

文章编号: 1674-7054(2020)02-0238-07

信号芋螺基因组 DNA 提取方法的优化

陈婉姨, 李新佳, 罗素兰, 长孙东亭

(海南大学 热带生物资源教育部重点实验室/生命科学与药学院/海口市海洋药物重点实验室, 海口 570228)

摘要: 高质量的基因组 DNA 的获取是芋螺毒素基因克隆及基因组文库构建的关键。笔者采用 4 种方法提取信号芋螺(*Conus litteratus*) 的不同组织器官的 DNA, 并综合比较了各组 DNA 的浓度和纯度、DNA 片段的大小和完整性。结果表明, 由改良的 DNA 快速提取试剂盒法提取的 DNA 纯度和浓度较好; 4 种组织器官中, 腹足纯度较高, 是更合适的提取组织; 肝胰脏和毒管获取的 DNA 产率最高, 但片段完整性差, 污染严重; PCR 反应获得了跟预期大小一致的特异扩增产物。因此, 信号芋螺基因组 DNA 的提取最佳方法为改良的 DNA 快速提取试剂盒法, 提取部位为腹足组织, 可以获得高质量的基因组 DNA, 且符合后续实验要求。

关键词: 信号芋螺; 基因组 DNA; 提取方法; 优化

中图分类号: Q 178.53; Q 523

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2020.00.015

芋螺 (*Conus*) 是分布于热带海洋中的肉食性软体动物, 全世界约有 800 种^[1]。不同种类的芋螺都能通过分泌各自特有的肽类毒素(芋螺毒素、芋螺肽)捕食鱼类、虫类或其他软体动物。根据芋螺的食性, 分为食鱼芋螺, 食虫芋螺和食螺芋螺 3 大类^[2]。芋螺的毒液是由长而卷曲的毒管上皮细胞分泌产生的。当芋螺捕食猎物时, 毒腺的肌肉蠕动, 推动毒液进入鱼叉状的舌状牙齿中, 将毒液快速注射入猎物体内^[3-6]。研究发现, 每种芋螺毒液中含有约 3 000 种不同的芋螺毒素肽。在蓼托芋螺(*Conus episcopatus*) 的 1 个个体毒液中, 竟发现了 3 305 个前体毒素基因序列^[7]。由此预估全球芋螺可产生超过 150 万种的天然毒素肽, 它们具有调节各种离子通道和受体等的特殊功能^[8], 已成为神经科学研究工具药和治疗新药研发的重要来源^[9]。然而迄今为止, 发现的芋螺毒素还不足其总量的 1%, 因而大量的新型芋螺毒素尚有待进一步开发。目前, 获取芋螺毒素序列的方法主要有 4 种, 包括粗毒液纯化^[10]、芋螺毒素基因克隆^[11]、毒管转录组测序^[7, 12]、毒液蛋白质组学和多组学联用测序分析^[13-14]。多组学是一种通过生物信息学将转录组学与蛋白质组学整合的综合策略^[15], 在芋螺毒素研究领域很受欢迎。芋螺毒素的研究需要持续不断地捕捞活体芋螺, 但由于气候变暖, 芋螺赖以生存的海洋环境也越来越恶化, 再加上芋螺壳工艺品国际贸易的兴起, 造成了芋螺资源的严重破坏, 70% 以上的芋螺遭遇生存危机。所以人们更应重视芋螺资源的保护和可持续利用, 例如可建立不同芋螺种类的基因组 DNA 文库、毒管 cDNA 文库以及毒素肽库, 长期保存并加以利用。粗毒纯化需要大量的芋螺, 且只能发现一些表达量较高的毒素, 为克服粗毒纯化的局限性, 20 世纪 90 年代, 基因克隆为新型芋螺毒素的发现提供了极大的帮助^[11]。由于芋螺毒素是由特定的前体基因表达的, 所以可以用特定的引物通过 PCR 技术进行扩增^[16-20]。因而, 简单快速地获取高质量的芋螺基因组 DNA 是关键。有关海南产信号芋螺基因组 DNA 的提取方法优化的研究目前尚未见报道, 为此, 笔者拟从信号芋螺(*Conus litteratus*) 的不同组织器官中, 选取 4 种试剂盒, 分别提取其基因组 DNA, 然后比较各种提法的效果, 并对其中的优选试剂盒的提取条件进行优化, 旨在建立简便快速提取信

收稿日期: 2020-02-26

修回日期: 2020-03-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(41966003, 81872794); 高等学校学科创新引智计划项目(D20010)

第一作者: 陈婉姨(1993-), 女, 海南大学生命科学与药学院 2017 级硕士研究生. E-mail: chenwanyi2018@163.com

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

号芋螺基因组 DNA 的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 信号芋螺(*Conus litteratus*) 活体采自中国南海海域(N15°46'~17°08', E111°11'~112°54'), 于-80℃超低温冰箱保存(图1A), 将冷冻的信号芋螺置于冰上30 min, 待微解冻后破壳, 解剖, 分别取出毒腺、毒管、腹足以及肝胰脏(图1B) 4种组织待用。

磁珠法动物基因组 DNA 抽提试剂盒(B518721) 和改良的 DNA 快速提取试剂盒(B518221) 均购于

上海生工公司; FastPure Tissue DNA 提取试剂盒(DC102) 购于诺唯赞公司; 海洋动物组织 DNA 提取试剂盒(DP324) 购于天根公司。2×Taq PCR Master Mix(天根生化科技有限公司); 4S Red Plus 核酸染色剂(生工生物工程有限公司); 琼脂糖、6×Loading Buffer, 10×Loading Buffer(北京索莱宝科技有限公司); DL15000 DNAMarker, DL5000 DNAMarker(南京诺唯赞公司)。

1.2 实验仪器 所用仪器(品牌)主要有: 琼脂糖水平电泳仪(Bio-Rad), 高速冷冻离心机(HITACHI), PCR 扩增仪(Eppendorf Mastercycler X50), 低温循环水浴锅(Polyscience), 凝胶成像系统(Protein-Simple), NanoDrop 2000 超微量分光光度计(Thermo) 等。

1.3 磁珠法动物基因组 DNA 抽提试剂盒法 称取毒腺 20 mg、毒管 10 mg、腹足 20 mg 及肝胰脏 10 mg, 冰上剪碎, 分别置于研钵中用液氮研磨成粉末, 加入 1.5 mL 的离心管中, 然后向离心管中加入 200 μL Buffer MCL, 400 μL Buffer MACL 和 20 μL Proteinase K(PK), 上下颠倒混匀, 稍离心, 65℃水浴 30~40 min。期间, 多次颠倒混匀, 待溶液基本澄清, 取出离心管, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5~10 min, 小心吸取上清液 500 μL 至新的 1.5 mL 的离心管中; 加入 20 μL RNase (10 g·L⁻¹) 溶液, 混匀, 室温放置 5 min。加入 500 μL Buffer MA 和 15 μL MagicMag Beads(MMB), MMB 加到液面以下, 且尽量将枪头上残留的 MMB 吸干净, 混匀, 室温静置 1 min。将离心管置于磁力架上 30 s, 待 MMB 完全吸壁后, 吸弃上清, 取下离心管; 加 700 μL 70% 乙醇, 颠倒混匀, 置于磁力架上 30 s, 吸弃上清, 重复 1 次。室温开盖干燥或者 55℃恒温箱开盖干燥至管内无液体; 向离心管中加入 50 μL TE Buffer(pH8.0), 65℃水浴 5~10 min, 混匀; 取出离心管置于磁力架上 30 s, 小心吸取上清至新的离心管, 即得基因组 DNA。

1.4 改良的 DNA 快速提取试剂盒法 组织处理如 1.3, 加入 400 μL buffer Digestion 和 20 μL PK, 振荡混匀; 65℃水浴 1 h 至溶液变澄清透明, 否则可适当延长裂解时间; 水浴后加入 20 μL RNase(10 g·L⁻¹) 溶液, 颠倒混匀, 室温放置 5 min; 加入 200 μL Buffer PA, 充分颠倒混匀, 置于 20℃冰箱 5 min 后室温 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 吸取 500 μL 上清液到新的离心管中(若上清液浑浊, 可加等体积的氯仿混匀, 12 000 r·min⁻¹ 离心取上清); 加入等体积的异丙醇, 充分颠倒混匀, 于-20℃放置 20 min, 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清; 用 1 mL 75% 乙醇漂洗 2 min, 10 000 r·min⁻¹ 离心 2 min, 取上清, 重复 1 次, 漂洗时一定要使沉淀悬浮起来; 开盖室温倒置至残留乙醇完全挥发, 肉眼可见 DNA 沉淀变成半透明状, 离心管内无乙醇味道即可; 干燥完成后用 50 μL TE Buffer(pH8.0) 溶解即得 DNA。

1.5 FastPure Tissue DNA 提取试剂盒法 组织处理如 1.3, 加入 230 μL Buffer GA 和 20 μL PK, 涡旋混匀, 55℃水浴至组织完全酶解; 加入 20 μL RNase (10 g·L⁻¹) 溶液, 颠倒混匀, 室温放置 5 min; 若消化液比较浑浊或存在明显的颗粒, 则 10 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 转移上清液至新的离心管中; 加入 250 μL Buffer GB, 充分涡旋混匀, 70℃水浴 10 min; 加入 250 μL 无水乙醇, 涡旋混匀; 将 gDNA Columns 吸附柱置于收集管中; 将上步所得的混合液转移到吸附柱中, 10 000 r·min⁻¹ 离心 1 min; 弃滤液, 用 500 μL

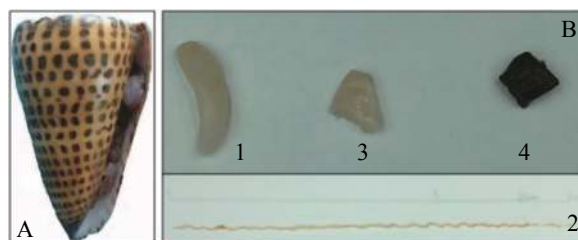


图1 信号芋螺及其不同组织

A: 信号芋螺; B: (1)毒腺, (2)毒管, (3)腹足, (4)肝胰脏。

Fig. 1 *Conus litteratus* and the tissues of their different organs

A: *Conus litteratus*; B: (1) venom gland, (2) venom duct, (3) muscular foot, and (4) hepatopancreas.

Washing Buffer A 洗涤 1 次, $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min, $650\text{ }\mu\text{L}$ Washing Buffer B 洗涤 2 次, 弃滤液, 空管离心 2 min; 将吸附柱置于新的 1.5 mL 离心管中, 加 $50\text{ }\mu\text{L}$ 预热至 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 Elution Buffer 至吸附柱的膜中央, 室温放置 3 min, $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min; 弃掉吸附柱, 离心管中即为 DNA。

1.6 海洋动物组织 DNA 提取试剂盒法 组织处理如 1.3, 加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ GA 涡旋振荡 15 s; 加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ RNase ($10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 混匀, 放置 5 min。加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ PK, 涡旋混匀, 简短离心以去除管盖内壁的水珠; $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 待溶液变澄清透明后加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 缓冲液 GB, 充分颠倒混匀, 会产生一些白色沉淀, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min, 溶液变清亮; 加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 无水乙醇, 充分颠倒混匀, 此时可能出现絮状沉淀; 将吸附柱 CB3 放入收集管中, 将上步所得溶液和沉淀都加入吸附柱中, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 s, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中; 加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 缓冲液 GD, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 s, 弃废液; 再用 $600\text{ }\mu\text{L}$ 漂洗液 PW 漂洗 2 次, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 s, 弃废液, 将吸附柱放入收集管中, 空管离心 2 min; 将吸附柱置于室温数分钟, 彻底晾干吸附柱中残留的漂洗液; 将吸附柱放入新的 1.5 mL 的离心管中, 向吸附柱中央悬空滴加 $50\text{ }\mu\text{L}$ 洗脱缓冲液 TE, 室温放置 5 min, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 离心管中所得即为 DNA。

1.7 基因组 DNA 质量和浓度测定 取 DNA 溶液 $1\text{ }\mu\text{L}$, 通过 NanoDrop 2000 紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和吸光度, 并根据组织用量, 计算 DNA 的产率。再取 $9\text{ }\mu\text{L}$ DNA 溶液, 加 $1\text{ }\mu\text{L}$ 的 $10\times$ Loading Buffer 用于凝胶电泳检测, TAE 缓冲液, 制 1% 的胶, 电压 90 V , 电泳时间 30 min, 用于观察样品的相对分子质量大小。

1.8 基因组 DNA 完整性检测 以芋螺核基因 DNA 上 α -芋螺毒素基因设计引物, F: $5'\text{-GTGGTTCTGGGTCCAGCA-3'}$, R: $5'\text{-GTCGTGGTTCAGAGGGTC-3'}$; 正向引物根据内含子的保守序列设计, 反向引物则是根据 3'-UTR 设计(图 2), 4 种方法所提的 DNA 为模板, 判断所提 DNA 是否为核基因组 DNA, 该 PCR 反应体系为: $25\text{ }\mu\text{L}$: $2\times$ Taq PCR Master Mix $12.5\text{ }\mu\text{L}$, 引物各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, DNA 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$, 补加 ddH_2O 至 $25\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件: 预变性, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min; 循环内: 变性, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s; 退火, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s; 延伸, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min, 共 30 个循环; 再延伸 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min。将所得 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电压 90 V , 电泳时间 30 min。

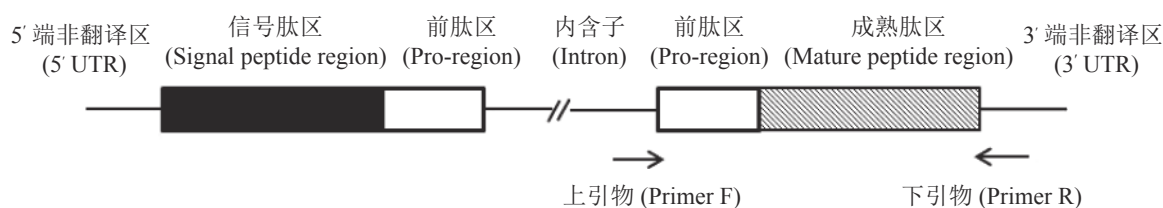


图 2 α -芋螺毒素基因克隆引物设计示意图

最左边黑线: 5'端非翻译区; 黑色方框: 信号肽区; 白色方框: 前肽区; 阴影框: 成熟肽区; 中间的黑线: 内含子; 最右边黑线: 3'端非翻译区。

Fig. 2 Schematic diagram of primer design for α -conotoxin gene cloning

Leftmost black line: 5' untranslated region (5' UTR); black box: Signal peptide region; white box: Propeptide region; shaded box: Mature peptide region; middle black line: Intron region; rightmost black line: 3' untranslated region (3' UTR).

2 结果与分析

2.1 4 种方法提取基因组 DNA 纯度的比较 从表 1 可知, 磁珠法 DNA 抽提试剂盒所提取的毒腺、毒管、腹足以及肝胰脏的 A_{260}/A_{280} 分别为 1.69, 2.01, 1.73, 1.61, 其中, 毒管和肝胰脏组织提取的纯度较低; 改良的 DNA 快速提取试剂盒法的 A_{260}/A_{280} 分别为 1.89, 1.91, 1.84, 1.69, 提取效果比磁珠法好, 但肝胰脏有降解和蛋白污染等问题; FastPure Tissue DNA 提取试剂盒法的 A_{260}/A_{280} 分别为 1.67, 1.94, 1.84, 1.87, 毒腺的 A_{260}/A_{280} 值偏低; 海洋动物组织 DNA 提取试剂盒法的 A_{260}/A_{280} 分别为 1.80, 1.82, 1.74, 1.63, 肝胰脏有明显的蛋白污染。比较 4 种方法的 A_{260}/A_{280} 可以看出, 改良的 DNA 快速提取试剂盒提取的 DNA 纯

表 1 4 种方法提取信号芋螺不同组织基因组 DNA 的纯度及其产率

Tab. 1 The purity and yield of genome DNA of *Conus litteratus* extracted from the tissues of different organs

提取方法 Method	样品名 Sample	质量/mg Quality	A_{260}/A_{280}	浓度/(mg·L ⁻¹) Concentration	产率/(mg·kg ⁻¹) Yield
磁珠法试剂盒	毒腺	19	1.69	16.3±1.7	42.9±4.5
	毒管	19	2.01	247.7±28.5	651.8±75
	腹足	24	1.73	58.1±1.5	121.0±3.1
	肝胰脏	11	1.61	350.2±9.3	1 590.9±42.3
改良DNA快速提取试剂盒	毒腺	25	1.89	68.9±10.2	137.8±20.4
	毒管	12	1.91	109.9±21.1	457.9±87.9
	腹足	20	1.84	80.3±9.8	200.8±24.5
	肝胰脏	11	1.69	388.3±19.4	1 765±88.1
FastPure DNA提取试剂盒	毒腺	23	1.67	39.5±13.9	85.9±30.2
	毒管	21	1.94	179.2±30.8	426.7±73.3
	腹足	22	1.84	37.3±10.2	84.7±23.2
	肝胰脏	12	1.87	357.7±20.7	1 490.4±86.3
海洋动物组织DNA提取试剂盒	毒腺	20	1.80	27.3±5.3	68.3±13.3
	毒管	20	1.82	195.4±12.5	488.5±31.25
	腹足	25	1.74	71.2±9.4	142.4±18.8
	肝胰脏	10	1.63	162.1±28.9	810.5±144.5

注: 质量和吸光度为均为3次测量的均值。
Note: Weight and A_{260}/A_{280} are a mean of three measured values.

度和海洋动物组织 DNA 提取试剂盒方法整体略优于其他 2 种方法, 而且不同芋螺组织中, 毒腺和腹足提取 DNA 的纯度更高。

2.2 4 种方法提取基因组 DNA 产率的比较 从表 1 可知, 改良的 DNA 快速提取试剂盒法整体优于其他试剂盒法, 其中, 毒管和肝胰脏组织的产率明显高于毒腺和腹足, 腹足则略高于毒腺, 结合 A_{260}/A_{280} 数值, 4 种方法提取腹足的基因组 DNA 纯度最高, A_{260}/A_{280} 数值均接近 1.80, 因此, 改良的 DNA 快速提取试剂盒法提取腹足组织能够获得较高纯度且较高产率的 DNA(图 3)。

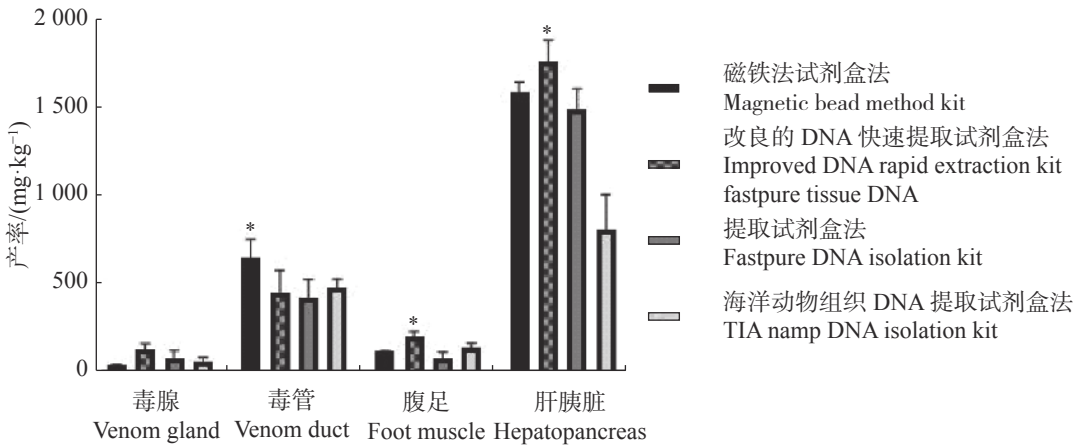


图 3 4 种试剂盒提取不同组织基因组 DNA 的产率(*=P<0.01)

Fig. 3 Yield of genomic DNA extracted from different organs with four different kits(*=P<0.01)

2.3 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的大小与完整性 将 4 种方法提取的不同组织的基因组 DNA 进行水平电泳检测(图 4),从电泳条带看,条带均比较清晰。其中,改良的 DNA 快速提取试剂盒电泳图中,毒腺,腹足提取的 DNA 条带明亮且清晰,大小均超过 15 kb, DNA 完整性较好且不存在明显污染情况;而毒管和肝胰脏 DNA 则完整性较差,条带弥散,且肝胰脏泳道最下方有明亮的条带,应是 RNA 污染,此结果在提取肝胰脏中较为常见,毒管泳道最下方也有模糊条带,可见毒管也有 RNA 污染的问题,毒腺和腹足组织 DNA 无明显的污染条带,此结果和 NanoDrop 2000 检测结果相符。这可能是由于毒腺和腹足密度较大,组织无法研磨充分,阻碍了蛋白质溶解,故而裂解过程比较困难,影响了 DNA 的产率。肝胰脏最易研磨,故而产率最高,但是由于其组织过于柔软,且富含 DNA 酶,在冷冻、解剖、以及提取过程中可能造成其 DNA 降解,故而电泳条带多呈现弥散状。

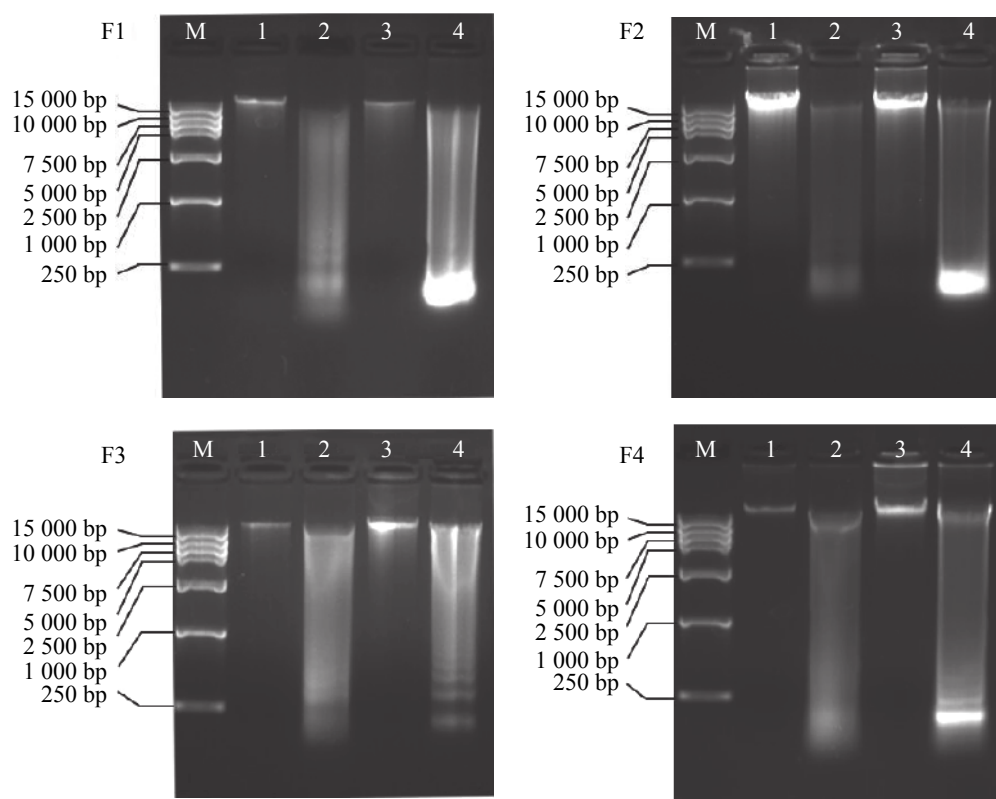


图 4 4 种方法提取信号芋螺不同组织基因组 DNA 的琼脂糖凝胶的电泳图

F1: 磁珠法动物基因组 DNA 抽提试剂盒; F2: 改良的 DNA 快速提取试剂盒; F3: FastPure Tissue DNA 提取试剂盒; F4: 海洋动物组织 DNA 提取试剂盒; M: DL15000 DNA Marker; 1: 毒腺; 2: 毒管; 3: 腹足; 4: 肝胰脏。

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA of *Conus litteratus* different tissues extracted with four different kits

F1: Magnetic Bead Method Kit; F2: Improved DNA Rapid Extraction Kit; F3: FastPure DNA Isolation Kit; F4: TIANamp DNA Isolation Kit; M: DL15000 DNA Marker; 1: Venom gland; 2: Venom duct; 3: Muscular foot; 4: Hepatopancreas.

通过 4 种试剂盒的电泳图(图 4)可以发现,毒管和肝胰脏的 DNA 的降解严重,纯度低,对比毒腺与腹足的 DNA 产率,腹足略优于毒腺,况且毒腺组织材料相对少,不适用于大量提取 DNA,所以腹足是更为合适的提取组织,且从图中(图 3)可发现,提取腹足 DNA 时,改良的 DNA 快速试剂盒提取的 DNA 产率最高,因此,改良的 DNA 快速提取盒法提取腹足的 DNA 产率高、完整性好、纯度高。提取信号芋螺的腹足基因组 DNA 用该方法更合适。

2.4 基因组 DNA 的完整性检测 以芋螺核基因特有的 A 超家族的 α -芋螺毒素基因为引物,4 种不同的方法提取的 DNA 为模板进行 PCR,电泳发现 1~16 泳道均有明亮的条带,大小在 100~250 bp 之间(图 5),与芋螺毒素的前体基因相符,测序后确定目的条带为 α -芋螺毒素基因,大小为 167~170 bp。因此,所提取的 DNA 可用于后续实验。

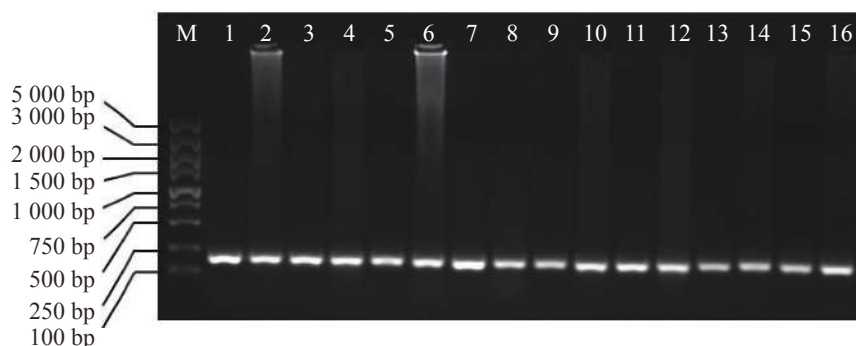


图 5 α -芋螺毒素前体基因 PCR 扩增产物的电泳图

M: DL5000 DNAMarker; 1~4: 磁珠法动物基因组 DNA 抽提试剂盒法 DNA; 5~8: 改良的 DNA 快速提取试剂盒 DNA; 9~12: FastPure Tissue DNA 提取试剂盒法 DNA; 13~16: 海洋动物组织 DNA 提取试剂盒法 DNA; 4 种不同方法中从左到右依次为毒腺, 毒管, 腹足, 肝胰脏。

Fig. 5 Electrophoresis of PCR amplified products of α -conotoxin precursor genes

M: DL5000 DNA Marker; 1~4: DNA extracted by the magnetic bead method kits; 5~8: DNA extracted by the Improved DNA Rapid Extraction Kit; 9~12: DNA extracted by the FastPure DNA Isolation Kit; 13~16: DNA extracted by the TIANamp DNA Isolation Kit; From left to right are venom gland, venom duct, muscular foot, and hepatopancreas.

3 讨 论

DNA 提取试剂盒种类繁多, 应用方法多样, 其中, 包括吸附材料结合法(材料包括磁珠、硅质材料和阴离子交换树脂等)、浓盐法、阴离子去污剂法以及苯酚抽提法等。试剂盒提取 DNA 的操作过程大多比较简单, 一般用时约 1 h, 组织用量为 1~100 mg, 其主要步骤包括匀浆, 裂解细胞释放 DNA, 去除蛋白和其它杂质, 纯化和 DNA 洗脱^[21]。不同组织处理方式和提取的效果也不同, 其中, 芋螺的毒腺, 腹足因富含胶原蛋白需要用液氮研磨, 肝胰脏则因为富含 DNA 酶也需要用液氮充分研磨至粉末, 并且尽量减少暴露在空气中的时间以减少降解。组织的裂解情况会直接影响到 DNA 的提取质量, 这 4 种试剂盒在加入裂解液后, 水浴 30~60 min, 此时研磨的粉末都应完全裂解, 溶液清澈透明, 但在实验过程中, 磁珠法试剂盒和 DNA 快速提取试剂盒在水解 1 h 后仍然有颗粒状悬浮物。笔者在多次尝试后发现, 减少组织用量(毒腺、腹足和肌肉的用量低于 20 mg, 肝胰脏用量低于 10 mg 时), 裂解情况明显改善; 另外, 在 DNA 快速提取试剂盒的裂解液中加入 20 μ L 蛋白酶 K, 其裂解情况明显改善, 最后所提的 DNA 产率和纯度都有明显的增加; 延长裂解时间也有利于组织的裂解, 但时间过长(>3 h), 会导致 DNA 产率及纯度的下降。裂解之后的操作原理主要是利用在特定的环境里, 核酸能与相应的介质结合, 洗涤后将杂质去除, 通过更改溶液环境, 确保 DNA 在 TE Buffer 中溶解^[21]。如磁珠法顾名思义是用磁珠吸附 DNA, 然后用 70% 乙醇洗涤, 此法不涉及有毒性试剂, 也不用离心, 较适用于自动化操作中; FastPure Tissue DNA 提取试剂盒法和海洋动物组织 DNA 提取试剂盒法均是用滤膜离心柱法, 使 DNA 吸附于硅胶柱上, 离心去除杂质, 此法主要是离心操作, 比较简便; DNA 快速提取法是利用 DNA 在异丙醇中溶解度低的原理, 用异丙醇沉淀 DNA, 操作简单。溶解 DNA 时用加热至 70 $^{\circ}$ C TE Buffer, 能更好地获取 DNA。

迄今为止, 已有很多提取芋螺 DNA 优化方法, 如丁青等^[22]比较了 CTAB 法、磁珠法和离心柱法提取菖蒲芋螺(*Conus vexillum*)3 种不同组织器官的 DNA 的效果, 结果发现, CTAB 法在提取大片段 DNA 时更有效, 更适于构建大片段 DNA 文库, 但此法操作比较复杂, 且需要使用氯仿等有毒试剂; 罗素兰等^[23]采用苯酚-蛋白酶 k 法、缠绕法、快速分离法和改良苯酚-SDS 法从 6 种不同芋螺中提取总 DNA, 建立了较优化的芋螺 DNA 提取方法, 但这些方法提取腹足组织时很难得到 DNA, 且不能有效去除蛋白质, 因而不适合用来提取腹足 DNA。笔者对 DNA 快速试剂盒进行改良(减少组织用量, 裂解时加入蛋白酶 K, 沉淀 DNA 时在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中放置 20 min), 发现用腹足的部位提取的 DNA 纯度高, 产率大, 并且因为腹足组织多且易获得, 因此, 可以用来提取芋螺 DNA。

参考文献:

- [1] JIN A H, MUTTENTHALER M, DUTERTRE S, et al. Conotoxins: Chemistry and Biology [J]. *Chemical Reviews*, 2019, 119(21): 11510 – 11549.
- [2] PRASHANTH J R, DUTERTRE S, JIN A H, et al. The role of defensive ecological interactions in the evolution of conotoxins [J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25(2): 598 – 615.
- [3] ENDEAN R, DUCHEMIN C. The venom apparatus of *Conus magus* [J]. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 1967, 4(4): 275 – 284.
- [4] DUTERTRE S, JIN A H, VETTER I, et al. Evolution of separate predation- and defence-evoked venoms in carnivorous cone snails [J]. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 1 – 9.
- [5] MARSHALL J, KELLEY W P, RUBAKHIN S S, et al. Anatomical correlates of venom production in *Conus californicus* [J]. *The Biological Bulletin*, 2002, 203(1): 27 – 41.
- [6] SALISBURY S M, MARTIN G G, KIER W M, et al. Venom kinematics during prey capture in *Conus*: the biomechanics of a rapid injection system [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2010, 213(5): 673 – 682.
- [7] 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 of the United States of America*, 2015, 112(29): 3782 – 3791.
- [8] JONES R M, BULAJ G. Conotoxins - new vistas for peptide therapeutics [J]. *Curr. Pharm. Des.*, 2000, 6(12): 1249 – 1285.
- [9] OLIVERA B M. E.E Just Lecture, 1996. *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 1997, 8(11): 2101 – 2109.
- [10] CRUZ L J, GRAY W R, OLIVERA B M. Purification and properties of a myotoxin from *Conus geographus* venom [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1978, 190(2): 539 – 548.
- [11] SHON K J, GRILLEY M M, MARSH M, et al. Purification, characterization, synthesis, and cloning of the lockjaw peptide from *Conus purpurascens* venom [J]. *Biochemistry*, 1995, 34(15): 4913 – 4918.
- [12] PENG C, YAO G, GAO B M, et al. High-throughput identification of novel conotoxins from the Chinese tubular cone snail (*Conus betulinus*) by multi-transcriptome sequencing [J]. *GigaScience*, 2016, 5(1): 1 – 14.
- [13] HIMAYA S W A, LEWIS R J. Venomics-Accelerated Cone Snail Venom Peptide Discovery [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(3): 788.
- [14] UTKIN Y N. Modern trends in animal venom research-omics and nanomaterials [J]. *World Journal of Biological Chemistry*, 2017, 8(1): 4 – 12.
- [15] UTKIN Y N. Animal venom studies: Current benefits and future developments [J]. *World Journal of Biological Chemistry*, 2015, 6(2): 28 – 33.
- [16] SANTOS A D, MCINTOSH J M, HILLYARD D R, et al. The A-superfamily of conotoxins: structural and functional divergence [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(17): 17596 – 17606.
- [17] LU A, YANG L, XU S, et al. Various conotoxin diversifications revealed by a venom study of *Conus flavidus* [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2014, 13(1): 105 – 118.
- [18] MCINTOSH J M, PLAZAS P V, WATKINS M, et al. A novel alpha-conotoxin, PeIA, cloned from *Conus pergrandis*, discriminates between rat alpha 9 alpha 10 and alpha 7 nicotinic cholinergic receptors [J]. 2005, 280(34): 30107 – 30112.
- [19] YUAN D D, HAN Y H, WANG C G, et al. From the identification of gene organization of alpha conotoxins to the cloning of novel toxins [J]. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 2007, 49(8): 1135 – 1149.
- [20] WANG Q, JIANG H, HAN Y H, et al. Two different groups of signal sequence in M-superfamily conotoxins [J]. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 2008, 51(5): 813 – 822.
- [21] 李雁达, 张永吉. DNA 提取试剂盒的综述 [J]. *全科口腔医学电子杂志*, 2019(28): 14.
- [22] 丁青, 刘月鹏, 朱晓鹏, 等. 菖蒲芋螺不同大小基因组 DNA 片段的分离制备 [J]. *热带生物学报*, 2017, 8(3): 267 – 276.
- [23] 罗素兰, 张本, 长孙东亭. 芋螺基因组 DNA 提取方法的优化 [J]. *中国海洋药物*, 2004(1): 21 – 25.

(下转第 250 页)