

文章编号: 1674-7054(2017)03-0267-10

萆菴芋螺不同大小基因组 DNA 片段的分离制备

丁青^{1,2}, 刘月鹏^{1,2}, 朱晓鹏¹, 吴科榜², 罗素兰¹, 长孙东亭¹

(1 海南大学 热带生物资源教育部重点实验室/海口市海洋药物重点实验室, 海口 570228;

2 海南大学 热带农林学院, 海口 570228)

摘要: 使用常规酚/氯仿抽提法(CTAB法)、离心柱法和磁珠吸附法,分别从萆菴芋螺毒腺、肌肉及肝胰脏中提取基因组DNA,利用普通琼脂糖凝胶电泳与脉冲场电泳(PFGE)对基因组DNA片段进行分离,并检测提取DNA的大小和分布范围,同时,对脉冲场电泳条件进行了优化。结果表明,3种方法均可提取基因组DNA,其中CTAB法和离心柱法提取的毒腺DNA纯度高,产率大,可用于后续实验,而磁珠法产率适中且纯度不高,但离心柱法的DNA片段较小,大多在9 kb以下,而CTAB法提取的DNA片段较大,获得的20 kb以上的大片段量较多,更适用于大片段基因组文库的构建。3种芋螺组织中,肝胰脏产率最高但片段弥散有降解,毒腺DNA片段较大且集中,产率也较高,而肌肉的DNA片段产率最低且片段较小。因此,用CTAB法提取萆菴芋螺毒腺的DNA更适合构建大片段基因组DNA文库。筛选高质量的萆菴芋螺的DNA,利用优化的脉冲场电泳条件进行分离回收,获得了不同大小片段的DNA,为后续萆菴芋螺不同载体系统的基因组文库构建奠定了基础。

关键词: 萆菴芋螺; 基因组DNA提取方法; 基因组DNA片段; 分离制备; 脉冲场电泳

中图分类号: Q33 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2017.03.004

芋螺是热带海洋中的肉食性软体动物,它们通过毒管分泌毒液,用于捕食猎物和防御天敌^[1]。芋螺毒液的主要成分各种各样的小肽混合物,大多富含二硫键,这类小肽被称作芋螺毒素或芋螺肽(Conotoxins, Conopeptides, CTxs)。根据芋螺的食性,可以将芋螺分为3大类:依靠捕食小鱼为生的食鱼芋螺、捕食软体动物的食螺芋螺和捕食半索动物的食虫芋螺^[2]。CTxs是由前体蛋白加工而成,芋螺毒素的前体包括:N端高度保守的信号肽区域(Signal peptide),保守中央前区(pro-region)和高度可变的成熟区(mature peptide)^[3]。信号肽具有高度的保守性,可用于基因超家族的分类,按照信号肽序列的不同可以将CTxs分为若干超家族,如:A、T、O、M、S、P等,成熟肽是CTxs的活性形式,长度大多介于10~35个氨基酸,具有典型的半胱氨酸骨架,能特异地作用于离子通道和受体^[4-6]。目前,越来越多的多肽药物被应用到医疗中,CTxs用于治疗慢性疼痛和心肌梗塞等疾病作用显著,具有很大的药物开发潜力。已经进入临床使用的CTxs是齐考诺肽(已通过美国食品和药物管理局批准),可用于治疗癌症和艾滋病人的慢性疼痛^[1,7-8]。根据CTxs信号肽的保守性和药理学活性,已经发现有27个超家族,其中12个药理学家族具有良好的药理活性和广泛的应用前景^[9]。每种芋螺的毒素成分异常复杂,各自都有自身独特的毒素肽,且不同种类芋螺的毒素肽互不相同,重叠非常少。同一芋螺个体的不同发育阶段以及同一种类的芋螺在不同的地理环境下,所产生的毒素种类也很不相同^[10]。Jasmine Davis等用高分辨的液质联用分析显示,每种芋螺含有1 000~1 900种芋螺毒素^[11]; Vincent Lavergne等^[12]从澳大利亚昆士兰州的Lady Musgrave岛海域采集到*Conus episcopatus*芋螺种类的1个个体中,竟然发现了3 305个新的芋螺毒素前体cDNA基

收稿日期: 2017-03-13

修回日期: 2017-04-17

基金项目: 国家自然科学基金(41366002); 长江学者和创新团队发展计划(IRT-15R15)

作者简介: 丁青(1991-),女,海南大学热带农林学院2014级硕士研究生, E-mail: 598594694@qq.com

通信作者: 长孙东亭(1964-),男,研究员,研究方向: 生物技术与海洋药物, E-mail: zhangsundt@163.com

因序列。全球约有 500 多种芋螺, 据此估算全球约有 150 万种芋螺毒素药源宝库; 海南约有 50 种芋螺, 至少有 15 万种海南产芋螺毒素的潜在药源。然而, 已发现的芋螺毒素还不足其总量的 0.1%, 更多的芋螺毒素药物资源有待开发^[1]。由于全球范围内芋螺资源日趋减少, 很多濒危种类已不见踪影, 因而, 尽快建立各种芋螺的基因组文库, 对于芋螺毒素基因资源的保护、研究与开发利用具有非常重要的意义。基因组文库的构建对于筛选功能基因、构建物理图谱、保存物种遗传信息等相关研究工作至关重要^[13]。目前, 根据载体类型的不同, 将基因组文库分为多个类型, 如: 酵母人工染色体(YAC)、粘粒载体(fosmid)、质粒载体等不同的基因组文库, 不同载体对应选择插入的 DNA 片段大小和要求各不相同。因此, 分离不同大小适宜的基因组 DNA 片段对于构建不同类型基因组文库至关重要。其中 ≥ 100 kb 的 DNA 大片段可以选用 YAC、BAC、BIBAC、TAC 等染色体载体; 而大小在 35 ~ 100 kb 的 DNA 片段适合选用 P1 噬菌体、结合噬菌体载体、fosmid、cosmid 粘粒载体; 大小在 20 kb 以下的 DNA 小片段, 适合选用质粒载体。尤其是目前流行的 fosmid 粘粒载体, 它具有拷贝数低、筛选方便等特点, 因此越来越广泛地用于各种生物基因组文库的构建^[14]。笔者以海南产菖蒲芋螺(*C. vexillum*)为材料, 采取 3 种不同的方法提取其不同组织器官的基因组 DNA, 利用脉冲场电泳技术将基因组分离为不同大小的片段, 并进行回收, 同时优化各个步骤的技术参数。本研究旨在为利用不同类型的载体构建基因组文库提供目的 DNA 片段库, 并为芋螺基因组文库的构建提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器 菖蒲芋螺活体采自中国南海海域(图 1 A), 带回实验室后立即冻存于 -80 °C 超低温冰箱。实验前取出芋螺, 解冻后进行解剖, 小心取出毒液装置(图 1 B, 即彼此相连的毒管和毒腺), 收集毒腺, 同时剪取肌肉和肝胰脏组织用于总 DNA 的提取(图 1 B)。

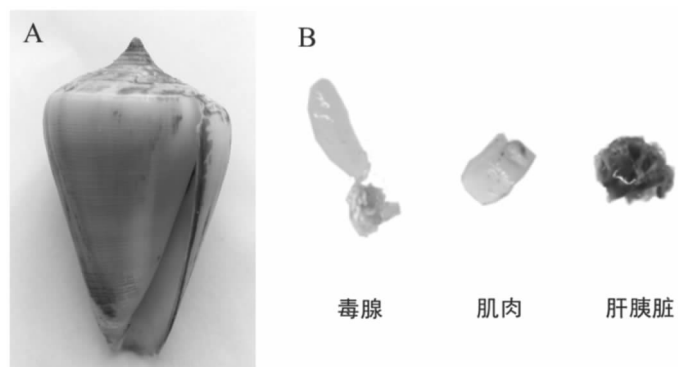


图 1 菖蒲芋螺及其不同组织部位

A. 海南产菖蒲芋螺; B. 菖蒲芋螺毒腺、肌肉和肝胰脏组织

Fig. 1 Photos and their different tissues of *Conus vexillum*

A. *Conus vexillum* Native to Hainan; B. Venom gland, hepatopancreas and muscle of *Conus vexillum*

海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒购自中国天根公司。 β -Agarase 为大连宝生物公司产品。水平凝胶电泳仪、CHEF Mapper XA 系统脉冲凝胶电泳仪均产自美国 Bio-Rad 公司。Nano Drop 2000 核酸微量测量仪为美国 Thermo 公司产品。凝胶成像系统产自美国 Protein Simple 公司。

1.2 常规酚/氯仿抽提法(CTAB 法)提取基因组 DNA 将 *C. vexillum* 毒腺、肌肉和肝胰脏组织在液氮中研磨至粉末状, 收集到 1.5 mL 离心管中, 称取 100 mg。分别加入 50 μ L 10% SDS, 500 μ L STE 裂解液, 4 μ L 蛋白酶 K (20 g $\cdot$ L⁻¹), 混匀后置 56 °C 水浴中温育约 3 h, 期间间断轻摇混匀, 待毒腺组织完全溶解至裂解液澄清。接着加入酚/氯仿/异戊醇(24:1) 1:1 等体积抽提液, 轻摇混匀数分钟, 12 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min。吸取上清, 重复上一步骤直至无蛋白层。吸取上清, 加入等体积氯仿/异戊醇, 摇匀 5 min, 12 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min。吸取上清, 加入 1/10 体积预冷 3 mol $\cdot$ L⁻¹ 醋酸钠 (NaAc, pH5.2), 等体积冷异丙醇, 轻摇混匀后置于 -80 °C 30 min。12 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min。弃上清, 冰冷 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次。室温干燥后加入

30 μL TE 缓冲液和 3 μL RNase ($10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液, 放置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜溶解, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。所提基因组 DNA, 分别取 3 μg 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和核酸微量测量仪检测纯度及浓度。

1.3 离心柱型试剂盒法提取基因组 DNA 将 30 mg 冻存的 *C. vexillum* 毒腺、肌肉和肝胰脏液氮研磨后, 放入加有 200 μL GA 缓冲液的离心管中, 并加入 40 μL 核糖核酸酶(RNase, $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液, 涡旋振荡 15 s 后, 室温静置 5 min。加入 20 μL 蛋白酶 K ($20\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 涡旋混匀后, 置于 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅内, 每隔 0.5 h 轻微震荡混匀 1 次, 大约 2~3 h 后组织完全溶解。简短离心, 加入 200 μL GB 缓慢且充分颠倒混匀后, 置于 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅内 10 min, 简短离心, 加入 200 μL 无水乙醇, 轻柔颠倒混匀, 将混合液体移入吸附柱中, $12\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 s, 弃废液。加 500 μL GD 至吸附柱中, $12\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 s, 弃废液。加 600 μL PW 漂洗液至吸附柱中, $12\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 s, 弃废液。重复上一步骤。将吸附柱 $12\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 空转离心 2 min, 弃废液后将吸附柱置于室温中数分钟, 晾干残留的漂洗液。将吸附柱放置在灭菌的 1.5 mL 离心管中, 向吸附柱中心位置滴加 40 μL TE, 室温放置 5 min, $12\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min 收集 DNA。所提基因组 DNA, 分别取 3 μg 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和核酸微量测量仪检测纯度及浓度。

1.4 磁珠吸附法提取基因组 DNA 分别取冻存的 *C. vexillum* 毒腺、肌肉和肝胰脏组织各 50 mg 液氮研磨成粉末状, 放入含有 400 μL MACL 缓冲液, 20 μL 蛋白酶 K 和 200 μL MCL 缓冲液的 1.5 mL 离心管中, 加入 20 μL 蛋白酶 K, 涡旋混匀后 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温浴约 1 h。于高速离心机中 $12\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 取上清液, 向其中加入 20 μL RNase ($10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液, 轻柔混匀, 室温静置 5 min。将 Buffer MA 和 MagicMag Beads 按照 100: 3 的比例充分混匀, 加 515 μL 至上步骤离心管中, 室温静置 2 min。将离心管放于磁力架上, 静置 1~2 min, 待磁珠完全吸附于磁力架一侧时, 轻柔吸弃上清液。取下离心管, 加入 700 μL 的 70% 无水乙醇, 轻柔吸打混匀, 将离心管置于磁力架上, 数分钟后取上清。重复上一步骤。开盖放入烘箱中, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, 静置 5~10 min。加入 100 μL TE, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 10 min, 期间轻柔混匀, 确保磁珠完全悬浮于 TE 溶液中。取出离心管放于磁力架上静置 1~2 min, 待磁珠完全吸附于磁力架一侧, 缓慢轻柔吸取上清, 获取基因组 DNA。所提基因组 DNA, 分别取 3 μg 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和核酸微量测量仪检测纯度及浓度。

1.5 水平电泳分离不同方法提取的基因组 DNA 选取纯度、产率最高, 片段较大的 CTAB 法及离心柱法提取的毒腺基因组 DNA, 各取 3 μg , 置于 1% 的水平琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 分别为电压 90 V, 30 min; 电压 35 V, 7 h。电泳结束后用凝胶成像系统拍照。

1.6 脉冲场电泳分离不同方法提取的基因组 DNA 同样用上述 2 种 DNA 各 5 μg 进行脉冲场电泳分离。电泳条件为: 1% 脉冲专用琼脂糖凝胶 ($0.5 \times \text{TBE}$); 电压梯度设置 $2\ 46\text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$; 脉冲角度 120; 脉冲转化时间 Int. Sw. Time = 0.47 s, Fin. Sw. Time = 3.36 s; 脉冲转换时间的变化系数为线性, 电泳 16 h。获知较好电压条件后, 选取不同脉冲转化时间 Int. Sw. Time = 4.7 s, Fin. Sw. Time = 33.6 s 进行电泳条件优化, 电泳时间 16 h 保持不变。

1.7 *C. vexillum* 基因组 DNA 不同大小片段分离制备 配制浓度为 1% 的低熔点琼脂糖凝胶, 分别取上述 2 种方法所提毒腺基因组 DNA 各 20 μg , 进行脉冲场电泳分离。脉冲场电泳 16 h。切取 Marker 条带, 用 4S Red Plus 核酸染色剂泡染凝胶, 观察 Marker 电泳情况并做标记。将含有目的 DNA 片段的凝胶割出, 切成细块后移入离心管中确认凝胶质量, 加入 1/10 凝胶体积的 $10 \times \beta\text{-Agarase Buffer}$ 。 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 再熔化 10 min, 随后迅速转移至 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴静置 5 min。加入 $\beta\text{-琼脂糖酶}(\beta\text{-Agarase})$ $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 消化反应 1 h, 每 100 mg (约 100 μL) 的 1% 凝胶中加入 2 U 的 $\beta\text{-Agarase}$ 。冰中放置 15 min 后, $12\ 000\text{ g}$ 离心 15 min。取上清, 加入 1/10 体积的 $0.3\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAc (pH7.2) 和等体积异丙醇, 充分混匀后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷却 20 min。 $12\ 000\text{ g}$ 离心 20 min。弃上清, 用 70% 的冷无水乙醇清洗沉淀 2 次, 空气干燥。加入 20 μL TE 缓冲液溶解 DNA。用脉冲场电泳检测回收 DNA 片段的完整性和大小。

2 结果与分析

2.1 不同方法提取 *C. vexillum* 不同组织器官的基因组 DNA 片段检测 用 3 种方法分别提取了 *C. vexillum* 毒腺、肌肉及肝胰脏 3 个不同组织器官, 即肌肉、毒腺和肝胰脏的基因组 DNA, 各取 3 μg 在 1% 的琼

脂糖凝胶电泳中检测其片段大小与完整性,结果如图 2 所示。图 2 中 1~3 泳道为 CTAB 法提取的基因组 DNA,4~6 泳道是离心柱法,7~9 泳道则为磁珠吸附法提取的 DNA。可以看出,肌肉与毒腺的 DNA 条带清晰不弥散,说明其完整性好,且没有降解。而用肝胰脏提取的基因组 DNA 主带不清晰,且弥散严重,其片段长度小于 23 kb,大多在 9 kb 附近,说明 DNA 降解严重。因此,在 3 种方法中,用毒腺和肌肉提取的基因组 DNA 质量较高,电泳条带集中粗亮。仔细比较发现,3 种方法中毒腺组织所提 DNA 比肌肉和肝胰脏的片段都要大,而肝胰脏的 DNA 片段小且质量最差。

2.2 不同方法提取的 *C. vexillum* 不同组织的基因组 DNA 纯度和产率比较 3 种方法提取的 3 种组织的基因组 DNA 纯度和产率如表 1 和图 3 所示。CTAB 法和离心柱法提取的 3 种组织基因组 DNA 纯度较高, A_{260}/A_{280} 比值接近 1.8,而磁珠吸附法获取的 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值在 2.0 左右,表明纯度较低,存在较多的 RNA 污染。在同种组织不同提取方法中作比较时(图 3),发现在肌肉与毒腺组织中,CTAB 法和磁珠法所获取的 DNA 产率相近,无明显差异,离心柱法产率最高,比另外两种方法高出近 1 倍,存在极显著差异($P < 0.001$)。但在肝胰脏中,情况则不同,离心柱法和磁珠法的 DNA 产率相近,CTAB 法产率最低,与其他两种方法对比存在极显著差异($P < 0.001$),分析原因,可能是肝胰脏组织柔软便于研磨,更易与磁珠颗粒结合。

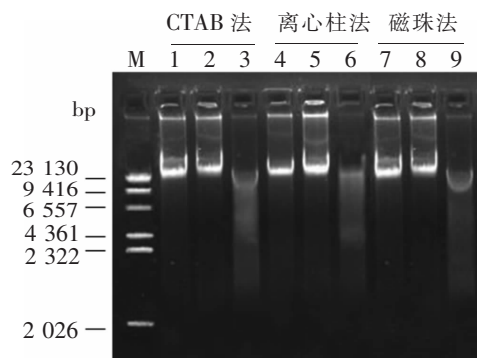


图 2 3 种方法提取的菖蒲芋螺不同组织基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

M: λ /Hind III DNA Marker; Lane 1, 4, 7: 肌肉 DNA; Lane 2, 5, 8: 毒腺 DNA; Lane 3, 6, 9: 肝胰脏 DNA;
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA of *C. vexillum* different tissues extracted by three methods
M: λ /Hind III DNA Marker; Lane 1, 4, 7: The muscle DNA; Lane 2, 5, 8: The venom gland DNA; Lane 3, 6, 9: The hepatopancreas DNA

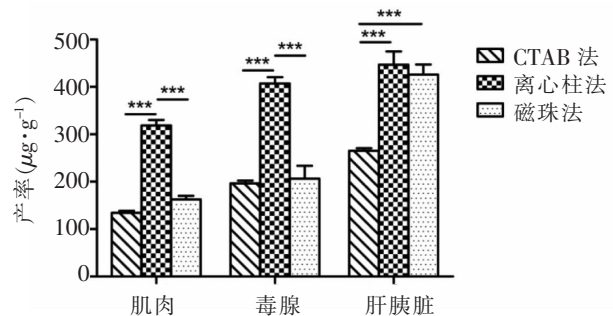


图 3 3 种提取方法所提取的不同组织基因组 DNA 的产率
产率=总产量/组织起始用量;***= $P < 0.001$

Fig.3 The yields of genomic DNAs of different tissues extracted by three extraction methods

Yield = Total DNA output / Tissue start weight; ***= $P < 0.001$

表 1 和图 3 结果表明,不管是哪种方法,在不同组织部位中,肝胰脏组织产率最高,其次是毒腺组织,肌肉产率最低。CTAB 法使用较大的起始材料用于基因组 DNA 的提取,可获得更多总量 DNA, DNA 产物浓度也最高,在肝胰脏组织中甚至高达 $883.6 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。磁珠法取量适中,所得基因组 DNA 的浓度最小,在肌肉中仅为 $81.4 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,但其产率居中。离心柱法所提基因组 DNA 的起始材料最少,浓度居中,但提取产率却最高。总的来说,三者各有优缺点。综上所述,肝胰脏组织虽产率最高,但片段断裂严重,毒腺 DNA 比肌肉 DNA 片段更大,且产率较高;离心柱法的产率最高,CTAB 法与磁珠吸附法产率相近,但 CTAB 法纯度更高,且成本较低。因而,后续实验选取片段大,产率及纯度最高的 CTAB 法以及离心柱法提取的毒腺 DNA 进行研究。

2.3 水平电泳分离优化法提取的基因组 DNA 效果 取 CTAB 法和离心柱法这两种方法提取的毒腺 DNA 各 $3 \mu\text{g}$,在不同的电压下进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析(图 4)。在高电压 90 V 条件下,电泳 30 min 的结果如图 4 A 所示。2 种方法提取的 DNA 均为 1 条较为集中的亮带,基本无弥散现象,且集中在 23 kb 左右。在低电压 35 V 条件下,将 2 种 DNA 样品各 $3 \mu\text{g}$ 进行 7 h 长时间电泳,其结果如图 3 B 所示。高电压 90 V, 30 min 短时间电泳结果与低电压 35 V, 7 h 长时间电泳的分离效果相似,但 CTAB 法提取的毒

腺 DNA 略比离心柱法的位置偏上 ,说明 CTAB 法所提 DNA 片段比离心柱法略大 ,但其大小片段都不能彼此分开。因此 ,普通水平凝胶电泳对 2 种方法提取的基因组 DNA 不能达到不同大小片段的分离效果。

表 1 3 种提取方法提取的不同组织基因组 DNA 的纯度及其产量

Tab. 1 The purities and yields of genomic DNA of different tissues extracted by three extraction methods					
组织	提取方法	组织用量 /mg	A_{260}/A_{280}	浓度 /($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	总产量 / μg
肌肉	CTAB 法	100	1.84	447.8	13.4
	离心柱法	30	1.86	233.8	9.4
	磁珠法	50	2.12	81.4	8.1
毒腺	CTAB 法	100	1.88	654.7	19.6
	离心柱法	30	1.86	305.5	12.2
	磁珠法	50	2.01	103.2	10.3
肝胰脏	CTAB 法	100	1.88	883.6	26.5
	离心柱法	30	1.82	335.1	13.4
	磁珠法	50	1.93	213.1	21.3

注: A_{260}/A_{280} 浓度和总产量均为 3 次测量的均值 ,总产量 = 浓度($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $\times$ 体积(μL)
Note: The A_{260}/A_{280} concentration and total output is an average of three measured values. Total output = Concentration ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $\times$ Volume (μL)

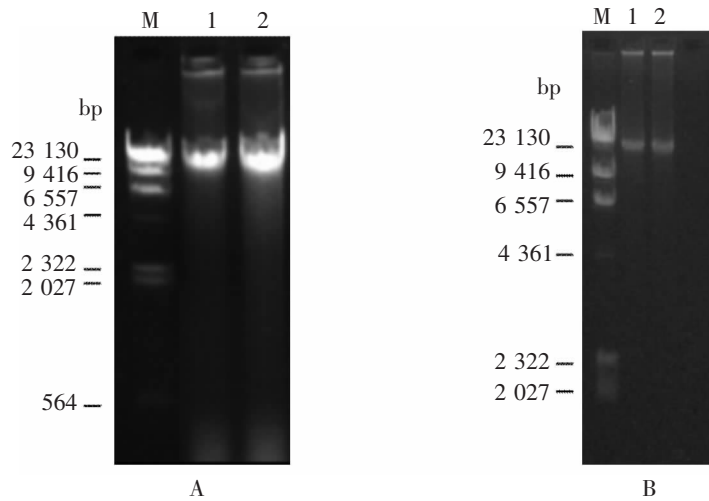


图 4 2 种方法提取的基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图

(A)电压 90 V;(B)电压 35 V;M; λ /*Hind* III DNA Marker;Lane 1:CTAB 法抽提的毒腺基因组 DNA;Lane 2:离心柱法提取的毒腺基因组 DNA
Fig.4 Agarose gel electrophoresis of genome DNA by two extraction methods
(A) Voltage 90 V;(B) Voltage 35 V;M; λ /*Hind* III DNA Marker;Lane 1:The genomic DNA of venom glands extracted by CTAB method;Lane 2:The genomic DNA of venom glands extracted by spin column method

2.4 脉冲场电泳分离优化法提取的基因组 DNA 效果 分别取 CTAB 法和离心柱法 2 种方法所提的毒腺基因组 DNA 各 3 μg 在不同的电压与脉冲转化时间条件下进行脉冲场电泳分离(图 5)。结果表明 ,在 2 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ (图 5 A) 4 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ (图 5 B)和 6 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ (图 5 C) 3 种分离电压条件下 ,采用 6 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的分离电压 ,DNA 片段分离效果最好 ,不同大小的 DNA 片段分离明显清晰 ,分布均匀(图 5 C)。2 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 和 4 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的分离条件下(图 5 A ,B) 基因组 DNA 片段主要聚集在 23 kb 附近 ,分离效果不好。4 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的电压条件下分离效果比 2 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 要好 ,但并未达到完全分离状态。因此 6 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 为优化后最佳分离电压。之后固定电压 ,对脉冲场电泳转化时间进行优化。分别采用了 Int. Sw. Time = 0.47 s 4.7 s ; Fin. Sw. Time = 3.36 s 和 33.6 s 2 个不同的脉冲转化时间(图 5 C ,D) 进行电泳分析。结果表明 ,当脉冲转化

时间为 Int. Sw. Time = 0.47 s, Fin. Sw. Time = 3.36 s 的情况下分离效果最好, Marker 条带清晰, 不同大小的 DNA 片段被均匀分离(图 5 C)。然而, 若将脉冲转化时间扩大 10 倍(图 5 D), 观察到 Marker 和目的 DNA 片段条带模糊, 且部分条带已跑出胶面。由此可知, 脉冲电泳分离菟蒲芋螺基因组 DNA 不同大小片段的优化条件为: 电压 6 V/cm, 脉冲转化时间: Int. Sw. Time = 0.47 s, Fin. Sw. Time = 3.36 s。CTAB 法获取的 DNA 片段大小要比离心柱法更大, 这与图 2 和图 4 的结果一致。

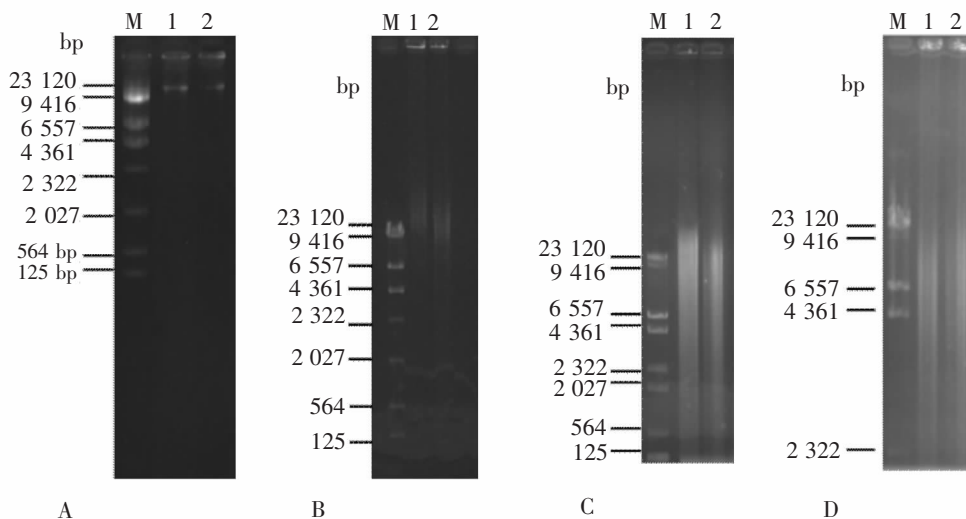


图 5 CTAB 法和离心柱法提取的的基因组 DNA 在不同条件下的脉冲场凝胶电泳图

A. 电压: $2 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, 脉冲转化时间: Int.Sw.Time=0.47 s, Fin.Sw.Time=3.36 s; B. 电压: 4 V/cm , 脉冲转化时间: Int.Sw.Time=0.47 s, Fin.Sw.Time=3.36 s; C. 电压: $6 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, 脉冲转化时间: Int.Sw.Time=0.47 s, Fin.Sw.Time=3.36 s; D. 电压: $6 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, 脉冲转化时间: Int.Sw.Time=4.7 s, Fin.Sw.Time=33.6 s; M: λ /Hind III DNA Marker; Lane 1: CTAB 法抽提的毒腺基因组 DNA; Lane 2: 离心柱法提取的毒腺基因组 DNA

Fig.5 Pulsed field gel electrophoresis of genome DNA by CTAB and spin column extraction methods under different conditions

A. voltage: $2 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, pulse conversion time: Int.Sw. Time = 0.47 s, Fin.Sw. Time = 3.36 s; B. voltage: $4 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, pulse conversion time: Int.Sw. Time = 0.47 s, Fin.Sw. Time = 3.36 s; C. voltage: $6 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, pulse conversion time: Int. Sw. Time = 0.47 s, Fin.Sw. Time = 3.36 s; D. voltage: $6 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, pulse conversion time: Int.Sw. Time = 4.7 s, Fin.Sw. Time = 33.6 s; M: λ /Hind III DNA Marker, Lane 1: The genomic DNA of venom glands extracted by CTAB method; Lane 2: The genomic DNA of venom glands extracted by spin column method

2.5 基因组 DNA 不同大小片段的回收制备 根据 λ /Hind III DNA Marker 的条带位置, 切取不同相对分子质量区域的基因组 DNA 片段进行回收纯化(表 2 3; 图 6 7)。脉冲场片段回收电泳所用的, CTAB 法和离心柱法提取的基因组 DNA 起始总量均为 20 μg 。分别设置了 4 个大小不同的片段区间, 分别是 A 9 ~ 23 kb; B 6 ~ 9 kb; C 2 ~ 6 kb; D 0.01 ~ 0.05 kb。对这 4 个区间的 DNA 片段分别进行回收和纯化。回收后不同大小的 DNA 片段各取 10 μL 利用上述优化条件, 进行 1% 脉冲场凝胶电泳分析。结果(图 6)表明, CTAB 法和离心柱法提取的基因组 DNA 的片段大小组成是有差异的。在大片段 A 区间(图 6 的第 1, 2 泳道), 条带 1 明显比条带 2 要亮, 即是用 CTAB 法回收制备的片段库 DNA 含量, 明显高于离心柱法回收制备的 DNA 片段库。在较大片段 B 区间(图 6 的第 3 4 泳道), 条带 3 4 都很明亮, 说明用 CTAB 法和离心柱法回收制备的 B 片段库 DNA 含量都很高, 两者相差不明显。同样条带 5 6 之间, 条带 7 8 之间的电泳条带的亮度差异也不明显, 但仅凭电泳图无法判断它们之间的 DNA 含量差异。图 6 结果表明, CTAB 法提取的 DNA 样品相对分子质量更大, 9 kb 以上的大片段含量远比离心柱法提取的 DNA 样品要高。2 种方法提取的 DNA 在 6 ~ 9 kb 的含量都很高, 在 2 ~ 6 kb 的含量次之, 0.01 ~ 0.05 kb 的小片段含量最少。因而, 适宜条件下的脉冲场电泳是分离制备不同大小 DNA 片段的有效方法, 可获得所需要大小的目的 DNA 片段库。

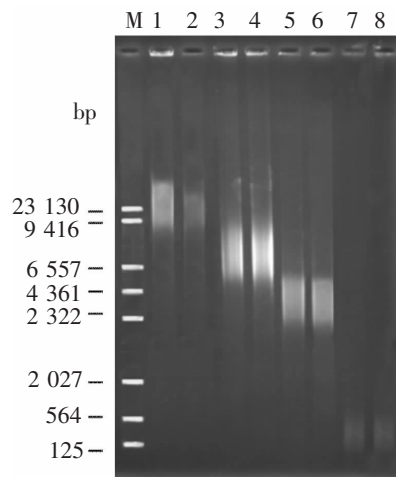


图6 CTAB法和离心柱法制备的DNA不同大小片段回收产物

M: λ /Hind III DNA Marker; Lane 1, 3, 5, 7: CTAB法提取基因组DNA的回收片段; Lane 2, 4, 6, 8: 离心柱法提取基因组DNA的回收片段

Fig.6 The different recovery fragment of genomic DNA extracted by CTAB and Spin column methods

M: λ /Hind III DNA Marker; Lane 1, 3, 5, 7: The recovery fragment of genomic DNA extracted by CTAB method; Lane 2, 4, 6, 8: The recovery fragment of genomic DNA extracted by spin column method.

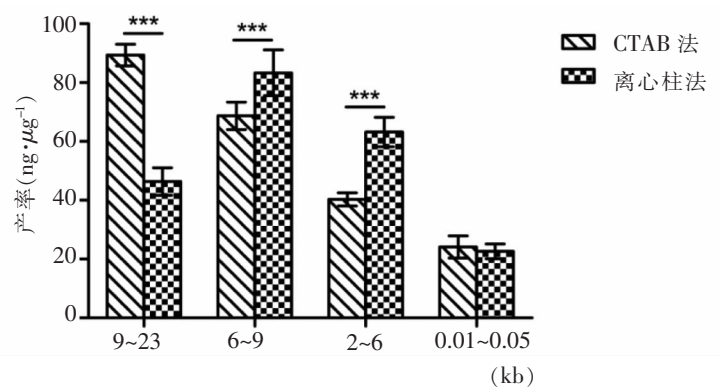


图7 CTAB法和离心柱法回收制备的不同大小区间基因组DNA的回收产率比较

胶回收起始总量为 20 μ g, 产率=各片段回收量/回收起始总量, *** $P < 0.001$

Fig. 7 The yields of different size fragments of DNAs extracted by CTAB and spin column methods

Total amount of gel recovery start-up genome DNA was 20 μ g, Yield = recovery amount of each fragment range/ total start DNA amount, *** $P < 0.001$

图7是用CTAB法和离心柱法回收制备的、不同大小区间的基因组DNA产率。结果表明,除特小片段D(0.01~0.05 kb)外,其余区段的回收产率之间均存在极显著性差异($P < 0.001$)。在片段区间A中,CTAB法的产率远高于离心柱法,而在片段区间B、C中情况则相反。对于不同区段DNA含量所占比率来说(表2),CTAB法中大片段A(9~23 kb)占比率为40.1%,比离心柱法高近1倍,而其他片段区间,存在一些差异,但并无片段区间A明显。究其原因,主要是CTAB与离心柱两种方法所提DNA的片段大小组成不同引起的。这更进一步说明了CTAB法所获DNA样品的完整性更好,离心柱法所获DNA样品断裂严重,以中小DNA片段为主。

表2 CTAB法提取的基因组DNA不同大小回收片段的质量检测

Tab. 2 Quality analysis of recovered different size fragments of the genomic DNA extracted by CTAB method

不同大小DNA片段分区/kb	A_{260}/A_{280}	浓度/($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	回收产量/ μg	不同区段DNA含量占比/%
A: 9~23	1.91	89.3	1.78	40.1
B: 6~9	1.90	68.7	1.37	31.1
C: 2~6	1.87	40.3	0.81	18.4
D: 0.01~0.05	1.89	24.1	0.48	10.9

注: 胶回收起始总量为 20 μ g, 回收总产量为 4.44 μ g, 不同区段DNA含量占比 = 各片段回收产量/回收总产量

Note: Total amount of gel recovery start-up genome DNA was 20 μ g, the total yield of recovered DNA was 4.44 μ g, DNA ratio of different size fragments = recovery of each fragment range/ total yield of recovered DNA

对胶回收产物进行分光光度计检测,结果见表2。2种方法胶回收产物的 A_{260}/A_{280} 比值均在1.8~1.9之间,证明回收产物的纯度高。在脉冲场电泳的起始DNA均为20 μ g的情况下,2种方法胶回收产物的总量差异不大,CTAB法的回收总产量为4.44 μ g;离心柱法的回收总产量为4.31 μ g。分别计算各个区段DNA占回收总量的百分比(表2)。结果表明,CTAB法的片段回收产物中,大片段A区间(9~23 kb)的回收产量最高,其次为中片段B(6~9 kb),小片段6 kb以下的回收产量较低(表2)。离心柱法的片段回

收产物中各个区间的回收率情况则很不相同(表3),其中较大片段B(6~9 kb)的回收产量最高,其次为较小片段C(2~6 kb),而大片段A(9~23 kb)的回收产量则较低。对于特小片段D(0.01~0.05 kb)的回收产量,CTAB与离心柱法均处于最低位置,两者并无明显差异。

表3 离心柱法提取的基因组DNA不同大小回收片段的质量检测

Tab. 3 Quality analysis of recovered different size fragments of the genomic DNA extracted by spin column method

不同大小 DNA 片段 分区/kb	A_{260}/A_{280}	浓度/($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	回收产量/ μg	不同区段 DNA 含量占比/%
A: 9~23	1.88	46.4	0.93	21.6
B: 6~9	1.92	83.3	1.67	38.7
C: 2~6	1.86	63.2	1.26	29.2
D: 0.01~0.05	1.83	22.6	0.45	10.4

注:胶回收起始总量为20 μg ,回收总产量为4.31 μg ,不同区段DNA含量占比=各片段回收产量/回收总产量

Note: Total amount of gel recovery start-up genome DNA was 20 μg , the total yield of recovered DNA was 4.31 μg , DNA ratio of different size fragments = recovery of each fragment range / total yield of recovered DNA

3 讨论

近年来,由于大量海域受到污染,芋螺资源日渐稀少,建立芋螺基因资源库成为保护和可持续利用芋螺毒素药物资源的重要任务。迄今为止,国内外已经有多种芋螺的毒管cDNA文库构建成功,本实验室采用SMART技术构建出桶形芋螺、疣缟芋螺等的噬菌体文库^[15-16];李海鹰等利用Gateway技术成功构建玉女芋螺、堂皇芋螺等4种芋螺的cDNA文库^[17];Biggs JS等人构建织锦芋螺(*couns testile*)、幻芋螺(*couns magus*)、信号芋螺(*conus litteratus*)等几种芋螺的cDNA文库,并通过对转录本分析发现了大量新的芋螺毒素序列^[18-19]。但由于芋螺cDNA文库受发育阶段、地理分布和食物变化等多种因素的影响,加之很多毒素基因并不能同时表达,因而芋螺cDNA文库只能保存其中很少一部分芋螺毒素的序列信息。为此,构建各种芋螺种类的基因组文库将是保存和利用芋螺毒素药物资源行之有效的办法。

目前,BAC文库已经成为近几年应用最广泛的大片段基因组文库,黄胜等成功构建了链霉菌的BAC大片段文库^[20]。对于较小片段文库的构建,国内外已经有越来越多研究者利用fosmid载体成功构建了多个文库,如:构建玉米、棉花等植物的fosmid文库^[21-22],在动物方面构建了尼罗罗非鱼、半滑舌鳎雌鱼、栉孔扇贝等的fosmid文库,其中同样采用了脉冲场电泳技术回收目的片段,以完成载体的连接^[23-25]。更小片段文库中有草菇、巴西橡胶树等植物,通过酶切片段连接EMBL3载体达到构建基因组文库^[26-27]。但鲜见芋螺基因组文库构建的报道,有关芋螺基因组大片段的分离制备方法也鲜见报道。

要构建芋螺优质基因组文库,获得理想大小的芋螺基因组DNA片段,是至关重要的第一步。笔者选用了3种不同提取方法对萼蒲芋螺不同组织部位(毒腺、肌肉和肝胰脏)进行基因组DNA的提取,通过方法比较和优化,获得了高质量的DNA后,利用脉冲场电泳技术,对海南产萼蒲芋螺不同大小基因组DNA片段,成功地进行了分离制备,并对其方法步骤进行了优化。结果表明,3种组织中除肝胰脏外,其余组织提取的基因组DNA条带都很清晰,且无弥散现象。采用离心柱法提取的基因组DNA比CTAB法和磁珠法产率都高,纯度也最高。磁珠法得到的基因组DNA产率居中,但纯度不高,且成本较高。CTAB法在提取基因组大片段DNA时更有效,且纯度也高,产率与磁珠法相近,成本最低。

由于离心柱法是通过滤膜吸附的方法收集DNA,所以纯度和产率会更高,但又正是因为滤膜会过滤掉片段较大的DNA,使之产生断裂,导致产物片段集中在23 kb以下;CTAB法和磁珠法提取DNA的过程中不会产生太多机械剪切,只要保证操作轻柔,就可得到片段较大的DNA产物,但CTAB法步骤繁琐,操作过程中难免丢失一部分DNA,而磁珠法利用磁珠吸附DNA,可能会存在一些DNA由于吸附强度不够而流失掉,导致这两种方法获取的基因组DNA产率不如离心柱法高。毒腺含组织液较多,比较容易研磨,帮助了DNA从蛋白质中释放。而肌肉密度较大,会有少量颗粒状组织不能充分研磨成粉末,阻碍了蛋白

质的溶解。肝胰脏最易研磨,故产率最高,但由于组织过于柔软,在芋螺冻存过程中可能会导致其中的 DNA 片段发生降解。本研究结果与方法对于获取高质量芋螺基因组 DNA 具有指导意义。

在莒蒲芋螺基因组 DNA 不同大小片段的分离纯化中,通过变换脉冲电压和转换时间可以达到有效分离不同大小片段的目。与水平电泳相比,脉冲场电泳技术在分离不同大小基因组片段方面,占有更大优势。另外,在不同大小片段回收中,CTAB 法与离心柱法相比,CTAB 法适合更大目的片段的回收,而离心柱法在较小 DNA 片段回收中效率更好。因此,根据不同文库和载体对基因组 DNA 片段大小的需求,可以选择不同的提取方法。该方法对利用脉冲场电泳制备芋螺毒素基因组 DNA 不同大小级别的片段具有重要意义,并为莒蒲芋螺基因组文库的构建奠定了基础。

参考文献:

- [1] Terlau H, Olivera B M. Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides [J]. *Physiological Reviews*, 2004, 84 (1): 41–68.
- [2] Kohn A J. The Ecology of Conus in Hawaii [J]. *Ecological Monographs*, 1959, 29 (1): 47–90.
- [3] Hillyard D R, Olivera B M, Woodward S, et al. A molluskivorous Conus toxin: conserved frameworks in conotoxins [J]. *Biochemistry*, 1989, 28 (1): 358–361.
- [4] Kaas Q, Yu R, Jin A H, et al. ConoServer: updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 40: 325–330.
- [5] Schroeder C I, Craik D J. Therapeutic potential of conopeptides [J]. *Future Medicinal Chemistry*, 2012, 4 (10): 1243–1255.
- [6] Espiritu D J D, Watkins M, Dia-Monje V, et al. Venomous cone snails: molecular phylogeny and the generation of toxin diversity [J]. *Toxicon Official Journal of the International Society on Toxinology*, 2001, 39 (12): 1899–1916.
- [7] Bingham J P, Mitsunaga E, Bergeron Z L. Drugs from slugs-past, present and future perspectives of omega-conotoxin research [J]. *Chemico-biological interactions*, 2010, 183 (1): 1–18.
- [8] PhD Hgkm, Frca Khsm, Paolo Marchettini M D, et al. Intrathecal Therapy: What Has Changed With the Introduction of Ziconotide [J]. *Pain Practice*, 2009, 9 (5): 338–347.
- [9] Thapa P, Espiritu M J, Cabaltega C C, et al. Conotoxins and their regulatory considerations [J]. *Regulatory Toxicology & Pharmacology Rtp*, 2014, 70 (1): 197–202.
- [10] Olivera B M, Teichert R W. Diversity of the neurotoxic Conus peptides: a model for concerted pharmacological discovery [J]. *Molecular Interventions*, 2007, 7 (5): 251–260.
- [11] Davis J, Jones A, Lewis R J. Remarkable inter-and intra-species complexity of conotoxins revealed by LC/MS [J]. *Peptides*, 2009, 30 (7): 1222–1227.
- [12] Lavergne V, Harliwong I, Jones A, et al. Optimized deep-targeted proteotranscriptomic profiling reveals unexplored Conus toxin diversity and novel cysteine frameworks [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112 (29): 3782–3791.
- [13] 姜敬哲, 张彬彬, 张远, 等. 杂色鲍 Fosmid 基因组文库构建与血蓝蛋白基因筛选 [J]. *华南农业大学学报*, 2012, 33 (2): 192–196.
- [14] 王美玲, 吴茜茜, 蔡敬民. 基因组文库的研究进展 [J]. *生物学杂志*, 2013, 30 (4): 71–74.
- [15] 冯建成, 长孙东亭, 陈琴, 等. 海南产桶形芋螺毒管 cDNA 文库构建 [J]. *中国海洋药物*, 2009, 28 (3): 1–6.
- [16] 李宝珠, 高炳森, 吴勇, 等. 利用 SMART 技术构建疣编芋螺毒管 cDNA 噬菌体文库及芋螺毒素新基因的克隆 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 28 (5): 484–488.
- [17] 李海鹰. 芋螺毒素 cDNA 文库的建立及转录组学的研究 [D]. 河北: 河北大学, 2011.
- [18] Biggs J S, Olivera B M, Kantor Y I. Alpha-conopeptides specifically expressed in the salivary gland of *Conus pulicarius* [J]. *Toxicon*, 2008, 52 (1): 101–105.
- [19] Wang L, Pi C, Liu J, et al. Identification and characterization of a novel O-superfamily conotoxin from *Conus litteratus* [J]. *Journal of Peptide Science*, 2008, 14 (10): 1077–1083.
- [20] 黄胜, 李娜, 周俊, 等. 适用于链霉菌大片段基因组 DNA 克隆和异源表达的细菌人工染色体 (BAC) 载体的构建及应用 [J]. *微生物学报*, 2012, 52 (1): 30–37.
- [21] Liu C, Liu X, Lei L, et al. Fosmid library construction and screening for the maize mutant gene Vestigial glume 1 [J]. *The*

- Crop Journal , 2016 , 4 (1) : 55 – 60.
- [22] Li S , Liu G , Chen Z , et al. Construction and initial analysis of five Fosmid libraries of mitochondrial genomes of cotton (*Gossypium*) [J]. Chinese Science Bulletin , 2013 , 58 (36) : 4608 – 4615.
- [23] 李明辉 吴风瑞 熊传奇 等. 尼罗罗非鱼微阵列 Fosmid 基因组文库的构建及基因筛选 [J]. 水产学报 , 2011 , 35 (1) : 27 – 34.
- [24] 孙晓华 张全启 王旭波 等. 半滑舌鳎雌鱼基因组 Fosmid 文库构建及分析 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版) , 2010 , 40 (8) : 88 – 92.
- [25] Zhang L , Bao Z , Cheng J , et al. Fosmid library construction and initial analysis of end sequences in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) [J]. Marine biotechnology , 2007 , 9 (5) : 606 – 612.
- [26] 李南羿. 草菇基因组基因文库的构建 [D]. 河南: 河南农业大学 , 2000.
- [27] 张桂和 徐碧玉 金志强 等. 巴西橡胶树基因组文库的构建 [J]. 科学技术与工程 , 2002 , 2 (6) : 40 – 43.

Separation and Preparation of Different Size Genomic DNA Fragments of *Conus Vexillum*

DING Qing^{1,2} , LIU Yuepeng^{1,2} , ZHU Xiaopeng¹ , WU Kebang² , LUO Sulan¹ , ZHANGSUN Dongting¹

(1. Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education , Key Laboratory for Marine Drug of Haikou , Hainan University , Haikou 570228 , China; 2. College of Tropical Agriculture and Forestry , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: In order to provide basis for construction of the genomic library of *Conus vexillum* (*C. vexillum*) , different methods were used for isolation and extraction of different size fragments of genomic DNA from *C. vexillum* native to Hainan. Genomic DNA was isolated from venom glands , hepatopancreas and muscle of *C. vexillum* using three methods of CTAB , spin column and magnetic bead respectively. The genomic DNA fragments were separated by agarose gel electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis , of which the size and distribution range of extracted DNA was detected. The results showed that the genomic DNA could be extracted by all the three methods. The purity and yield of DNAs isolated by CTAB and centrifugal column methods using venom gland of *C. vexillum* were good and high , which could meet the following experimental requirements. While the yield of the magnetic bead method is less and the purity is not good. The length of most DNA fragments isolated by the centrifugal column method was less than 9 kb , while most fragments' sizes isolated by CTAB method were more than 20 kb. Among the three kinds of organs , hepatopancreas had highest yield of DNA , but its fragment was dispersed with degradation happened , the DNA yield of venom glands was high but less than hepatopancreas slightly , its integrity was the best; however the DNA yield of muscle was lowest and its fragments was smaller. The high quality genomic DNA fragments with different sizes were separated and prepared successfully by optimized pulsed-field gel electrophoresis. In conclusion , using CTAB method to isolate *C. vexillum* DNA is better than the other methods for big fragment genomic DNA library construction. Different size genomic DNA fragments recovered by pulsed-field gel electrophoresis would lay a foundation for further genomic library construction of *C. vexillum* using different gene library vector systems.

Keywords: *Conus vexillum* native to Hainan; Genomic DNA extraction method; Different size fragments of genomic DNA; Isolation and preparation; Pulsed field electrophoresis