

毛干 DNA 的快速提取及其对 PCR 的影响

管政¹, 刘金钊¹, 周宇^{1,2}, 蒋小玲¹, 杨曙明¹, 陈爱亮^{1*} (1. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 农业部农产品质量安全重点实验室, 北京 100081; 2. 济宁医学院公共卫生学院, 山东济宁 272067)

摘要 [目的]建立毛干 DNA 快速稳定的提取扩增策略,使这一简便取材能在畜牧、野生动物保护等采样困难的领域得以普及应用。[方法]采用 PCR 缓冲液快速提取及 2 轮 PCR 逐级稀释扩增的策略提取扩增黄牛毛干 DNA 微卫星位点。[结果]该方法可从低至 0.1 mg(约 1 cm 长)的毛干中提取得到 DNA,并成功扩增核 DNA 微卫星位点。48 份黄牛毛干样本均成功提得 DNA。72 份扩增样本,除 4 份样本扩增效果较差,其余样品均能正常扩增。[结论]该研究方法可快速稳定的提取扩增目标基因,为毛干在相关领域的普及应用奠定了基础。

关键词 毛干;DNA;提取;PCR

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)25-10232-04

A Fast Hair Shaft DNA Extraction Method and Its Influence on PCR Amplification

GUAN Zheng et al (Institute of Quality Standard & Testing Technology for Agro-Products, CAAS, Beijing 100081)

Abstract [Objective] To establish a fast and stable hair shaft DNA extraction and amplification strategy, and make it to use in animal husbandry and wild animals protection. [Method] An improved PCR buffer fast extraction method and 2 rounds of PCR strategy were adopted to extract and amplify DNA locus of cattle hair shaft. [Result] The result showed that this strategy even can extract nuDNA (nuclear DNA) and amplify its target genes from 0.1 mg (about 1 cm) hair shaft. It successfully extracted DNA from all 48 hair shaft samples of cattle. In amplification stage, 68 of 72 amplification samples have got its target genes. [Conclusion] This method can extract nuDNA from hair shaft and amplify its target genes fast and stable, which lays a foundation for application of hair shaft in relevant field.

Key words Hair shaft; DNA; Extraction; PCR

毛干(Hair shaft),即不包含毛根的毛发。它作为最易取得的一种无创、运输和储存方便的生物样本,对从核酸分子水平上进行动物物种鉴定、亲缘关系、系统进化、多样性评估、良种繁育、疾病监测、刑侦法医及古生物学等方面研究都有着十分重要的意义。

虽然有关毛干 DNA 提取的报道已屡见不鲜,但由于毛干 DNA 含量低、髓质层与皮质层中含大量色素不易与 DNA 分离而抑制 PCR 扩增等问题^[1-2],常造成 DNA 提取、纯化困难,导致毛干取材的分子生物学相关研究受到限制,并造成进一步试验的不稳定,影响下游工作。如何稳定、便捷的成功提取、扩增毛干 DNA 至今仍是一个技术难题。这直接影响了其在相关领域常规研究中的普及应用,如国际法医遗传组织(International Society of Forensic Genetics, ISFG)西班牙葡萄牙合作组(Spanish and Portuguese working group, GEP)曾做过与毛干线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA, mtDNA) 相关的一个联合研究^[3],64 个实验室以 2 段 2~4 cm 长的毛干为样本进行 mtDNA 的提取、扩增与测序,结果 23 个实验室(43%)没能取得数据,只有 3 个实验室得到了正确的结论,其中不少曾在过去的联合研究中取得过成功检测结果的实验室也未能在本次试验中取得成功。

因此,寻找便捷、稳定的毛干 DNA 提取方法,考察影响其下游 PCR 扩增成功率的相关因素很有必要。为此,笔者综述^[4]了 CNKI、万方、维普、Web of Science、PubMed 等几个

数据库检索所得的近 30 年涉及毛干 DNA 提取的国内外文献,建立了针对毛干 DNA 的 PCR 缓冲液快速提取及 2 轮 PCR 逐级稀释扩增的方法,并对其相关影响因素进行了考察,以期找到一种更为稳定、有效的毛干 DNA 提取方法。

1 材料与方法

1.1 材料 鲁西黄牛鬃毛毛干(不含毛囊)。8 头黄牛毛干样品分别采自山东省菏泽市牡丹区沙土镇、牡丹区鲁西黄牛原种场及鄄城县凤凰乡。样品采集时间:2011 年 11 月,常温采样保存 1 周后, -18℃ 保存。

主要仪器:PCR 仪,7500 Real Time PCR System(AB 公司);荧光多功能酶标仪,Infinite F200(Tecan 公司);紫外凝胶成像系统,AlphaImager EP(Alpha Innotech 公司)。电泳仪,DYY-6C 型(北京市六一仪器厂);分析天平,XS105 Dual Range(Mettler Toledo 公司);低温恒温槽,DKB-1906 型(上海精宏实验设备有限公司);离心机,Minispin(Eppendorf 公司)。

主要试剂:Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit(Invitrogen 公司);Power SYBR Green PCR Master Mix(AB 公司);ddH₂O、10×Taq Buffer、D2000、GeneGreen 核酸染料(天根生物技术有限公司);Biowest Regular Agarose G-10(Gene 公司);Proteinase K(Roche 公司);DTT(Merck 公司)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取。将 PCR 缓冲液(10×Taq Buffer,主要含 200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4);200 mmol/L KCl;100 mmol/L (NH₄)₂SO₄;15 mmol/L MgCl₂)用 ddH₂O 稀释成 1×缓冲液,加入蛋白酶 K(终浓度 0.25 mg/ml)、DTT(终浓度 35 mmol/L),配成 DNA 提取液。

毛干以市售巴斯消毒液、ddH₂O、EtOH 漂洗后,称取适

基金项目 国家国际科技合作专项项目(2012DFA31140);公益性行业(农业)科研专项经费(201203046)。

作者简介 管政(1980-),女,浙江绍兴人,实验员,从事分子生物学及仪器分析检测技术研究。*通讯作者,副研究员,博士,从事分子生物学及农产品、食品质量与安全开发研究,E-mail:ailiang.chen@gmail.com。

收稿日期 2013-07-28

量、剪碎(约 1~3 mm 长)置于 EP 管中,加入适量 DNA 提取液,56 ℃ 水浴 1.5 h 后 95 ℃ 10 min 灭活蛋白酶 K,10 000 r/min 离心,取上清适量作为 PCR 模板。

试验分组(各组按比例制备 5 倍的量,预先分装备用)情况如表 1 所示。

表 1 样品分组

取样量 mg	提取液体 积/ μl	PCR 模板量 (第 1 轮)	PCR 模板量 (第 2 轮)	引物
5.0	100	各取样量组下再各分 6 个模板量组,分别为 5、2、1、0.5、0.2、0.1 μl 组	各组模板用量均为 2 μl	ETH225 和 HAUT27
2.0	100			
1.0	100			
0.5	100			
0.2	100			
0.1	100			

注:引物为 ISAG-FAO 推荐的牛的微卫星位点引物。

1.2.2 DNA 含量测定。参考《中国药典》2010 版第三部附录 IX B“外源性 DNA 残留量测定法第二法,荧光染色法”^[5]测定毛干中 DNA 含量。该法 DNA 检出限为 0.3 ng/ml。DNA 含量在 1.25~80 ng/ml 范围线性较好,因此依据相关文献数据^[6-11],供试品 DNA 含量在该范围内当可定量测定。

依据高灵敏度荧光染料 PicoGreen 能与双链 DNA 特异结合形成复合物,在波长 480 nm 激发下产生超强荧光信号的原理,可用荧光酶标仪在波长 520 nm 处进行检测。利用在一定的 DNA 浓度范围内、PicoGreen 荧光染料过量的情况下,供试品的荧光强度与 DNA 浓度成正比的关系,计算供试品中 DNA 含量。试剂配制按 Invitrogen 公司 PicoGreen 试剂盒说明书操作。

1.2.3 PCR 扩增及电泳检测。PCR 扩增体系为 20 μl ,包括 DNA 提取液模板(分组及模板用量见表 1),Power SYBR

Green PCR Master Mix 10 μl (AB 公司),200 nmol/L 的 nuDNA SSR 引物[2 对引物分别为 ISAG-FAO 推荐的牛 SSR 引物,ETH225(Genebank accession number:Z14043)和 HAUT27(Genebank accession number:X89252),由上海生工生物工程技术有限公司北京合成部合成]。

为观察和分析取样量、模板用量及杂质对 PCR 扩增的影响,采用实时荧光 PCR 进行监测、分析。2 对引物的扩增条件分别为:ETH225,95 ℃ 10 min,35 个循环(95 ℃ 20 s,62 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min),72 ℃ 10 min;HAUT27,95 ℃ 10 min,35 个循环(95 ℃ 20 s,57 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min),72 ℃ 10 min。2 对引物均扩增 2 轮,扩增条件不变,后一轮扩增以前一轮扩增产物为模板,第 2 轮扩增各组模板用量均为 2 μl 。

1.2.4 电泳。取 4 μl 第 2 轮 PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析,电泳缓冲液为 1 × TBE,电场强度为 10 v/cm。

2 结果与分析

2.1 提取液 nuDNA 含量 由于毛干中 DNA 含量极低,常规 UV 检测仪器检测限为 2 ng/ μl (dsDNA)且受杂质干扰很大,尤其毛发中的色素在 230 nm 处有强吸收可完全掩蔽 DNA 260 nm 处的吸收,以致使无法定量或测得值偏离实际含量很大^[1-2],因此不是大量取样且经过严格的纯化富集很难直接对毛干中提取所得的 nuDNA 进行初步定量。国际上则多采取实时荧光定量 PCR 对提取液模板中 DNA 含量进行评估^[12-15]。但此种方法对仪器及试验设计要求较高,并不适于快速、简便的估测毛干中 DNA 含量,以推广与普及该种极易取得的取材在分子生物学各研究领域的科研应用。出于准确、便利、广适性的考虑,该试验参考了《中国药典》2010 版第三部附录 IX B“外源性 DNA 残留量测定法第二法,荧光染色法”^[5]对毛干中 nuDNA 含量进行了初步测定。各组测得的 nuDNA 含量情况见表 2。

表 2 nuDNA 含量

分组	nuDNA 含量(8 头黄牛)// ng/ml								\bar{X}	SD
	1	2	3	4	5	6	7	8		
5.0 mg/100 μl	53.8	52.8	52.8	51.8	55.1	61.7	47.5	48.8	53.1	4.0
2.0 mg/100 μl	32.4	36.6	24.3	37.2	33.5	35.5	28.2	24.1	31.5	5.0
1.0 mg/100 μl	25.2	25.3	17.1	26.4	23.4	30.6	23.0	22.7	24.2	3.6
0.5 mg/100 μl	17.3	17.6	15.7	23.2	19.5	18.7	12.3	16.1	17.6	3.0
0.2 mg/100 μl	14.6	13.4	6.2	13.6	13.7	15.4	11.8	9.4	12.3	2.9
0.1 mg/100 μl	12.2	10.2	6.8	10.5	8.5	10.0	11.6	7.6	9.7	1.8

2.2 PCR 扩增与电泳情况 考虑到毛干 DNA 含量低且有色素等大量杂质对 PCR 扩增的影响,试验采取了 2 轮 PCR 方法对 nuDNA 目标基因进行了扩增,以减少杂质干扰,增加扩增效率与终产物得率。牛 SSR 目标基因分别为位于 9 号染色体的 ETH225(Genebank accession number:Z14043)和位于 26 号染色体的 HAUT27(Genebank accession number:X89252),等位基因片段长度区间 ETH225 为 131~159 bp、HAUT27 为 120~158 bp。

结果发现 72 份扩增样本,除引物 HAUT27 第 1 轮 PCR

模板用量 5.0 μl 组的 4 份样本扩增效果较差、在第 1 轮 PCR 中未能测得 C_T 值且第 2 轮扩增效率低下外,其余样品均能够正常扩增。色素等杂质对 PCR 扩增的抑制在本次考察的快速提取法中主要与 PCR 模板用量呈正相关。低模板量组普遍扩增效果较好,甚至低至 0.1 mg(约 1 cm)取样量的毛干样品的 0.1 μl 模板量组亦能取得正常扩增。总体效果以 0.2 μl 及 0.5 μl 模板量组扩增最佳(图 1 和图 2)。此外,对该方法而言,与其他方法^[1-2,8]不同的是取样量对扩增效果影响不大。

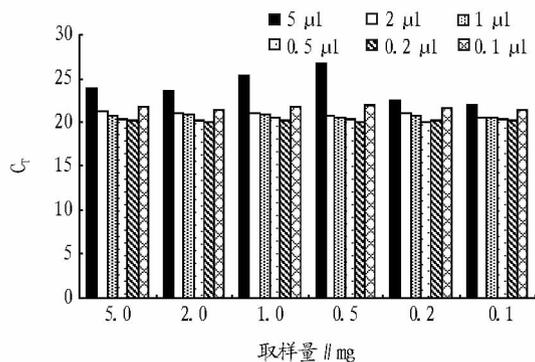


图1 毛干取样量及 PCR 模板用量对 ETH225 扩增效率的影响

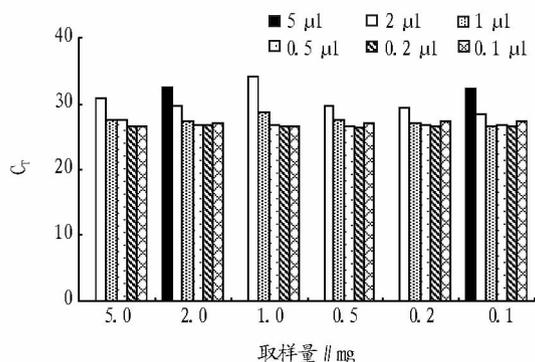


图2 毛干取样量及 PCR 模板用量对 HAUT27 扩增效率的影响

此外,对第 1 轮 PCR 扩增的 2 个低模板组(0.1、0.2 μ l 组)2 次扩增后的终产物进行了琼脂糖凝胶电泳,以确认目标基因条带,电泳情况见图 3。

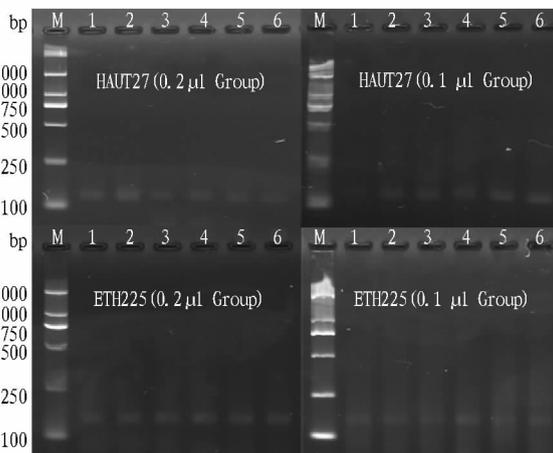
3 讨论

Yamamoto 等的系列研究^[1-2]发现色素对 PCR 扩增抑制严重,他们指出取样量过低或过高都可因扩增模板量不足或色素完全抑制扩增而导致毛干 DNA 提取及其 PCR 扩增检测失败,建议的最佳取样量为 5~10 cm(约 0.5~2.0 mg)。在该试验中,研究认为,对 PCR 缓冲液快速提取法而言,取样量并非影响 PCR 扩增成功与否的关键因素;控制 PCR 扩增起始 nuDNA 模板量与色素等杂质干扰的主要因素为第 1 轮扩增未经纯化的毛干 DNA 提取液(扩增模板)用量。试验表明,采用该提取法时,第 1 轮 PCR 扩增低提取液(扩增模板)用量(如 20 μ l 体系 0.1~2.0 μ l 模板量)能从扩增模板方面基本确保扩增成功。推测第 1 轮 PCR 扩增低提取液(扩增模板)用量将可使扩增体系中的模板量与色素等抑制扩增的因素取得较好平衡,而保障了试验提取扩增的高成功率。

从 PicoGreen 荧光染色法直接测得的 8 头牛毛干各取样组提取液的 nuDNA 含量情况看,即便是经过长时间储存的样品、低至 0.1 mg(约 1 cm)的毛干取样量亦能通过该法顺利提取得到 nuDNA,且提取效果稳定,SD 值较小、样品间差异不大。可见,该法可作为一种稳定、便宜、快捷、高效的毛干取材的 DNA 提取方法。而从各取样组 DNA 含量差异看,DNA 在提取液中的含量仅随取样量增加而略呈上升趋势,提示采用该提取方法增加取样量并不能较大提升提取效果,低取样量即可获得不错的提取效果,从扩增情况看亦足

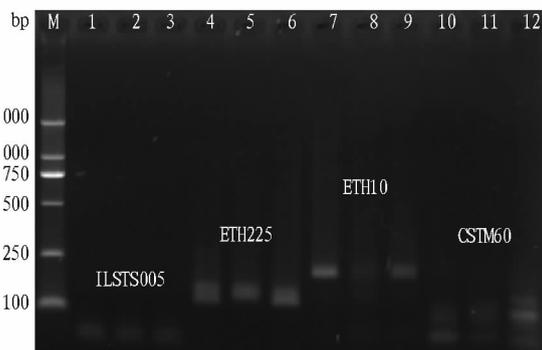
够充当 PCR 扩增的模板。

在该研究中,由于样品提取液未经纯化,为减少色素等杂质对扩增的抑制及非特异性扩增的发生,并提高扩增效率、成功率与重复性,采用了 2 轮 PCR 扩增,扩增条件不变,后一轮扩增以前一轮扩增产物为模板。由 72 份扩增样本中 68 份获得较佳扩增效果的结果及前期反复预试验的结果看,认为该种简单的扩增策略对 PCR 缓冲液快速提取法提取的毛干 nuDNA 成功扩增有很大帮助。



注:M. DNA marker;1.50 mg/100 μ l;2.20 mg/100 μ l;3.10 mg/100 μ l;4.0.5 mg/100 μ l;5.0.2 mg/100 μ l;6.0.1 mg/100 μ l。

图3 不同毛干取样量组的相同 PCR 模板量扩增后的产物电泳图谱



注:M. DNA Marker;1,4,7,10.0.1 μ l;2,5,8,11.0.5 μ l;3,6,9,12.2.0 μ l;(Size of target genes:ILSTS005,179~194 bp;ETH225,131~159 bp;ETH10,207~231 bp;CSRM60,79~115 bp)。

图4 4 对 SSR 引物采用 3 个毛干提取液 PCR 模板量扩增的产物电泳图谱

但是,从该研究的相关预试验看,也发现毛干中 DNA 毕竟含量低、存在环境特殊,并非所有可由其他富含 nuDNA 组织提取扩增得到的目的基因均可通过提取所得的毛干 nuDNA 模板顺利扩增出来。如图 4 所示,在随机抽取的 4 对 IS-AG-FAO 推荐的牛 SSR 引物 3 个不同提取液用量组(0.1、0.5、2.0 μ l)作为扩增模板的 2 轮扩增后的电泳情况看,3 对引物扩增得到了目的基因条带(ETH225,131~159 bp;ETH10,207~231 bp;CSRM60,79~115 bp),但 SSR 基因片段长度为 176~194 bp,名为 ILSTS005 的基因并未由此得到期望的电泳条带。可见,对少数目标基因而言,是否由毛干中

成功提取得到了 DNA 并且优化了模板用量与 PCR 条件均不是主要影响因素,而可能由于毛干在生长过程中,毛发的角质化导致皮质细胞溶解、nuDNA 损伤引起^[16-17]。

总之,尽管毛干 DNA 尤其 nuDNA 的提取扩增存在种种困难和一定程度适用性上的限制,但它作为一种极易获得的生物样本,努力寻找一种快速、稳定、经济、可靠地获取并扩增毛干 DNA 的方法仍不失为一项深具科研应用价值的研究。该研究通过前期文献研究,分析、探讨了毛干 DNA 的 PCR 缓冲液快速提取法及影响其提取扩增成功率、稳定性等的相关因素。认为,毛干采用 PCR 缓冲液快速提取法提取后,可通过 2 轮 PCR 及控制第 1 轮 PCR 低提取液模板用量的方法稳定、顺利的扩增出大部分相关分子生物学试验需要的目标基因,甚至可从低至 0.1 mg (约 1 cm) 的毛干样本中提取到所需 DNA,推测采用该法若减少提取液用量(该试验为 0.1 mg/100 μ l)或可从更少的样本中得到研究所需 DNA。这对于需要大范围采样的农业畜牧产品溯源、良种培育、野生动物生物多样性研究及部分采样困难或样品极其珍贵的疾病监测、古生物研究、刑侦法医疑难案件侦破等方面都是十分有意义的参考。

参考文献

- [1] UCHIHAI R, TAMAKI K, KOJIMA T, et al. Deoxyribonucleic acid (DNA) typing of human - leukocyte antigen (hla) - dqa1 from single hairs in japanese[J]. Journal of Forensic Sciences, 1992, 37(3): 853 - 859.
- [2] NOZAWA H, YAMAMOTO T, UCHIHAI R, et al. Purification of nuclear DNA from single hair shafts for DNA analysis in forensic sciences[J]. Legal Medicine (Tokyo, Japan), 1999, 1(2): 61 - 67.
- [3] PRIETO L, MONTESINO M, SALAS A, et al. The 2000 - 2001 gep - isfg collaborative exercise on mtDNA: assessing the cause of unsuccessful mtDNA PCR amplification of hair shaft samples[J]. Forensic Science International, 2003, 134(1): 46 - 53.

(上接第 10229 页)

于环境恶劣、岩壁陡峭,在风化、溶蚀过程中其他矿物质易流失,而钙化沉积。

(4) 白花兜兰原生境周围条件严酷、复杂,气候存在特有性,且白花兜兰稀有性、种群稀少、植株优雅、花大白色、花形姣美且有香气,具有极高观赏价值和科学研究价值。该研究所观测到的一些温度、相对湿度、光照及日照时数特征规律只是个案,还有许多生境因素待于进一步观测、分析,以便为白花兜兰种群复壮、回归、保护提供更全面的气候资料。

参考文献

- [1] 傅立国. 中国植物红皮书[M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [2] 覃文渊, 覃国乐, 覃文更. 白花兜兰的群落结构特征分析[J]. 北方园艺, 2012(11): 78 - 80.
- [3] 谭卫宁. 广西木论国家级自然保护区兜兰属(兰科)植物资源现状与保

- [4] 管政, 陈爱亮. 毛干 DNA 提取方法概述[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(10): 128 - 134.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典三部 2010 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 61.
- [6] MCNEVIN D, WILSON-WILDE L, ROBERTSON J, et al. Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair - part 2. An optimised genomic DNA extraction procedure reveals donor dependence of STR profiles[J]. Forensic Science International, 2005, 153(2/3): 247 - 259.
- [7] SCHREIBER A, AMTMANN E, STORCH V, et al. The extraction of high - molecular - mass DNA from hair shafts[J]. Febs Letters, 1988, 230(1/2): 209 - 211.
- [8] AMORY S, KEYSER C, CRUBEZY E, et al. Str typing of ancient DNA extracted from hair shafts of siberian mummies[J]. Forensic Science International, 2007, 166(2/3): 218 - 229.
- [9] 邵碧英, 林志武, 陈文炳, 等. 快速、高效的羊绒羊毛织品 DNA 提取方法的建立[J]. 生物技术, 2009, 19(5): 38 - 39.
- [10] TAKAYANAGI K, ASAMURA H, TSUKADA K, et al. Investigation of DNA extraction from hair shafts[J]. Progress in Forensic Genetics, 2003, 1239: 759 - 764.
- [11] 徐怀亮, 汪宴廷, 姚永芳, 等. 藏酋猴毛干 DNA 的 3 种提取方法[J]. 东北林业大学学报, 2010(2): 58 - 61.
- [12] ANDREASSON H, NILSSON M, BUDOWLE B, et al. Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials[J]. Forensic Science International, 2006, 164(1): 56 - 64.
- [13] BARBARO A, CORMACI P, BARBARO A. Multiplex STRs amplification from hair shaft: validation study[J]. International Congress Series, 2006, 1288: 676 - 678.
- [14] GILBERT M T P, WILSON A S, BUNCE M, et al. Ancient mitochondrial DNA from hair[J]. Current Biology, 2004, 14(12): 463 - 464.
- [15] GILBERT M T P, JANAWAY R C, TOBIN D J, et al. Histological correlates of postmortem mitochondrial DNA damage in degraded hair[J]. Forensic Science International, 2006, 156(2/3): 201 - 207.
- [16] LINCH C, WHITING D, HOLLAND M. Human hair histogenesis for the mitochondrial DNA forensic scientist[J]. Journal of Forensic Sciences, 2001, 46(4): 844 - 853.
- [17] MCNEVIN D, WILSON-WILDE L, ROBERTSON J, et al. Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair - part 1. Review of current status and knowledge gaps[J]. Forensic Science International, 2005, 153(2/3): 237 - 246.

护对策[J]. 广西林业科学, 2009, 38(3): 187 - 189.

- [4] 覃龙江, 刘绍飞, 莫家伟, 等. 茂兰保护区野生白花兜兰种群资源[J]. 农技服务, 2012, 29(4): 452.
- [5] 冉景丞, 鲁成巍. 茂兰自然保护区兰科植物资源现状及保护利用途径[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(11): 5209 - 5211.
- [6] 张邦琨, 韦小丽, 曾信波. 喀斯特地貌森林不同小生境的小气候特征研究[J]. 贵州气象, 1995(4): 16 - 19.
- [7] 张邦琨, 韦小丽, 曾信波. 喀斯特森林不同小生境的小气候特征[J]. 贵州农学院学报, 1996, 15(1): 7 - 10.
- [8] 俞国松, 王世杰, 容丽. 茂兰喀斯特森林演替阶段不同小生境的小气候特征[J]. 地球与环境, 2011, 39(4): 469 - 477.
- [9] 龙健, 周建威, 冉景丞, 等. 茂兰国家级自然保护区濒危植物小叶兜兰生态适应性研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(27): 13049 - 13051.
- [10] 周政贤. 茂兰喀斯特森林科学考察集[C]. 贵阳: 贵州人民出版社, 1987.
- [11] 卢家仕, 卜朝阳, 吕维莉, 等. 20 份兰科植物的 ISSR 遗传多样性分析[J]. 西南农业学报, 2012(6): 2252 - 2257.