



许美容, 贾奥林, 郑 正, 等. 聚丙烯酰胺电泳条带中微量 DNA 片段的回收与再扩增方法的改进[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(2): 117-120.

聚丙烯酰胺电泳条带中微量 DNA 片段的回收与再扩增方法的改进

许美容[†], 贾奥林[†], 郑 正, 邓晓玲
(华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】研究聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)条带中微量 DNA 片段的回收和再扩增.【方法】比较了 4 种方法溶解聚丙烯酰胺凝胶的效果和回收微量核酸的效率.【结果和结论】Bioteke 溶胶/结合液能获得极高的 DNA 片段回收率, 可从仅含 1.0~7.5 ng 核酸的 PAGE 胶中有效回收足量的片段;再扩增的效果与回收效率呈正相关;将液态混合液与杂质分离是成功进行再扩增的关键.本研究构建的一套快速、高效的 PAGE 多态性条带回收及再扩增的方法为分析生物遗传多样性成因提供了新途径.

关键词:聚丙烯酰胺凝胶电泳;微量 DNA 带回收;DNA 片段再扩增
中图分类号:Q7 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2015)02-0117-04

Improved methods to recover and reamplify trace DNA fragments from the polymorphic PAGE band

XU Meirong[†], JIA Aolin[†], ZHENG Zheng, DENG Xiaoling
(College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】To optimize the methods of recovery and reamplification of trace DNA fragments from polymorphic polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) bands. 【Method】Effects of four methods of dissolving polyacrylamide gel and recovery efficiencies of trace nucleic acids were obtained. 【Result and conclusion】Dissolving/Bing buffer from Bioteke kit showed high recovery rates of DNA fragments from PAGE gels with only 1.0–7.5 ng nucleotide. Effects of amplification positively correlated with recovery efficiencies. The separation of liquid mixture and impurities was the key to successful amplification. This research forms a fast, efficient DNA recycling and amplification method from polymorphism PAGE, which provides a new approach to analyze the causes of genetic diversity.

Key words:PAGE; trace DNA fragments recovery; reamplification of DNA sequence

琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳(Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)分别是常用的水平和垂直电泳方法. 相对于琼脂糖凝胶电泳, PAGE 因具有适用性广、分辨率高、上样量小、通量较高等特征^[1-2],而被广泛应用于生物遗传多样性研究中的小片段 DNA 分离^[3]. 随着生物技术的快速发展

收稿日期:2014-02-13 优先出版时间:2015-01-21
优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20150121.0941.014.html>
作者简介:许美容(1983—),女,讲师,博士,E-mail:meirongxu@scau.edu.cn;贾奥林(1992—),女,E-mail:jia_aolin@163.com;†表示对本文贡献相同;通信作者:邓晓玲(1966—),女,教授,博士,E-mail:xdeng@scau.edu.cn
基金项目:国家自然科学基金(G31201480);农业部公益性行业(农业)专项(201003067);广东省自然科学基金(S2012040007627)

展, PAGE 衍生出 SDS-PAGE、2D-PAGE 和 sulfate-PAGE 等多种形式, 普遍用于蛋白质的分离^[4].

目前从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段的方法相对成熟, 如挤压回收法、速冻 - 快速离心法与凝胶浸泡法^[5], PAGE 核酸回收的方法常采用的主要有水煮法^[6]、研磨法^[7]、液氮研磨法^[8]等, 但是这些方法并不适用于 DNA 量微小的试验.

本研究采用了 4 种方法从 PAGE 胶中回收微量 DNA 片段, 并用再扩增的方法评价回收效果, 建立了一套高效的 PAGE 条带回收和片段再扩增的方法, 为后续克隆研究奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 DNA 提取与材料筛选

从广东和云南分别采集具有黄龙病 (*Huanglong-bing*, 病原为 *Candidatus Liberibacter* spp.) 症状的砂糖橘 *Citrus reticulata* Banco 或马水橘 *Fortunella margarita* (Lour.) Swingle 和香橼 *Citrus medica* L. 或柠檬 *Citrus limon* 样品. DNA 提取: 剪取 0.15 g 柑橘叶片中脉, 磨碎后用植物 DNA 提取试剂盒 (OMEGA, D2485-02) 提取基因组总 DNA. 利用 10 g · L⁻¹ 的琼脂糖凝胶检测提取的 DNA 的质量. 经柑橘黄龙病病原细菌的特异性引物 UP2/DP2 (UP2: 5'-ATGTTGTGGTAGATCAGGTGACGGT-3'; DP2: 5'-GCAAAAGGCATAATCATTAACCAA-3') 鉴定, 筛选出阳性的砂糖橘、马水橘、香橼和柠檬样品.

1.2 引物设计与 PCR 扩增

1.2.1 “*Ca. L. asiaticus*” SSR 位点的筛选 从 Genebank 中下载到 1.23 Mb 和 1.27 Mb 的 Psy62 菌株和 gxpsy 菌株的全基因组序列 (Genebank ID: gb | CP001677.5 和 gb | CP004005.1). 利用 Tandem Repeats Finder (version 4.07b) 在线软件扫描分析候选的 SSR 位点信息; 经 PCR 筛选, 从 33 对不同候选 SSR 位点的引物中选择扩增产物条带丰富且多态性良好的引物 SSR3F (5'-GTAGGAGTCCCCGAAAT-3') 和 SSR3R (5'-GCCTGTACGAGGTTTGA-3') 用于本研究^[9].

1.2.2 PCR 扩增 SSR 基因 以筛选到的阳性 DNA 为模板, 以上述引物进行常规 PCR 扩增. 15 μL 的 PCR 体系含 10 ~ 20 ng DNA、17.6 μL 灭菌 ddH₂O、10 × *Taq* buffer (含 Mg²⁺, TianGen)、dNTPs (2.5 mmol · L⁻¹, TianGen) 各 1.5 μL, 正反向引物 (10 μmol · L⁻¹) 各 0.5 μL 及 0.2 μL *Taq* DNA 聚合酶 (2.5 mol · μL⁻¹). 将以上混合体系置于在 Bio-RAD 热循环仪上进行扩增; PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 56 ~ 60 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环后 72 °C 延伸 10 min. 利用 10 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶检测 PCR 扩增结果.

1.3 PAGE 电泳条带的处理

PCR 产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后采用银染法^[10]染色. 显色结束后, 拍照获取谱带信息, 并切下 PAGE 胶上的目的条带.

选用 4 种方法溶解含有 DNA 片段的 PAGE 胶: 分别加入 100 μL Elution buffer (OMEGA, D2485-01)、ddH₂O、Buffer DE-A (AxyPrep, D5114KE1) 和溶胶/结合液 DE (Bioteke, DT1701), 置于 65 °C 水浴锅中温浴 10 min. 将其中一组样品的液态溶胶液用移液枪吸入已灭菌的 1.5 mL 离心管, 与固态 PAGE 胶分离; 另一组样品则不作分离处理.

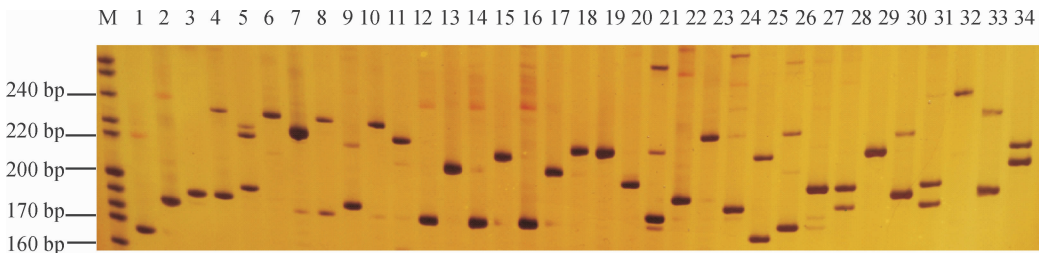
用沉淀法收集 DAN 片段^[11], 以回收的 10 μL 微量 DNA 为模板, 用原对应的引物 PCR 扩增. 电泳检测 PCR 扩增结果.

2 结果与分析

2.1 4 种 PAGE 胶溶解方法的比较

选用的引物 SSR3F/3R 对不同来源的“*Ca. L. asiaticus*”菌株扩增谱带信息丰富, 在 PAGE 胶上区分度大 (图 1), 能够分离. 选择能扩增出 3 个条带的第 5 个样品做后续试验.

经温浴后, OMEGA Elution buffer、ddH₂O 和 AxyPrep 溶胶液 DE-A 均无法溶解 PAGE 胶 (图 2A、2B、2C), 而 Bioteke 溶胶/结合液 DE 处理后的 PAGE 胶变透明 (图 2D).



M: DNA Marker, 1 ~ 34 为采自广东或云南的不同“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”菌株.

图 1 不同“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”菌株 PCR 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳谱带

Fig. 1 PAGE profiles of different “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” strains amplified using primers SSR3F/3R

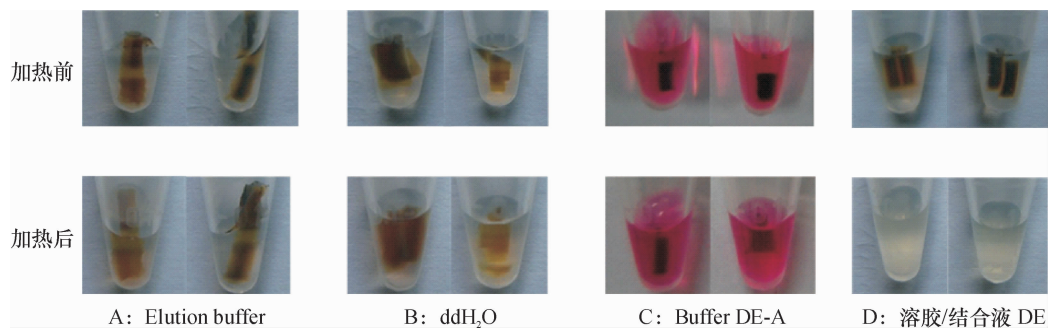


图 2 4 种不同的试剂溶解聚丙烯酰胺凝胶的效果比较

Fig.2 Comparisons of the efficiency of four different reagents in polyacrylamide gel electrophoresis dissolvent

2.2 4 种 PAGE 胶 DNA 回收片段的再扩增效果

回收的 DNA 片段经相应引物再扩增后用 10 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测. 前 3 种方法的回收产物作为模板未能再扩增到目的条带, 而 Biotek 溶胶/结合液 DE 回收的产物经再扩增后获得了清晰的目的条带(图 3). 表明简单的化学(Biotek 溶胶/结合液 DE) + 物理方法(65 ℃ 水浴 10 min) 可以将微量的 DNA 从 PAGE 胶中析出.

2.3 未溶解的 PAGE 胶对 DNA 回收效率的影响

为了验证水浴加热后的液态 PAGE 胶与未溶解的固态胶分离对 DNA 的获得率的影响, 本试验对比了 2 组操作的再扩增效果. 一方面, 若不将液态 PAGE 胶与少量沉淀分离, 在 DNA 沉淀过程中, 经 φ 为 75% 的乙醇溶液洗涤干燥后重悬的过程中, 少量透明的沉淀物会吸水膨胀, 即含 DNA 的 ddH₂O 会再次被 PAGE 胶快速吸收. 另一方面, 经分离的 PAGE

胶中沉淀的核酸样品能有效地被再扩增(图 4A), 而去除 PAGE 胶沉淀的样品经 PCR 再扩增不能获得目的条带(图 4B).

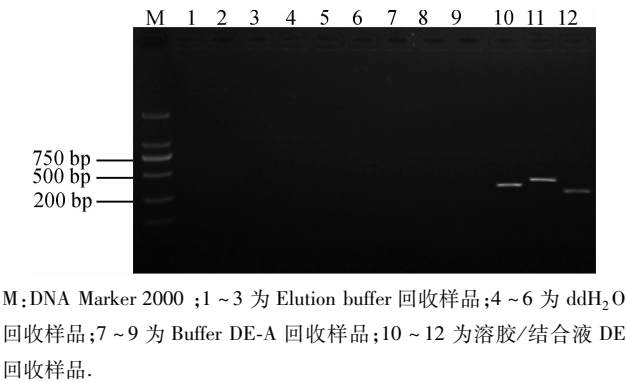
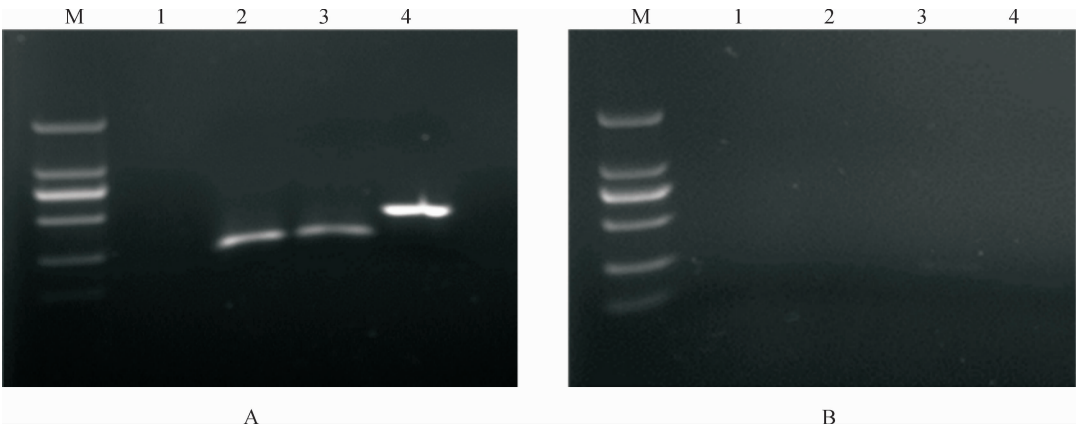


图 3 以 4 种不同方法回收的 DNA 为模板进行再扩增的结果
Fig.3 Agarose gel electrophoresis of reamplification bands using templates recovered by four different buffers



A 为液态 PAGE 胶液与少量固态沉淀分离的样品再扩增结果;B 为未将液态 PAGE 胶液与少量固态沉淀分离的样品再扩增结果;M:DNAMarker 2000;1 为空白对照;2~4 为 3 个 PAGE 条带的回收产物.

图 4 将温浴后的液态溶液与少量固态沉淀分离的回收产物再扩增效果

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified using liquid matters separated or un-separated with pellets on the bottom of tube

3 讨论与结论

在“*Ca. L. asiaticus*”菌株的全基因组序列公布以后,“*Ca. L. asiaticus*”的多样性研究迅速成为热

点^[12-14]. “*Ca. L. asiaticus*”基因组中的短串联重复序列也被用于菌株多态性分析^[15-16]. 以上多样性研究证明借助于 PAGE 可以很好地区分扩增产物的多态性.

较之琼脂糖凝胶电泳, PAGE 在小分子片段的分离, 特别是多条带区分中具有独特的优势^[14]. 从 PAGE 胶中有效回收目的条带是分子生物学试验中进一步进行序列克隆、分析的基础. 水煮法、研磨法、液氮研磨法、直接法等要求较大上样量, 并不适合有效地回收 PAGE 胶中微量的核酸. 由于 PAGE 胶在高温下不能溶解且其物理结构十分紧密^[17], 胶中的 DNA 很难在研磨、煮沸等条件下释放. 本研究证明从 PAGE 胶中回收 DNA 片段的关键在于 DNA 从 PAGE 胶中释放并游离出来.

多次试验发现, 从 PAGE 胶中回收核酸片段应注意: 首先, 含 DNA 的 PAGE 胶即使在 -20℃ 条件下也不适合长时间保存(-20℃ 下存放超过 10 d, DNA 可能会部分降解); 其次, 应避免将样品长时间浸泡在溶解液中, 溶解液可能引起 DNA 降解; 第三, 未溶解的胶体经干燥后的吸水能力强, 能重新吸附 DNA 片段, 从而导致 DNA 回收效率大大降低; 再者, 本试验中所用的溶胶液是针对于琼脂糖凝胶的, 因而未能完全溶解 PAGE 胶, 但是 PAGE 胶中的 DNA 可以在该条件下析出, 并进入溶胶液. 未将液态溶胶液与少量固态沉淀分离而导致再扩增失败的原因可能是残留的某化学物质抑制了 PCR 反应.

本试验通过试剂的选择和操作方法的简化, 避免了对 PAGE 胶的破碎, 从而减少了试验时间和操作步骤, 并实现了快速高效批量地回收 PAGE 胶中微量的 DNA 目的小片段.

参考文献:

[1] CHRAMBACH A, RODBARD D. Estimation of molecular radius, free mobility, and valence using polyacrylamide gel electrophoresis[J]. Anal Biochem, 1971, 40(1): 95-134.

[2] CHEMICALS P F. Polyacrylamide gel electrophoresis[J]. J Immunol, 1980: 54-55.

[3] 马啸, 周永红, 于海清. 野生垂穗披碱草种质的醇溶蛋白遗传多样性分析[J]. 遗传, 2006, 28(6): 699-706.

[4] RATH A, DEBER C M. Correction factors for membrane protein molecular weight readouts on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis [J]. Anal Biochem, 2013, 434(1): 67-72.

[5] 王春, 陈琳玲, 许灿新, 等. 简便快速的 PCR 产物回收方

法[J]. 南华大学学报, 2005, 33(1): 109-111.

[6] 章蕾, 袁玲, 黄建安, 等. 从非变性聚丙烯酰胺凝胶中回收 DNA 小片段的两种方法比较[J]. 中国农学通报, 2011, 27(7): 227-230.

[7] 朱玉君, 樊叶杨, 庄杰云. 从非变性聚丙烯酰胺凝胶回收纯化 DNA 样本[J]. 生物技术通报, 2010(1): 193-195.

[8] 周颐, 王忆平. 从非变性聚丙烯酰胺凝胶中快速高效回收 DNA 片段[J]. 生物技术通报, 2013(5): 194-198.

[9] 许美容, 郑正, 李昕晟, 等. 基于短串联重复和 PAGE 的柑橘黄龙病‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’种间遗传多样性[J]. 植物病理学报, 2014, 44(6): 609-619.

[10] 乐晓萍, 杜鹏, 张钦宪, 等. 聚丙烯酰胺凝胶银染技术改良[J]. 河南医科大学学报, 2001, 36(4): 395-396.

[11] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京, 高等教育出版社, 1993: 56-57.

[12] LIU R, ZHANG P, PU X L, et al. Analysis of a prophage gene frequency revealed population variation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from two citrus-growing provinces in China [J]. Plant Dis, 2011, 95(4): 431-435.

[13] ZHOU L J, POWELL C A, HOFFMAN M T et al. Diversity and plasticity of the intracellular plant pathogen and insect symbiont ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ as revealed by hypervariable prophage genes with intragenic tandem repeats [J]. Appl Environ Microb, 2011, 77(18): 6663-6673.

[14] WANG X F, ZHOU C Y, DENG X L, et al. Molecular characterization of a mosaic locus in the genome of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ [J]. BMC Microbiol, 2012, 12(1): 18.

[15] CHEN J C, DENG X L, SUN X A, et al. Guangdong and Florida populations of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ distinguished by a genomic locus with short tandem repeats [J]. Phytopathology, 2010, 100(6): 567-572.

[16] ISLAM M S, GLYNN J M, BAI Y, et al. Multilocus microsatellite analysis of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ associated with citrus Huanglongbing worldwide[J]. BMC Microbiol, 2012, 12(1): 39.

[17] 蒋志飞. 活性自由基聚合法制备聚丙烯酰胺及其水凝胶的研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2007.

【责任编辑 霍 欢】