

文章编号: 1001- 411X (2002) 03- 0092- 01

# 一种有效抽提蚕、桑 DNA 的方法

李文楚

(华南农业大学艺术设计学院蚕丝科学系, 广东 广州 510642)

## An Effective Method for DNA Extraction from Silkworm and Mulberry

LI Wen—chu

(Dept. of Seric. Sci., College of Art Design, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

关键词: 动植物; DNA; 提取方法

**Key words:** animals and plants; DNA; extracting method

中图分类号: Q33

文献标识码: A

生物技术的发展给实验理论和生产实践带来了新的突破, 分子生物学技术的广泛应用使蚕桑生产出现了新的突破点与希望. 目前, 几乎所有的家蚕生理、生化方面的研究都深入到分子生物学, 对透彻了解和掌握家蚕的生长发育起着举足轻重的作用. 如限制性酶切片长度多态性(RFLP), 随机扩增多态性 DNA(RAPD), 串联重复序列(SSR), 扩增酶切片长度多态性(AFLP)等方法, 除了应用于家蚕外, 也可广泛应用于桑树的分子生物学研究. 因此, 在试验与研究过程中, 探讨摸索一条适用于可同时提纯桑树、家蚕的动植物 DNA 的方法对研究工作有较大的帮助.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

家蚕(品种: 湘芙×782)卵反转期、催青期; 桑叶(品种: 广东荆桑)适熟叶. 所有化学试剂为分析纯试剂.

### 1.2 方法

抽提缓冲液的配制<sup>[1]</sup>: 100 mmol/L Tris·Cl, pH 8.0; 100 mmol/L EDTA, pH 8.0; 250 mmol/L NaCl; 100 μg/mL 蛋白酶 K (临用前加入).

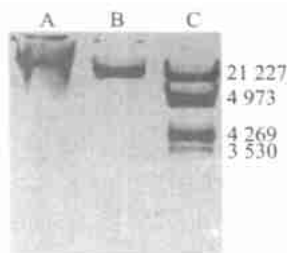
盐酸胍溶液的配制: 4 mol/L 盐酸胍, 25 mmol/L 乙酸钠, pH 5.2; 0.2 mmol/L DTT; 5 g/L N—十二烷基肌氨酸钠或 10 g/L SDS.

实验材料用 70%~72% 酒精进行表面消毒, 放在室温待酒精挥发. 在灭菌的预冷研钵内, 每克材料加入 5 mL 灭菌抽提缓冲液和 3 mL 灭菌盐酸胍溶液, 立即加入少量液氮和无菌石英砂快速研磨, 室温或 37℃作用 1 h. 样品经低速离心 (4 000 r/min) 去除未消化裂解的沉淀和杂质. 上清液转入另一离心管, 用 1.0 mol/L Tris·Cl 平衡酚和氯仿: 异戊醇 (体积比为 24:1) 反复抽提 2~3 次, 用 10 000 r/min 离心. 上清液转入新离心管, 加入 5 倍体积冰预冷无水乙醇, -20℃沉淀核酸. 10 000 r/min 离心, 用少量 TE 缓冲液溶解. 进一步纯化家蚕、桑叶 DNA, 需用 5 mol/L LiCl 溶液或 RNase 除去核酸沉淀中的 RNA, 得到的沉淀以 TE 溶液溶解.

## 2 结果

按照上述提取方法得到的蚕卵 DNA 纯度  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  为 1.17; 桑叶 DNA 纯度  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  为 1.04. DNA 浓度分别

为蚕卵 1 199 μg/mL; 桑叶 960.5 μg/mL. 抽提蚕卵 DNA 较桑叶 DNA 难度小些 (图 1).



A. 桑叶 DNA B. 蚕卵 DNA C. Marker (lambda DNA *Eco*R I / *Hind* III 酶切片) A. DNA of mulberry leaf B. DNA of silkworm eggs C. Marker (digestive fragments of lambda DNA with *Eco*R I and *Hind* III)

图 1 DNA 琼脂糖电泳

Fig. 1 DNA agarose gel electrophoresis

## 3 讨论

昆虫 DNA 提取方法<sup>[2]</sup>与桑叶 DNA 提取方法都存在一个材料蛋白含量较高的问题. 以家蚕体内的组织包括脂肪体、卵巢及睾丸、丝腺、血细胞等, 抽提时可考虑用预冷的缓冲液冲洗干净, 但脂肪体的抽提存在脂肪对家蚕 DNA 提取的干扰, 通常可用玻璃纤维滤过. 桑叶中的树脂及提取 DNA 时的蛋白胍状物, 影响 DNA 稳定性. 以 CTAB 法<sup>[3]</sup>提取桑叶 DNA 溶解后没有色素的影响, 稳定性较高. 因此也可考虑用 CTAB 法结合胍盐溶液抽提. 这方法适用于抽提其他昆虫和植物组织、细胞的 DNA, 是切实可行的快捷途径. 可用于 DNA 的 PCR 扩增, DNA 多肽性分析和基因芯片制作等.

### 参考文献:

- [1] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MAINATIS T. 分子克隆: 实验指南 [M]. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1996. 456—494.
- [2] REINEKE A, KARLOVSKY P, ZEBITZ P W. Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis [J]. Insect Molecular Biology, 1998, 7(1): 95—99.
- [3] 赵卫国, 潘一乐. 从桑树营养组织中提取高纯度 DNA 的方法 [J]. 江苏蚕业, 2001(1): 19—20.

【责任编辑 周志红】

收稿日期: 2001- 06- 15

作者简介: 李文楚(1966—), 男, 讲师, 博士.

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net