来认识物体的一种鉴别手段。在生命科学研究中,标记技术所采用的标记,通常是利用生物体或其显微结构,或其分子水平中的某一已知的遗传特点,或理化特异性而区别于其他个体或个体的某一结构。DNA 分子标记是以生物大分子物质脱氧核糖核酸的多态性为基础的遗传标记,它能够稳定遗传,且遗传方式简单,可以反映生物的个体和群体特征。目前,它已被广泛地应用在基因定位、品种鉴定、资源评价、物种亲缘关系和系统演化分析、分子标记辅助选择等许多方面。

近年来,水产养殖业迅猛发展,养殖的种类、数量越来越多,养殖的面积和规模越来越大,而培育优良品种是水产养殖业的重要发展方向。大多数水产生物的重要经济性状,如抗病力、生长速度、肉质等都表现为数量性状遗传,应用传统的遗传育种标记方法无法确定这些重要性状是由哪些具体的基因控制的,因此 DNA 分子标记技术无疑是水产生物遗传育种的有力工具。应用 DNA 分子标记技术进行水产生物种质资源研究、遗传结构特征分析、品种鉴定、资源状况的调查和评估,将有利于水产生物资源的保护、管理和开发;应用 DNA 分子标记分析水产生物亲缘关系、预测杂交优势、检测和评估育种效果、筛选优良品种,将有利于水产生物优良品种的选育、培育研究;应用 DNA 分子标记分析与重要经济性状有关的连锁基因,有利于重要经济性状基因的筛选、分离与克隆,从而有利于促进水产生物的品系改良的研究。由此可见,应用 DNA 分子标记技术来开展水产生物遗传育种是突破传统育种、有效开发和保护水产生物资源的重要途径。

在本书中,我们首先根据水产生物的特点,介绍了水产生物核酸分子的提取和纯化方法,并阐述了不同 DNA 分子标记技术及其在鱼类、虾类、贝类、藻类中的应用进展。同时,根据水产学最新研究的情况,介绍了 DNA 条形码技术和 LAMP 技术在水产中的应用。本书还介绍了水产生物 DNA 分子标记开发技术、水产生物育种技术、水产生物遗传作图技术,概述了水产生物信息学产生的背景及其主要研究内容。水产生物的性别控制及其连锁标记是近年来人们重点关注的一个研究课题,本书单独用一章介绍了水产生物性别相关分子标记研究进展,涵盖了相关领域最新研究成果。

本书编写的大体分工为:刘云国同志负责第一、二、三、五、六、七章的编写,并负责本书的统稿工作;张家松同志负责第四章的编写;郑法新同志负责第八章的编写;李朝霞同志负责第九章的编写;高焕同志负责第十章的编写;刘贤德、秦艳杰同志负责第十一章的编写;杜长青同志负责第十二章的编写;李静同志负责第十三章的编写。高天翔老师对部分章节进行了内容补充和校正。另外,刘贤德、程培周、刘春英、李方正、李俊峰、王英超、孙百晔等还帮助刘云国同志完成了本书的部分写作任务。

由于我们的水平有限,经验不足,撰写时间比较仓促,书中错误和疏漏之处在所难免,恳切希望广大读者批评指正。

刘云国

2008 年 10 月于青岛

• iii •

船 夢

PDG

目 录

序

前言

第一章 水产生物核酸分子的提取、纯化和定量	1
第一节 DNA 提取概述	1
第二节 鱼类 DNA 提取方法	3
第三节 虾类肌肉 DNA 提取方法	4
第四节 贝类 DNA 提取方法	6
第五节 藻类 DNA 提取方法	8
第六节 线粒体 DNA 提取方法	10
第七节 叶绿体 DNA 提取方法	13
第八节 RNA 提取方法	15
第九节 核酸的定量和纯度测定	18
参考文献	19
第二章 DNA 分子标记技术概况	20
第一节 分子标记概述	20
第二节 RFLP 标记	22
第三节 RAPD 标记	27
第四节 SCAR 标记	31
第五节 SSR 标记	32
第六节 ISSR 标记	35
第七节 AFLP 标记	37
第八节 EST 标记	43
第九节 SNP 标记	50
第十节 STS 标记	55
第十一节 SSCP 标记	56
第十二节 线粒体 DNA 标记	59
第十三节 叶绿体 DNA 标记	62
第十四节 核糖体 DNA 标记	64
第十五节 基于逆转录转座子的分子标记	66
参考文献	67
第三章 水产生物 DNA 条形码编码系统	70
第一节 DNA 条形码编码系统概述	70
第二节 DNA 条形码编码系统在水产生物中的应用	72
参考文献	72

第四章 LAMP 技术及其在水产中的应用	74
第一节 LAMP 的技术特征	74
第二节 LAMP 在水产养殖动物病原微生物检测中的应用	76
参考文献	78
第五章 水产生物 DNA 分子标记开发技术	80
第一节 微卫星标记开发策略	80
第二节 SNP 标记的筛选及检测技术	86
第三节 EST 标记获取的方法	89
第四节 SINE 标记的分离和鉴定	92
参考文献	94
第六章 水产生物育种技术	97
第一节 传统育种技术	97
第二节 现代生物育种技术	98
第三节 DNA 分子标记辅助育种技术	103
参考文献	107
第七章 水产生物遗传作图技术	110
第一节 水产生物作图群体的特点	110
第二节 遗传连锁图谱的构建步骤	113
第三节 适合水产动物遗传图谱构建的方法	115
参考文献	116
第八章 水产生物信息学	118
第一节 生物信息学概述及水产生物信息学产生的背景	118
第二节 水产生物信息学的主要研究内容	119
第三节 重要生物信息学数据库简介	122
第四节 国内外有影响力的生物学网站集合	127
参考文献	132
第九章 DNA 分子标记技术在鱼类中的应用	133
第一节 鱼类亲缘关系研究	133
第二节 鱼类群体遗传学和保护遗传学研究	134
第三节 鱼类种质资源鉴定研究	137
第四节 鱼类分子系统进化与系谱研究	138
第五节 鱼类基因图谱的构建研究	140
第六节 鱼类 QTL 定位与分子标记辅助育种研究	144
第七节 鱼类分子标记开发	146
第八节 鱼类功能基因克隆研究进展	151
参考文献	159
第十章 DNA 分子标记技术在虾类中的应用	171
第一节 虾类遗传背景与遗传多样性研究	171
第二节 虾类种质资源鉴定研究	175

第三节	虾类分子系统进化与系谱研究·····	179
第四节	虾类遗传图谱与 QTL 定位研究·····	182
第五节	虾类分子标记辅助育种研究·····	186
第六节	虾类基因组学与比较基因组学研究·····	189
第七节	虾类分子标记开发·····	192
第八节	虾类功能基因克隆研究进展·····	196
	参考文献·····	200
第十一章	DNA 分子标记技术在贝类中的应用 ·····	205
第一节	贝类亲缘关系及遗传多样性研究·····	205
第二节	贝类分类学与种质资源保护研究·····	209
第三节	贝类分子系统发生学研究·····	213
第四节	贝类基因定位与分子标记辅助育种研究·····	217
第五节	贝类分子标记开发及功能基因克隆研究·····	218
第六节	贝类遗传连锁图谱的构建研究·····	219
第七节	贝类杂种优势及预测研究·····	226
	参考文献·····	227
第十二章	DNA 分子标记技术在藻类中的应用 ·····	236
第一节	藻类遗传多样性研究·····	236
第二节	藻类种质资源鉴定研究·····	238
第三节	藻类分子系统进化与系谱研究·····	239
第四节	藻类基因图谱的构建研究·····	243
第五节	藻类 QTL 定位与分子标记辅助育种研究·····	246
第六节	藻类分子标记开发·····	247
第七节	藻类功能基因克隆研究进展·····	248
	参考文献·····	252
第十三章	水产生物性别相关分子标记研究进展 ·····	255
第一节	RAPD 标记在水产生物性别研究中的应用·····	256
第二节	AFLP 标记在水产生物性别研究中的应用·····	257
第三节	其他分子标记在水产生物性别研究中的应用·····	258
第四节	研究意义及前景展望·····	260
	参考文献·····	261



第一章 水产生物核酸分子的提取、纯化和定量

为了研究 DNA 分子在生命代谢中的作用,常常需要从不同的生物材料中提取 DNA。由于 DNA 分子在生物体内的分布及含量不同,要选择适当的材料提取 DNA。水产生物中,肌肉、肝脏、鱼类精子都含有丰富的 DNA。各种材料中提取 DNA 的方法不尽相同,分离提取的难易程度也不同。对于低等生物,如从病毒中提取 DNA 比较容易,多数病毒 DNA 分子质量较小,提取时易保持其结构完整性。而水产生物 DNA 分子质量较大,易被机械张力剪断。提取出的基因组 DNA 要求尽量保持核酸分子完整性和较高的纯度。基因组的完整性与材料和提取方法有关,一般较新鲜的肌肉组织其基因组 DNA 的完整性较好,而反复冻融或者腐败的肌肉组织中的 DNA 一般都有所降解,提取过程中操作动作应尽可能地轻缓,以免 DNA 双链受到机械或者液体剪切力的伤害。在对无水乙醇和甲醛保存的肌肉组织中 DNA 提取的实验表明,虽然能够在琼脂糖凝胶电泳中检测到主带,但明显存在弥散状拖尾亮带,表明 DNA 降解严重。基因组 DNA 纯度越高,对于后续的 PCR 扩增反应越有利,因此在实验操作过程中应尽量去除糖和蛋白质类杂质,同时也要去掉酚类等物质。水产生物核酸分子的提取有其本身的特点,同一水产生物不同组织在提取基因组 DNA 的质量、数量及难易程度等方面存在较大的差异。骆轩等(2003)对菲律宾蛤仔性腺、斧足和内脏团的基因组 DNA 提取的实验表明,同样的方法在性腺中提取的 DNA 的得率明显比斧足和内脏团高。这可能与提取过程中组织裂解的难易程度有关。完整 RNA 的提取和纯化,是进行水生生物 RNA 方面的研究工作,如 Northern 杂交、mRNA 分离、RT-PCR、定量 PCR、cDNA 合成及体外翻译等的前提。

第一节 DNA 提取概述

获得基因组 DNA 是利用分子标记技术对水产生物开展相关研究的首要条件。真核生物基因组 DNA 都是由双链组成,其物理结构稳定性主要与双螺旋自身碱基堆积力和碱基外侧受到磷酸和糖类等形成的环层的保护有关。提取基因组 DNA 的过程就是破坏这些保护层,使 DNA 释放、沉淀、收集的过程。在提取中为防止组织中广泛存在的核酸酶的降解作用,应在低温下进行,同时可以加入核酸酶抑制剂,如乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸盐、氟化钠、砷酸盐、皂土等。通常在提取过程中加入十二烷基硫酸钠(SDS),其与酚既可以作为蛋白质变性剂来分离核酸,同时也可以使核酸降解酶破坏,因此常获得较好的效果。单独用含有辛醇或者异戊醇的氯仿振荡核蛋白,使之乳化,离心去除蛋白质,DNA 在上层水相,用乙醇沉淀 DNA,由此也可以获得较好的 DNA。

一、核酸的理化性质

DNA 为白色类似石棉样的纤维状物质, RNA 和核苷酸的纯品则呈白色粉末或结

晶。DNA、RNA 和核苷酸都是极性化合物，一般都溶于水，不溶于乙醇、氯仿等有机溶剂。它们的钠盐比游离酸易溶于水，RNA 钠盐在水中溶解度可达 40 g/L；DNA 在水中为 10 g/L，呈黏性胶体溶液。在酸性溶液中，DNA、RNA 易水解；在中性或弱碱性溶液中较稳定。天然状态的 DNA 是以脱氧核糖核蛋白（DNP）形式存在于细胞核中，而 RNA 以核糖核蛋白（RNP）形式存在。从细胞中提取 DNA 时，先把 DNP 抽提出来，再把蛋白质除去，再除去细胞中的糖、RNA 及无机离子等，从中分离 DNA。DNP 和 RNP 在盐溶液中的溶解度因受盐浓度的影响而不同。DNP 在低浓度盐溶液中，几乎不溶解，如在 0.14 mol/L 的氯化钠中溶解度最低，仅为在水中溶解度的 1%，随着盐浓度的增加溶解度也增加，1 mol/L 氯化钠中的溶解度很大，比纯水高 2 倍。RNP 在盐溶液中的溶解度受盐浓度的影响较小，在 0.14 mol/L 氯化钠中溶解度较大。因此，在提取时，常用此法分离这两种核蛋白。

二、细胞的破碎

水产生物 DNA 主要存在于细胞核与线粒体中，所以提取时有两个困难。①破碎细胞难。从处死动物、分离组织器官到破碎细胞费时长，在此期间 DNA 可能会被 DNase 降解，而动物组织特别是肌肉组织很难破碎，即使是较易破碎的肝、肾等组织也往往使用组织匀浆器，易造成 DNA 断裂。②分子质量大。水产生物 DNA 一般比细菌的大 2~3 个数量级，比病毒的大 4~5 个数量级。因此，对不同生物材料，要根据具体情况选择适当的分离提取方法。

三、DNA 提取的几种方法

1. 浓盐法

利用 RNP 和 DNP 在电解溶液中溶解度不同，将二者分离，常用的方法是用 1 mol/L 氯化钠抽提，得到的 DNP 黏液与含有少量辛醇的氯仿一起振荡，乳化后再离心除去蛋白质，此时蛋白质凝胶停留在水相及氯仿相中间，而 DNA 位于上层水相中，用 2 倍体积 95% 乙醇可将 DNA 钠盐沉淀出来。在提取过程中为抑制组织中 DNase 对 DNA 的降解作用，在氯化钠溶液中常加入柠檬酸钠作为金属离子的螯合剂。

2. 阴离子去污剂法

用 SDS 或二甲苯酸钠等去污剂使蛋白质变性，可以直接从生物材料中提取 DNA。由于细胞中 DNA 与蛋白质之间常借静电引力或配位键结合，因为阴离子去污剂能够破坏这种价键，所以常用阴离子去污剂提取 DNA。

3. 酚抽提法

酚作为蛋白质变性剂，同时抑制了 DNase 降解 DNA 的作用。用酚处理匀浆液时，由于蛋白质与 DNA 连接键已断，蛋白质分子表面又含有很多极性基团与酚相似相溶。蛋白质分子溶于酚相，而 DNA 溶于水相。离心分层后取出水层，多次重复操作，再合并含 DNA 的水相，利用核酸不溶于醇的性质，用乙醇沉淀 DNA。此法的特点是使提取的 DNA 保持天然状态。

第二节 鱼类 DNA 提取方法

高产量和高纯度的鱼类 DNA 分离技术是进行 PCR 检测、Southern 杂交、构建 DNA 文库及其他许多分子生物学研究操作的前提条件。实验前要充分做好准备工作,包括器具灭菌消毒和部分试剂药品的提前解冻。在鱼类中,常用于 DNA 提取的组织有肌肉、肝脏和血液。下面阐述提取的具体方法与步骤。

一、鱼类肌肉组织 DNA 的提取

鱼类肌肉组织首先应借助于机械力使之破碎,通常对取得的肌肉组织块用小型手术剪刀充分剪碎即可。为了节省剪碎的时间,也可以预先把鱼类肌肉组织放在 -20°C 的温度下冷冻,然后利用手术刀刮去鱼皮,这样可以更容易剪碎。特殊情况下,如大量提取 DNA 需要的组织量较大时,可以用搅拌器粉碎。另外,使组织破碎较为彻底的方法是用液氮速冻组织块,并用液氮预冷的研钵在盛有液氮的研钵内迅速研磨将组织粉碎,液氮挥发后再把组织粉末收集到盛有裂解液的烧杯,振荡使粉末浸没混匀后转移到离心管中。提取步骤如下。

(1) 取新鲜鱼的肌肉组织,清洗干净,称取 0.5 g ,用纱布包好,另外再包多层牛皮纸,浸入液氮冰冻,取出后将其敲碎。

(2) 将组织碎块放入研钵,加少许液氮研磨,反复添加液氮直至组织被碾成粉末,此步要求低温操作。

(3) 在 15 mL 离心管中加入 5 mL 提取液,用玻璃棒一边搅动液体一边加入组织粉末, 37°C 温育 1 h 。

(4) 加入蛋白酶 K (10 mg/mL) $10\text{ }\mu\text{L}$ 至终浓度 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$, 55°C 温育直至裂解液澄清,同时不断摇动。

(5) 在裂解液中加入等体积的酚/氯仿/异戊醇 ($25:24:1$) 溶液,封严离心管盖,反复轻柔地转动离心管,形成乳状液,室温 5000 r/min 离心 20 min 。

(6) 取上清液,重复步骤 (4),至水相和有机相间没有蛋白质层。

(7) 取上清液加入氯仿/异戊醇 ($24:1$) 溶液,缓慢抽提 $30\sim60\text{ min}$,然后 5000 r/min 离心 20 min 。取上清液。

(8) 将上清液分装在 1.5 mL 的离心管中,每个离心管加入 $400\text{ }\mu\text{L}$ 上清液,再在离心管中加入 $1/10$ 体积的 NaAc (3 mol/L),终浓度为 0.3 mol/L 。轻轻摇匀,再加入 2 倍体积的冰冷无水乙醇,混匀,置冰上 $10\sim30\text{ min}$,使 DNA 沉淀。

(9) 用移液枪头挑出沉淀的 DNA 至一新的离心管中。

(10) 加入 70% 乙醇至管中 $2/3$ 体积,混匀漂洗,去除残余的成分。

(11) 重复步骤 (8) 和步骤 (9)。

(12) 不盖管盖,室温下使乙醇挥发,晾干。

(13) 重新悬浮 DNA: 加入 TE 缓冲液 ($\text{pH}8.0$),每个离心管 $300\text{ }\mu\text{L}$, 45°C 条件下不断摇动促使 DNA 溶解。

(14) 将每个离心管的 DNA 溶液合并起来。

(15) 分光光度法测定 DNA 浓度：吸取 5 μL DNA 溶液加水至 1 mL，混匀后转入石英比色杯中，测 OD_{260} 和 OD_{280} 。

(16) -20°C 保存。

二、鱼类肝脏 DNA 的提取

(1) 取 200 mg 左右鱼类肝脏，在干净的匀浆器中加入 1 mL STE 及 52 μL SDS (20%) 至终浓度 0.5%。冰上匀浆，至没有组织块（注意要尽量匀浆完全，得到的 DNA 质量才好）。

(2) 采用酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1) 抽提，然后 4°C 12 000 r/min 离心 20 min。

(3) 取上清液，加入 RNA 酶至终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ， 37°C 消化 1 h。

(4) 重复步骤 (2) 和步骤 (3) 两次。

(5) 加入 2 倍体积的冰冷乙醇沉淀 DNA。

(6) 用移液枪头挑出沉淀的 DNA 至一新的离心管中。

(7) 加入 70% 乙醇至管中 2/3 体积，混匀漂洗，去除残余的成分。

(8) 12 000 r/min 离心 1 min，弃去上清液。

(9) 不盖管盖，室温下使乙醇挥发，晾干。

(10) 重新悬浮 DNA：用适当容积 (30~50 μL) 的水或者 TE 缓冲液 (pH8.0)， 68°C 保温 10 min 使 DNA 溶解，同时能够去除残留的乙醇。

(11) -20°C 保存。

三、鱼类血液 DNA 的提取

参考 Liu 等 (2005) 报道的方法，略有改动。

(1) 将 100 μL 鱼类血液加入 Eppendorf 管中，再加入 500 μL 裂解缓冲液和 5 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL)，轻轻摇匀， 37°C 过夜。

(2) 在裂解好的样品中加入 600 μL 酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1) 混合液，晃动 20 min 后 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液。

(3) 再加入酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1) 混合液，重复上述操作 3 次。

(4) 再取上清液，加入 2 倍体积冷却的无水乙醇和 1/10 体积的 NaAc (3 mol/L)，12 000 r/min 离心 10 min，弃去上清液。

(5) 用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次，然后烘干乙醇。

(6) TE 缓冲液溶解 DNA。

(7) -20°C 保存。

第三节 虾类肌肉 DNA 提取方法

从虾类肌肉组织中提取 DNA 主要依靠酚和盐析法。首先把 DNA 抽提出来，然后去除蛋白质、糖、RNA 及无机离子等。一般是先用酚抽提后再用氯仿抽提，氯仿配置时应加入异戊醇 (24 : 1)，氯仿作用是使蛋白质变性，同时可溶解残留的酚，而异戊醇作用则为减少泡沫，有助分离。虾类不同部位肌肉在提取 DNA 的难易程度上也存在一

定的差异,大量的试验表明,尾部肌肉,尤其是尾棘部位的肌肉在提取上能够取得更好的结果。肌肉组织以 100 mg 左右为宜,这个量主要是与加入的蛋白酶 K 的量相对应,一般以加入蛋白酶 K (20 mg/mL) 至终浓度 200 $\mu\text{g/mL}$ 左右,此时在 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中水浴 3~4 h 可以把肌肉组织消化较为彻底,溶液呈透明状。

一、不用 RNase 处理的酚/氯仿法

此法较为简单,对于新鲜的虾类肌肉组织可以提取到较高质量的 DNA。操作步骤如下。

(1) 破碎肌肉:取 100 mg 尾部肌肉(去表皮),剔除杂物后放入 1.5 mL Eppendorf 管中;加入 475 μL TE 缓冲液,用剪刀剪碎肌肉,越碎越好。

(2) 蛋白酶 K 消化:在以上溶液中加入 25 μL 10% SDS,再加入 4 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL),反复倒置 10 次,用封口膜封住管口,在 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中水浴 3~4 h,期间每消化 1 h,轻轻上下摇动试管 2 或 3 次,以利于消化。

(3) 第一次酚处理:将管从水浴锅中取出,去除封口膜,冷却至室温后,在 Eppendorf 管中加入 500 μL 饱和酚,上下颠倒摇晃 10 min。

(4) 第一次离心:5 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min,离心 10 min。

(5) 第二次酚/氯仿处理:离心后,取上清液,加入 250 μL 酚和 250 μL 氯仿,上下颠倒摇晃 10 min。

(6) 第二次离心:5 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min,离心 10 min。

(7) 氯仿处理:取上清液,加入 500 μL 氯仿,振摇 10 min。

(8) 第三次离心:5 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min,离心 10 min。

(9) DNA 沉淀析出:小心吸取上清液,加入 1/25 总体积的 NaCl 溶液 (5 mol/L),再加入 2 倍体积无水乙醇(预先冷冻至 -20 $^{\circ}\text{C}$),静置沉淀。

(10) 风干 DNA:上下颠倒沉淀液,离心,弃去上清液,加入 70%乙醇(约 500 μL),静置 1 h,再离心,如此洗两次,自然风干后加入 TE 溶解,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

二、用 RNase 处理的酚/氯仿法

此法主要针对提取的 DNA 中含有大量 RNA 或者对 DNA 纯度要求特别高的情况下使用。操作步骤如下。

(1) 破碎肌肉:取 100 mg 尾部肌肉(去表皮),剔除杂物后放入 1.5 mL Eppendorf 管中;加入 475 μL TE 缓冲液,用剪刀剪碎肌肉。

(2) 加入 10%SDS 溶液 25 μL ,混合均匀。

(3) 加入 10 mg/mL 胰 RNase 2~4 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 0.5~1 h。

(4) 蛋白酶 K 消化:在以上溶液中加入 4 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL),反复颠倒 10 次,用封口膜封住管口,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中水浴 2.5~3 h,期间每消化 1 h,轻轻上下摇动试管 2 或 3 次,以利于消化。

(5) 抽提:500 μL 重蒸酚抽提 2 次,每次 10 min,10 000 g 离心 5 min,取上清。

(6) 酚/氯仿 (1:1) (各 300 μL) 抽提 1 次:10 min,10 000 g 离心 5 min,取上清。

(7) 加入 600 μL 氯仿抽提 1 次, 5 min, 5000 g 离心 5 min, 取上清。

(8) 加入 1/25 体积的 5 mol/L NaCl 溶液, 混匀后再加入两倍体积的 (-20°C 预先保存的) 无水乙醇沉淀 DNA 15 min, 挑出 DNA 后用 70% 的乙醇洗涤两次, 干燥 DNA 后用 TE 或者灭菌的去离子水溶解保存。

三、氯化钠法

此法简单经济, 但提取的 DNA 量不大 (李艳和等, 2006)。操作步骤如下。

(1) 取 50 mg 肌肉组织, 充分剪碎后放入 1.5 mL 离心管中。

(2) 加入 400 μL DNA 提取缓冲液 (0.4 mol/L NaCl; 10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 2 mmol/L EDTA, pH8.0; 1% SDS; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰 RNA 酶), 用电动匀浆器快速匀浆 10~15 s。

(3) 加入 10 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K, 充分混匀后, 放入 $55\sim 65^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中过夜消化。

(4) 加入 6 mol/L NaCl 300 μL , 手摇充分混匀后, 8000 r/min 离心 10 min。

(5) 取上清液, 加入等体积异丙醇混匀, 置 -20°C 冰箱中 1 h。

(6) 取出后 8000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。

(7) 用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 或 3 次, 干燥后加入适量 TE, 置于 4°C 冰箱中保存。

在以上 DNA 提取过程中要注意以下几个问题: ①保证水浴时间充足, 在水浴过程中应不时振荡以充分混匀溶液, 使蛋白酶 K 发挥最佳消化活性, 使 DNA 完全释放到裂解缓冲液中, 这一点关系到 DNA 的产量; ②在加入蛋白酶 K 后, 一切的操作动作要轻, 不可以剧烈振荡, 以防止 DNA 的降解, 保证基因组 DNA 的完整性; ③吸取上清液时, 可使用大口径的吸头 (用剪刀将吸头尖部剪掉), 同时避免吸取两相界面的乳白层, 这一点对所提取 DNA 的纯度很关键。

第四节 贝类 DNA 提取方法

贝类 DNA 提取的材料主要是闭壳肌及其他肌肉组织, 由于肌肉组织多糖、蛋白质等含量相对较多, 该方法在常规 DNA 提取方法上略有改进。贝类 DNA 提取主要有如下三种方法。

一、酚/氯仿/异戊醇法

(1) 取 100 mg 左右贝类肌肉组织, 在冰浴中加入 300 μL 预冷的提取缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA) 研磨, 研磨完毕后再加入 350 μL 的提取缓冲液。

(2) 取匀浆液 600 μL 置 1.5 mL 离心管中, 加入 60 μL 10% 的 SDS, 10 μL 蛋白酶 K (10 mg/mL), 颠倒混匀 10 min, 置 55°C 水浴直到消化完全, 一般消化 3~5 h。

(3) 加入 65 μL 饱和的 KCl, 颠倒混匀, 放在冰上 5 min。14 000 r/min 离心 10 min, 将上清液倒入一个新离心管中。

(4) 加入等体积的饱和酚 (pH8.0), 颠倒混匀 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min,

取上清液。

(5) 加入等积的酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1) 混合液颠倒混匀 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 将上清液转入新的离心管中。

(6) 用等体积的氯仿/异戊醇 (24 : 1) 抽提一次, 取水相加入 2 倍体积的预冷的无水乙醇, 室温下 15~20 min。

(7) 用玻璃棒直接挑起 DNA 或加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH5.2) 12 000 r/min 离心 10 min 沉淀 DNA, 用 -20℃ 预冷的 70% 乙醇洗涤两次。

(8) 干燥后溶于 100 μ L 的 TE (pH8.0) 中。

(9) 在溶解的 DNA 中加入 1 μ L 的 RNase A (10 mg/mL), 37℃ 水浴 1 h。

(10) 使用紫外分光光度计将 DNA 浓度调整为 20 ng/ μ L 和 100 ng/ μ L。

该方法所用的提取缓冲液成分为: 100 mmol/L 的 NaCl, 25 mmol/L 的 EDTA (pH8.0), 10 mmol/L 的 Tris-HCl (pH8.0), 质量分数为 0.5% 的 SDS, 以及质量分数为 2% 的 2-巯基乙醇等体积混合。

二、CTAB 法

(1) 称取 1 g 贝类肌肉组织置于三角瓶中, 立即加入 65℃ 预热的 CTAB 提取缓冲液 20 mL, 于 65℃ 水浴下保温 30 min, 期间摇动数次。

(2) 然后加入等体积氯仿/异戊醇抽提数次, 至上清液清澈为止。

(3) 再加入等体积 -20℃ 下预冷的异丙醇, 室温下静置 2 h。

(4) 挑取沉淀, 风干, 加一定量 TE 溶解。

(5) 提取的 DNA 加入 RNase A, 37℃ 保温 30 min。

(6) 再加入 1/10 体积 3 mol/L 的乙酸钠和 2 倍体积的无水乙醇, 于 -20℃ 过夜。

(7) 挑取沉淀物, 以后操作同酚/氯仿/异戊醇法。

该方法所用的 CTAB 法提取缓冲液为: 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH8.0), 0.7 mol/L 的 NaCl, 10 mmol/L 的 EDTA (pH8.0), 质量分数为 1% 的 CTAB, 以及质量分数为 2% 的 2-巯基乙醇等体积混合。

三、SDS 法

(1) 取鲜活体的贝类闭壳肌 200 mg, 用蒸馏水洗净, 加入液氮研磨至干粉状。

(2) 加入已在 65℃ 水浴中预热的 DNA 提取液 1 mL 继续研磨 1 min, 转到 1.5 mL 离心管中。

(3) 65℃ 水浴中加热 4 min, 8000 r/min 离心 5 min。

(4) 取上清液, 加入等体积的 5 mol/L 乙酸钠, 冰浴 30 min 以除去多糖, 8000 r/min 离心 5 min。

(5) 取上清液, 加入 8 mol/L LiCl, 沉淀 RNA, 8000 r/min 离心 5 min。

(6) 取上清液, 加入等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1) 混合液, 提取 10 min。

(7) 6000 r/min 离心 15 min; 取上清加入等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1) 重提取一次, 离心除去蛋白质。

(8) 取上清液, 加入等体积的氯仿, 6000 r/min 离心 10 min 除去残留的酚。

(9) 取上清液, 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和 2.5 倍体积的 100% 乙醇, -20°C 放置 30 min 沉淀 DNA。

(10) 8000 r/min 离心 15 min, 弃去上清液, 沉淀用 75% 乙醇洗涤 2 次, 置于超净台内晾干, 溶于 40 μL 去离子水。

该方法所用的 SDS 法提取缓冲液为: 100 mmol/L 的 Tris-HCl (pH8.0), 500 mmol/L 的 NaCl, 100 mmol/L 的 EDTA (pH8.0), 质量分数为 1% 的 2-巯基乙醇, 以及 1.5 mL/100 mL 的 SDS 等体积混合。

第五节 藻类 DNA 提取方法

藻类细胞含有细胞壁, 所以 DNA 提取时, 首先要破碎细胞。细胞壁的破碎有三种方法: ①机械方法, 包括超声波处理法、研磨法、匀浆法; ②化学试剂法, 即用 CTAB 或 SDS 处理细胞; ③酶解法, 加入溶菌酶或蜗牛酶, 都可使细胞壁破碎。DNA 的提取方法同大多数植物的 DNA 的提取方法一样, 主要使用以下三种方法。

一、改良 CTAB 法

十六烷基三乙基溴化铵 (cetyltriethylammonium bromide, CTAB) 是一种去污剂, 可以与核酸形成复合物。该复合物在高盐溶液 (>0.7 mol/L NaCl) 中可以溶解并且稳定存在; 在低盐溶液 (<0.3 mol/L NaCl) 中会因溶解度降低而沉淀, 而大部分蛋白质和多糖仍然溶解在溶液中。CTAB 法是提取藻类 DNA 的经典方法, 该方法的关键是在提取过程中加入质量分数为 10% 的 CTAB 提取液和 1% 的 CTAB 沉淀缓冲液的量一定要准确, 否则 CTAB 与核酸的复合物不易产生沉淀, 或得到的 DNA 容易被部分降解。CTAB 法所用的提取缓冲液中还要含有一定量的 β -巯基乙醇, 可防止酚类氧化。如果藻类材料中含酚类物质较多, β -巯基乙醇可增加至 6% (体积百分比)。

1. 操作步骤

(1) 取 200 mg 新鲜的藻类材料, 置于液氮中, 充分研磨成粉末状, 将材料转移到 1.5 mL 的离心管中, 加 600 μL CTAB 缓冲液, 混匀, 于 65°C 水浴保温 1 h, 期间要不时摇动离心管。

(2) 取出后加等体积氯仿/异戊醇, 轻轻颠倒离心管, 混匀, 在室温下, 12 000 r/min 离心 10~20 min。

(3) 把上清液转入另一离心管中, 加入 1/10 上清液体积的 10% CTAB, 混匀, 在室温下, 12 000 r/min 离心 10 min。

(4) 取上清液, 重复步骤 (3) 一次。

(5) 将上清液转至另一离心管中, 加入 RNase 至终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 在 37°C 下放置 30 min。

(6) 加入 1~1.5 倍体积的 1 $\times$ CTAB 沉淀缓冲液, 混匀, 室温下静置 30 min 使沉淀生成。

(7) 室温下 4000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。