

从河鲢鱼精巢中提取DNA-Na的研究

辛修明 高英东 邹德生

(河北省水产研究所)

提要 本文首次报道了从河鲢鱼精巢中提取DNA-Na的方法,在对不同的提取方法进行比较的基础上,提出了一条适宜于河鲢鱼精巢的合理提取工艺,由此工艺提取的DNA-Na产品其各项指标均达到了国外同类产品的水平。

关键词 河鲢鱼精巢 DNA-Na 提取

脱氧核糖酸及其钠盐(DNA-Na)是常用的重要生化试剂,也是抗肿瘤、抗病毒的药物及进行遗传工程研究的重要材料之一,过去一直是从小牛的胸腺中提取,价格昂贵。我国的河鲢鱼资源丰富,近几年其养殖业也有较大发展,而河鲢鱼精巢作为加工的废弃物尚未得到充分开发利用。为此我们对从河鲢鱼精巢中提取DNA-Na的方法进行了研究,结果表明河鲢鱼精巢也是提取DNA-Na的理想原料,采用我们提出的混合蛋白变性剂的工艺方法所提取的DNA-Na,其各项指标均达到了国外同类产品的标准。

1 材料与方法

1.1 材料 河鲢鱼精巢系采自河北沿海成熟的红鳍东方鲢,在-18℃条件下贮存4~5个月。

1.2 测定方法

氮含量 微量凯氏定氮法。

磷含量 磷钼蓝比色法。

蛋白质含量 Folin-酚法(Lowry)。

DNA-Na含量 紫外吸收分光光度法。

低盐溶液 0.14MNaCl-0.015M citrate 溶液。

1.3 提取工艺

河鲢鱼精巢

冰冷的5倍量低盐溶液中

12000r.p.m 捣碎2min

匀浆液

4000r.p.m 离心10min

沉淀

清液

溶于5倍量冰冷的低盐溶液

4000r.p.m 离心10min

沉淀

清液

溶于5倍量低盐溶液中,加入2/3体积的苯酚饱和水溶液,振荡2min;

补加NaCl至1M,再加入1/3体积5%SDS,

振荡30min,室温放置24h。

乳浊液

4000r.p.m 离心35min。

清液

沉淀

加入1/7体积的CHCl₃和1/15体积5%SDS,

振荡30min,室温放置6h。

乳浊液

4000r.p.m 离心35min。

上清液

沉淀

加冰冷的95%乙醇至70%。

DNA-Na 丝状沉淀

96%乙醇、丙酮依次洗涤,减压干燥。

DNA-Na 产品(纯白、膨松的棉花状物)

2 结果与讨论

2.1 不同提取方法对提取结果的影响 为了确定适宜于从河鲢鱼精巢中提取 DNA-Na 的方法,我们对几种不同的提取方法进行了比较,结果如表 1 所示。其中以苯酚饱和水溶液加 5%SDS 作为第一步去蛋白变性剂;

氯仿加 5%SDS 作为第二步去蛋白变性剂的提取方法,产率较高,可达湿重的 4.05%。而 N/P 比最低,说明其去蛋白效果最好。

2.2 苯酚饱和水溶液与 5%SDS 的不同比率对第一步去蛋白效果的影响 由图 1 可见,苯酚饱和水溶液与 5%SDS 的不同比率

表 1 不同提取方法对河鲢鱼精 DNA-Na 提取效果的影响

编号	第一步去蛋白 变性剂及其用量	第二步去蛋白 变性剂及其用量	产率 (%)	N (%)	P (%)	N/P
1*	5%SDS, 1/9 体积	5%SDS, 1/9 体积	5.5	11.37	3.89	2.90
2	苯酚饱和水溶液, 等体积	CHCl ₃ + 5%SDS (2:1) 等体积	1.99	12.90	7.03	1.83
3	90%苯酚水溶液, 等体积	CHCl ₃ , 1/9 体积	2.87	13.60	5.70	2.40
4	5%SDS + 苯酚饱和水 溶液 (1:2), 等体积	CHCl ₃ , 1/2 体积	4.04	12.20	6.84	1.78
5	5%SDS + 苯酚饱和水 溶液 (1:2), 等体积	CHCl ₃ + 5%SDS (2:1), 等体积	4.05	12.70	7.94	1.60
6	CHCl ₃ + 苯酚饱和水 溶液 (1:2), 等体积	CHCl ₃ + 苯酚饱和水 溶液 (1:2) 等体积	0.5	10.50	5.64	1.94
7	5%SDS + 苯酚饱和水 溶液 (1:2), 等体积	5%SDS + 苯酚饱和水 溶液 (1:2), 等体积	3.03	11.52	5.23	2.20

1* 采用 20 倍匀浆液,其他均采用 3 倍匀浆液。

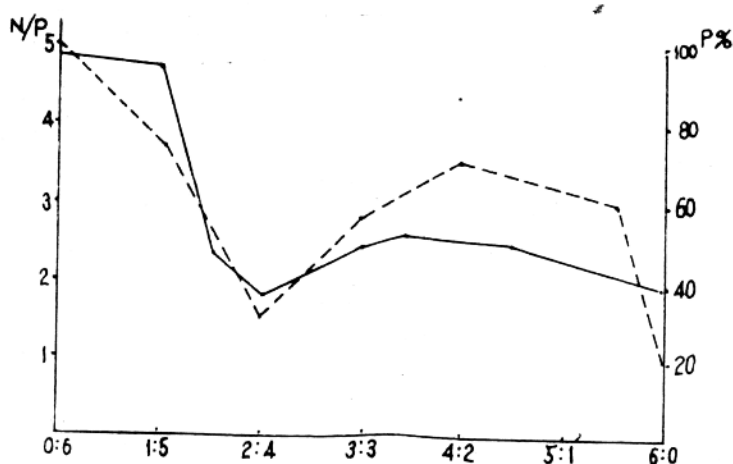


图 1 苯酚饱和水溶液和 5%SDS 的不同比率对去蛋白效果的影响

(3 倍匀浆液, 变性剂用量 6ml/g 鱼精)

—×— N/P 比随变性不同比率的变化曲线。

……o……有机磷含量随变性剂的不同比率的变化曲线。

不仅对去蛋白的效果有较大的影响,对提取率的影响也比较大。单纯使用苯酚饱和水溶液难以将DNA提取到水相,所以产率较低,而在苯酚饱和水溶液中加入一定量的5% SDS则可将DNA提取到水相。当苯酚饱和水溶液和5% SDS的比率在2:1左右时比较适宜,既可保持较高的产率,又可得到较好的去蛋白效果。但苯酚饱和水溶液和5% SDS的比率在1:2附近时,N/P和P%曲线出现最低点,即仅有少量DNA被提取出来,

原因尚待进一步研究。

2.3 苯酚饱和水溶液和5% SDS组成的混合变性剂的不同用量对第一步去蛋白效果的影响 如预期的一样,增加混合变性剂的用量可提高去蛋白的效果,但混合变性剂用量过多会增加提取成本,不利于生产。如图2所示,混合变性剂的用量在6~12ml/g之间,去蛋白的效果差别不大。实验中观察到,其用量小于4ml/g时,则粘度增大,难以处理,故认为以5ml/g的混合变性剂用量是适宜的。

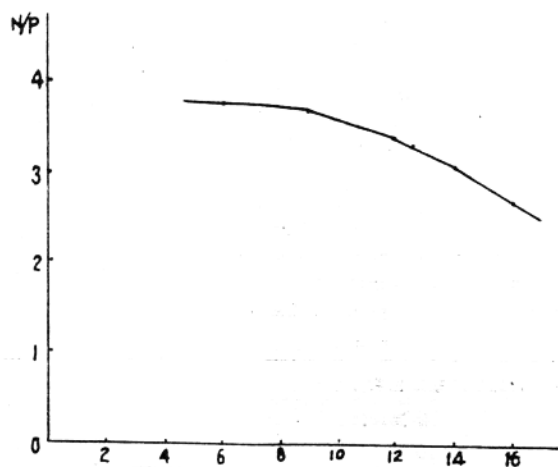


图2 混合变性剂(苯酚饱和水溶液:5% SDS 2:1)的用量对去蛋白效果的影响

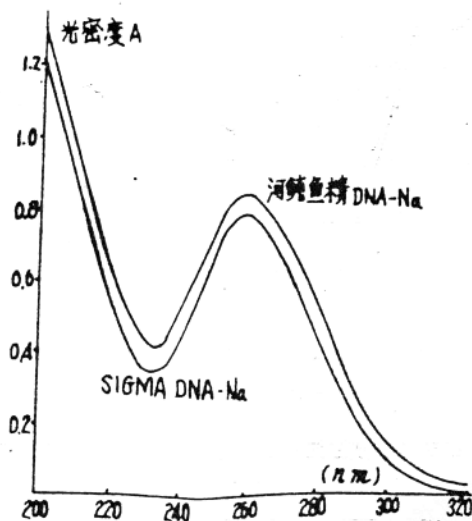


图3 河鲢鱼精DNA-Na和SIGMA公司DNA-Na的紫外吸收曲线比较

2.4 产品分析结果 图3是美国SIGMA公司的小牛胸腺DNA-Na和河鲢鱼精DNA-Na的紫外吸收曲线比较,两者的吸收曲线完全一致。

表2是SIGMA公司的小牛胸腺DNA-Na和河鲢鱼精DNA-Na的分析结果比较,

表2 河鲢鱼精DNA-Na和SIGMA公司小牛胸腺DNA-Na的分析结果比较

样 品	N (%)	P (%)	N/P	Σ (p)	纯度 (%)	RNA	蛋白质 (%)	分子量
河鲢鱼精DNA-Na	12.22	8.5	1.44	6448	95.05	未检出	1	$>24 \times 10^6$
SIGMA 小牛胸腺DNA-Na	12.35	8.3	1.49	7129	95.44	/	4	/

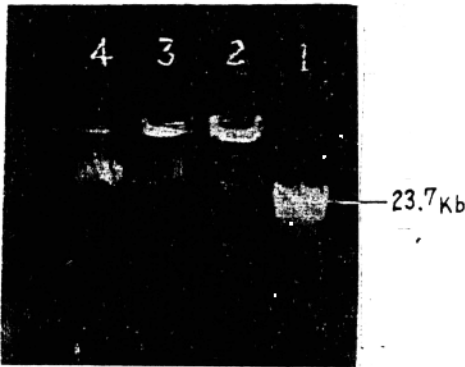


图4 SIGMA公司小牛胸腺DNA-Na和河鲢鱼精DNA-Na的葡聚糖凝胶电泳图谱

从表2可见,我们所提取的河鲢鱼精DNA-Na各项指标均接近于国外同类产品水平,从其克分子磷消光系数上看,河鲢鱼精DNA-Na的分子量要明显高于SIGMA公司的产品。

从电泳图谱上看,我们提取的河鲢鱼精DNA-Na的分子量较大,而且极少降解(2、3号样品),比SIGMA公司标准品(1号)质量好。

3 结论

河鲢鱼精巢约占鱼体重的10%左右,且来源丰富,价格便宜。从中提取的DNA-Na其质量和国外同类产品相当,具有一定的实用价值。我们所提出的提取工艺,其成品产率高,质量好且成本比较低,有很好的推广前景。

STUDIES ON THE EXTRACTION OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID SODIUM SALT FROM THE SPERMARY OBOF *FUGU RUBRIPES*

Xin Xiuming Gao Yingdong Zou Desheng

(Fisheries Research Institute of Hebei Province)

Abstract This paper reported a method of extracting Deoxyribonucleic acid sodium salt (DNA-Na) from the spermary of *Fugu rubripes*. The adequate method was put forward through the comparison of different methods under different conditions. DNA-Na prepared by this method can fully meet the criteria of similar product abroad.

Keywords *Fugu rubripes* spermary DNA-Na Extraction