

# 从南阳黄牛被毛毛囊中提取 DNA 方法初探

王庆林<sup>1</sup>, 梁子安<sup>1</sup>, 郑应志<sup>2</sup>, 鲁云凤<sup>1,3</sup>

(1. 南阳师范学院生物系, 河南 南阳 473061; 2. 南阳黄牛科技中心, 河南 南阳 473000;

3. 河南农业大学植物保护学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 从南阳黄牛被毛毛囊细胞和血液中分别提取 DNA 用于 RAPD 扩增。结果表明, 从被毛毛囊细胞中提取 DNA 的方法简便可行。

**关键词:** 南阳黄牛; 毛囊细胞; DNA 提取; RAPD

**中图分类号:** S823.8<sup>+</sup>1 Q81 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2005)07-0095-02

## Preliminary Study on Method of DNA Extraction from Nanyang Yellow Cattle's Hair Follicle

WANG Qing-lin<sup>1</sup>, LIANG Zi-an<sup>1</sup>, ZHENG Ying-zhi<sup>2</sup>, LU Yun-feng<sup>1,3</sup>

(1. Department of Life and Sciences of Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China; 2. Nanyang Cattle's Science and Technology Center, Nanyang 473000, China; 3. Plant Protect College, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** DNA Extracted from Nanyang yellow cattle's hair follicle and blood was used to RAPD amplification. RAPD analysis showed that the method of extracting DNA from follicular cell was simple and feasible.

**Key words:** Nanyang yellow cattle; Follicular cell; DNA extraction; RAPD

南阳黄牛是我国家畜基因库中的宝贵财富, 已被列入重点保护畜禽品种名录。加强南阳黄牛种质资源的保护, 借助分子技术手段进行物种鉴定、遗传多样性分析等是一种行之有效的办法; 而物种 DNA 的获得则是进行分子生物学研究的基本条件之一。从动物血液中提取 DNA 并用于 RAPD 扩增是一种常见的方法, 但受很多因素影响, 如血样在采集携带和保存方面存在着诸多不便, 尤其不利于长途运输和邮寄; 而从被毛毛囊中提取 DNA 就能克服这些不足。在参照前人研究的基础上, 从南阳黄牛被毛毛囊中提取 DNA 用于 RAPD 分析, 并和从血液中提取的 DNA 及其 RAPD 结果进行比较, 旨在建立一种简单、适合南阳黄牛且对其无损伤的 DNA 提取方法, 从而为今后大范围、大量样本的基因组分析创造技术平台。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

被毛采自南阳黄牛某养牛场。Tris-base 为宝

信生物科技有限公司产品, SDS(十二烷基磺酸钠)、Marker DNA/Hind III(天津宝信生物科技有限公司)、琼脂糖(英国 Oxoid 公司生产, 上海水源生物科技有限公司分装), Taq 酶、dNTP、RAPD 引物为北京博润汇力基因有限公司产品, Tris 饱和酚为天津 H & Y 生物有限公司产品, 氯仿、异戊醇、无水乙醇均为国产分析纯。TE 缓冲液、溴化乙锭(EB)染色液配成 50 mg/ml, 4℃冰箱保存。

#### 1.2 仪器与设备

TGRADIENT 梯度 PCR 仪为德国 Whatman Biometra 产品, Dye-32 型电泳槽为北京六一仪器厂产品。

#### 1.3 方法

1.3.1 DNA 的提取<sup>[1~3]</sup> 将从黄牛尾部拔取的被毛放入 0.75% 的 NaCl 溶液中带回实验室, 根部截取 0.5 cm, 放入灭菌的 1.5 ml 离心管中, 每管 10~20 根, 加入 1 ml DNA 抽提液; 再加入蛋白酶 K 至终浓度 120 μg/ml, 55℃水浴恒温振荡 3 h, 加入 0.2 ml TE 混合 10 min, 然后加入 200 μl 酚:氯仿:异戊

收稿日期: 2005-04-25

基金项目: 河南省自然科学基金项目(0411034200)

作者简介: 王庆林(1964-), 男, 河南唐河人, 副教授, 本科, 主要从事经济动物学教学和研究工作。

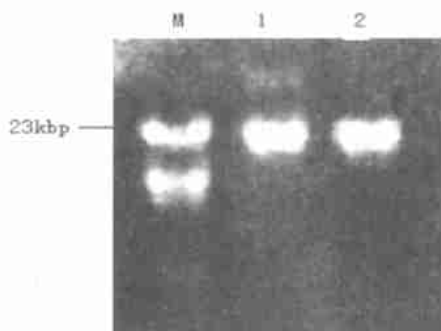
醇(25:24:1)。缓慢地来回颠倒离心管约 10 min, 混合两相, 3 500 r/min 离心 10 min。用大口径(3 mm)移液器头将上层水相移至一洁净的离心管中, 加等体积冰冷的异丙醇, 置 0℃下 10 min, 4 500 r/min 离心 10 min 后将沉淀物用 70%乙醇漂洗 2 次, 晾干, 溶于 TE, 4℃冰箱保存。

1.3.2 电泳检测所提 DNA 取 10 $\mu$ l DNA, 用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳(电压 85V, TAE 缓冲液), 30 min 后在 0.5  $\mu$ g/ml 的 EB 中染色 20 min, 紫外灯下检测。

1.3.3 RAPD 试验<sup>[4,5]</sup> PCR 扩增, 设一个不加 DNA 模板的空白对照, 引物选用 kit BRA 中的 9 号, 扩增体系为: 10 $\times$  buffer(含 MgCl<sub>2</sub> 20 mmol/L) 2.5  $\mu$ l, dNTPs(2.5 mmol/L)0.25  $\mu$ l, 引物 5 pmol, 模板 DNA 1  $\mu$ l, 加二次重蒸水至总体积 25  $\mu$ l。扩增条件为 94℃预变性 5 min, 94℃变性 1 min, 36℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 42 个循环, 72℃延伸 10 min。取 RAPD 扩增产物 10  $\mu$ l, 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电压 85V, EB 染色后紫外灯下观察。

## 2 结果与分析

在波长 254nm 紫外灯下观察 DNA 样品的电泳结果(图 1)。



M: Marker; 1. 被毛毛囊中提取的 DNA; 2. 血液中提取的 DNA

图 1 DNA 的电泳结果

从图 1 中可以看出, 从牛被毛中提取的 DNA 电泳条带清晰, 且在 Marker 的最后一条带处, 表明所提 DNA 片段长度在 23kbp 左右, 与从血液中提取的 DNA 电泳条带相差不大。说明从牛毛中提取 DNA 完全可行, 且步骤简便(试验进行 3 次重复, 结果一致)。

紫外灯(254nm)下观察 DNA 样品 RAPD 扩增产物的电泳结果见图 2。从图 2 可以看到, 从牛被毛中提取的 DNA 扩增条带带型清晰, 和血液中提取的 DNA 扩增条带完全一样, 空白对照无扩增带(重复试验 3 次, 结果一致)。由此说明, 从牛被毛中

提取 DNA 用于 RAPD 分析完全可行。



M: Marker; 1. 空白对照; 2. 被毛中 DNA 扩增条带;

3. 血液中 DNA 扩增条带

图 2 RAPD 产物的电泳结果

## 3 结论与讨论

从动物不同组织、用不同的方法提取 DNA 都有其独特的优缺点。而从动物血液中提取 DNA 并用于 RAPD 扩增是一种很常见的方法, 但受多种因素影响, 除血样采集、携带和保存等方面存在不便外, 而且养牛户往往不理解或者过于看重个人利益, 不愿配合, 经常导致采样困难。试验发现, 从被毛毛囊细胞中提取 DNA 的最大缺点是获得的 DNA 量非常少, 若操作稍有不慎, 就有可能提取不到 DNA。试验中加大了牛毛的数量, 效果良好; 由于每次 RAPD 反应所需 DNA 量极其微小(25~100 ng), 因此, 用这种方法提取的 DNA 完全可以满足多次反应的需要。从被毛毛囊细胞中提取 DNA 的另一个缺点是: 被毛保存的时间不是很长。有资料显示<sup>[6,7]</sup>, 在 0℃下动物被毛能保存 3 个月左右而不影响 DNA 的提取, 而加入抗凝剂的血液在-70℃下能长期保存。所以, 如果进行短期、小量 DNA 样品的分析, 完全可以采用从被毛毛囊中提取 DNA 进行研究; 反之, 用血液进行 DNA 提取较为合适。

### 参考文献:

- [1] J 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 460—470.
- [2] 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. 102—110.
- [3] 孙有平. 通过猪毛检测丹麦长白猪氟烷基因的变异[J]. 畜牧兽医学报, 1996, 27(2): 1337—1341.
- [4] 朱庆, 杨勇, 胡刚安. RAPD 标记在分析家鸡遗传变异中的应用[J]. 四川大学学报, 2000, 3(7): 139—143.
- [5] 赵凯, 张周平. 用 RAPD 标记研究 7 个猪种间的亲缘关系[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2000(7): 1—3.
- [6] 郑冬. 从动物毛中提取 DNA 研究初探[J]. 野生动物, 1998(2): 24—26.
- [7] 栗磊, 王慧. 从动物毛发中提取 DNA 进行 RAPD 扩增的研究[J]. 试验研究, 1999(2): 1—2.