

# 食品中转基因成分检测

## 第 4 章

### DNA 提取和纯化

**M.Somma**



## 目 录

### 第 4 章

#### DNA 提取和纯化

引言	3
提取方法	4
纯化方法	4
CTAB 提取和纯化方法	6
分光光度计测定 DNA 含量	9
分光光度计测定 DNA 的原理	9
核酸浓度测定	10
实验	12
参考文献	16

## 引言

在所有重组 DNA 技术和大多数分子生物学研究中，核酸的提取和纯化是实验的第一步。核酸提取方法研究的目的，是为了从不同来源的材料中获得高纯度的核酸，以便于利用聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 进行转基因品系的特异性分析。核酸的质量和纯度是 PCR 分析的关键因素之一。获取高纯度的核酸，避免抑制污染物，需要选择合适的 DNA 提取方法。表 1 列出了在 PCR 检测中可能抑制反应效率的污染物。为了防止由于样品中 PCR 抑制物的存在导致出现假阴性结果，强烈推荐设置一个对照实验以测试 PCR 抑制作用。基于此目的，一般采用植物特异性 (真核或叶绿体) 或种属特异性的 PCR 检测。

**表 1. PCR 反应过程中的一些抑制物**

抑制物	抑制浓度
SDS	> 0.005%
苯酚	> 0.2%
乙醇	> 1%
异丙醇	> 1%
乙酸钠	> 5 mM
氯化钠	> 25 mM
EDTA	> 0.5 mM
血色素	> 1 mg/ml
肝磷脂	> 0.15 i.m/ml
尿素	> 20 mM
反应混合物	> 15%

目前有许多种核酸提取和纯化技术，一般基于以下准则来选择最适宜的提取纯化技术：

- 目标核酸
- 来源生物
- 起始材料 (组织、叶片、种子、加工过的材料等)
- 对结果的要求 (产量、纯度、纯化所需时间等等)
- 下游应用 (PCR、克隆、标记、印迹、RT-PCR、cDNA 合成等等)

目前最常用的核酸提取和纯化方法的原理将在以下部分进行阐述。

## 提取方法

从生物材料中提取核酸需要裂解细胞，使细胞中的核酸酶失活并从细胞碎片中分离目标核酸。通常，理想的裂解方法是一项折中的技术，即必须使复杂的起始材料充分裂解（如：组织），但也要注意充分温和以保护目标核酸。常用的裂解方法分为几类：

- 机械破坏（如：碾磨、低渗裂解）
- 化学处理（如：去污剂裂解、离液剂处理、硫醇还原）
- 酶消化（如：蛋白酶 K）

细胞膜的裂解和胞内核酸酶的失活可能是同时发生的。例如，一种溶液可能同时含有溶解细胞膜的去污剂，和使细胞内的酶失活的离液序列高的盐。细胞裂解和细胞内核酸酶失活后，可以很容易地通过过滤或沉淀法去除细胞碎片。

## 纯化方法

从细胞提取液中纯化核酸的方法通常是以下技术中两项或更多项技术的结合：

- 提取/沉淀
- 色谱分析
- 离心
- 亲和分离

以下内容是对上述这些技术的简要介绍 (Zimmermann *et al.*, 1998)。

### 提取/沉淀

提取溶液通常用来除去核酸中的污染物，例如：苯酚和氯仿的混合物常用来除去蛋白质。用异丙醇或乙醇沉淀以浓缩核酸。如果目的核酸的浓度很低，可以在混合物中加入一种惰性载体（如：糖原）以增加沉淀的效率。其它的核酸沉淀技术还包括使用高浓度盐溶液进行选择性的沉淀（“盐析”）或者是利用 pH 变化沉淀蛋白质。

## 色谱分析法

色谱分析方法可以使用各种不同的分离技术,例如:凝胶过滤、离子交换、选择性吸附或亲和吸附。凝胶过滤是利用多孔凝胶颗粒的分子筛分能力,具有特定孔径大小的基质可使小分子通过扩散进入凝胶孔隙,较大的分子则被排除在凝胶孔隙之外,首先被洗脱。因此,分子是根据分子大小的递减规律被洗脱的。离子交换色谱是另一种利用目标分子与色谱柱基质中功能团之间的静电相互作用分离目标分子的技术,核酸(带有高的负电荷,为线性聚阴离子体)可以用简单盐缓冲液从离子交换柱上洗脱。在吸附色谱中,核酸选择性地吸附在特定盐溶液(如:离液盐)中的硅胶或玻璃基质上,而其它的生物分子则不会被吸附。低浓度的盐缓冲液或水可以洗脱核酸,所得的样品可以直接用于下游操作。

## 离心

选择性离心是一种强有力的纯化方法。例如,质粒纯化就是通过在超重的作用下,形成氯化铯(CsCl)浓度梯度进行超离心实现的。通常,离心分离是与其它技术相结合的。例如,旋转柱色谱法结合了凝胶过滤和离心分离技术,通过缓冲液的改变或分子大小的选择可从有小分子的杂质(盐、核苷等)中纯化DNA或RNA,还有一些方法在色谱基质的选择性吸附基础上结合离心洗脱可以选择性地纯化一类核酸。

## 亲和分离

近年,越来越多的纯化技术把核酸的亲和固定技术同磁性分离技术接合在一起。例如:poly(A)+mRNA可以通过生物素标记的寡聚胞嘧啶(Oligo dT)连接到抗生物素包被的磁性粒子上,而这些粒子复合物可以用磁石从溶液(和未结合的杂质)中收集。这种固相技术使核酸的纯化简单化,因为它可以由简单、快速的磁性分离步骤取代离心分离、有机抽提和相分离等多步骤操作。

## CTAB 提取和纯化技术

十六烷基三甲基溴化铵(Cetyltrimethylammonium Bromide, CTAB) 技术最先由 Murray 和 Thompson 于 1980 年发明 (Murray and Thompson, 1980), 随后由 Wagner 及其同事于 1987 年公开发表 (Wagner *et al.*, 1987)。该方法适用于植物及植物类食品中 DNA 的提取和纯化, 并特别适合去除影响 DNA 纯度和质量的多聚糖及多酚类化合物。这一方法已经被广泛地应用于植物分子遗传学研究并在认证实验中得到验证, 可用于检测转基因生物 (Lipp *et al.*, 1999; 2001)。目前也出现了一些对 CTAB 方法的改进, 使这一方法适用于更大范围各类未加工或加工过的食品样品 (Hupfer *et al.*, 1998; Hotzel *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 1997; Poms *et al.*, 2001)。

### CTAB 技术的原理: 裂解、抽提和沉淀

离子型去污剂 CTAB 可以裂解植物细胞, 在低盐环境下, CTAB能和核酸形成不溶复合物; 这时, 多聚糖、酚化合物和其它杂质保留在上清液中, 并可以被洗除; DNA复合物随着盐浓度的提高而溶解, 之后用乙醇或异丙醇沉淀。这一部分将对 CTAB 技术的 3 个主要步骤——细胞膜的裂解、基因组DNA的抽提及沉淀的原理进行详细描述。

**细胞膜裂解。**如前所述, DNA 提取的第一步是裂解细胞膜和核膜。基于此目的, 均质的样品首先由含 EDTA、Tris/HCl 和 CTAB 的抽提缓冲液处理。所有的生物膜都有一个共同的结构, 即都由脂质和蛋白质分子经非共价的相互作用结合在一起。

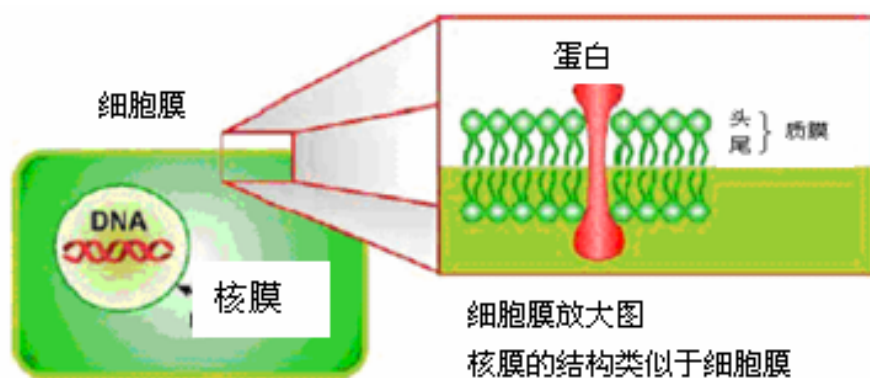


图 1.细胞膜的简易图示

如图 1 所示, 脂质分子排列成连续的双层, 其间“溶解”了各种蛋白质分子。脂类分子由亲水的“头”末端和疏水的“尾”末端组成。在 CTAB 方法中, 由含有去污剂

(CTAB) 的抽提缓冲液裂解细胞膜。由于脂类和去污剂有相似的结构组成，因此抽提缓冲液中的 CTAB 成分具有捕获组成细胞膜及核膜的脂质分子的功能。下图 2 显示了使用去污剂使脂质溶解的机制。

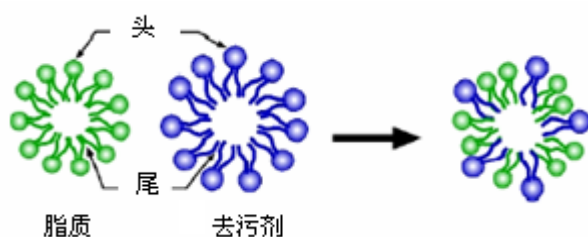


图 2. 脂质溶解示意图

图 3 举例说明了当细胞膜暴露于 CTAB 抽提缓冲液中时，去污剂捕获脂质和蛋白质以使基因组 DNA 释放的过程。在特定浓度的盐溶液 (NaCl) 中，去污剂可以和核酸形成不可溶性的复合物。EDTA 是一种螯合剂，它可在其它金属离子存在时特异结合镁离子，镁离子是脱氧核糖核酸酶的辅助因子。由于 EDTA 结合了镁离子，脱氧核糖核酸酶的活性则降低。Tris/HCl 使溶液有一定的 pH 缓冲能力 (过高或过低的 pH 会破坏 DNA)。值得注意的是，由于核酸在纯化过程中很容易被降解，所以要尽量减少样品均质化与加入 CTAB 缓冲液之间的时间。在细胞膜和其它细胞器膜 (例如线粒体和叶绿体膜) 被裂解后，就要马上进行 DNA 的纯化。

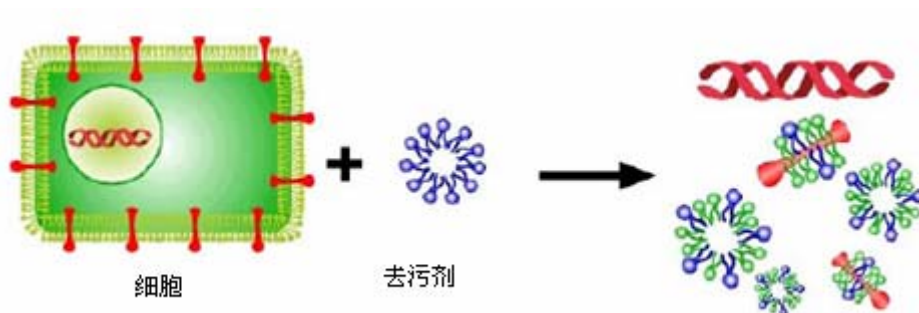


图 3: 细胞膜的裂解及基因组 DNA 的抽提

**抽提.** 在这一步中，溶解于水相中的多聚糖、酚复合物、蛋白质和其它细胞溶解物从 CTAB 核酸复合物中分离出来。其中除去多聚糖和酚复合物尤为重要，因为它们会抑

制许多酶的反应。在低盐浓度条件下 ( $<0.5 \text{ M NaCl}$ ), 核酸复合物中的杂质不会沉淀, 可以用氯仿从水相中抽提去除。氯仿可使蛋白质变性, 并加速水相和有机相的分离。通常, 水相形成上层部分。然而如果水相由于高盐浓度 ( $>0.5 \text{ M}$ ) 而过于稠密, 也会形成于下层部分。此外, 如果水相的 pH 没有充分地平衡于 7.8-8.0 之间, 核酸将部分进入有机相。如果需要, 氯仿的抽提要进行 2-3 次以使杂质能完全地从水相中除去。为了能最大限度地回收核酸, 有机相可用水溶液回提, 也即加入先前的提取液中。当核酸复合物纯化后, 就可以进行方法的最后一步——沉淀。

**沉淀** 在最后一步中, 核酸要从去污剂中释放出来。为了实现这个目的, 水相首先要用含有 CTAB 和高浓度的氯化钠 ( $>0.8 \text{ M}$ ) 混合液的沉淀溶液处理。其中需要盐来形成核酸沉淀, 在缓冲能力上, 乙酸钠可能比 NaCl 更好。在这些条件下, 去污剂由于在乙醇中比在水中更容易溶解而被洗去, 核酸则沉淀下来。继而用 70% 的乙醇溶液处理进一步纯化核酸, 或者冲洗核酸沉淀除去残留的盐。

## 分光光度计测定 DNA 的含量

DNA、RNA、寡核苷酸甚至于单核苷酸的含量都可以以稀释或未稀释的形式，在水溶液中通过测量紫外光（也在可见光范围）下的吸光度  $A$ （又称为光密度，OD）直接进行测定。如果样品是纯的（即：没有大量的杂质如蛋白质、苯酚或糖），根据紫外照射吸收量进行的分光光度测量既简单又精确。对这项技术来说，低离子浓度的缓冲液（例如 TE 缓冲液）是理想的。核酸浓度常由 260 nm 处相对于空白对照的光吸收来确定。杂质的干扰可以通过计算的“比率”来验证，由于蛋白质在 280 nm 处有吸收，因此  $A_{260}/A_{280}$  的比率被用于评估核酸的纯度，纯的 DNA 此比率大约为 1.8，而纯的 RNA 此比率大约为 2.0。230 nm 处的吸收反应了样品中的杂质，如：碳水化合物、肽、苯酚或芳香族化合物，纯的样品  $A_{260}/A_{230}$  的比率大约为 2.2。

只有少量的核酸时，可选择溴化乙锭琼脂糖凝胶检测方法；通过与一定范围的浓度标准进行对比，便可从紫外光照射下溴化乙锭的荧光强度来评估核酸的量。

## 分光光度计测定 DNA 含量的原理

分光光度计利用透过溶液的发射光来检测溶液中溶质的浓度，仪器根据一个简单的原理进行检测，即已知波长的光束通过一个样品时，透射光的能量可通过样品另一边的一个光电元件来测量。

如图 4 所示，单一光束分光光度计的设计包括一个光源、棱镜、样品固定槽和光电元件。它们彼此之间用电子或机械系统连接起来控制照射的强度、波长，并将光电元件收到的能量转化为电压波动。然后电压的波动显示在仪表盘上，或通过与电脑连接记录下来以用于以后的研究。

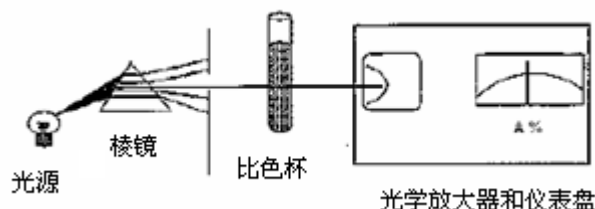


图 4. 光路示意图

在一定波长下所有的分子都有能量吸收，以此可以推断溶液中溶质的浓度。根据 Beer-Lambert 规律，以下公式显示了吸光度  $A$  (也叫光密度, OD) 和高分子的浓度间存在一个线性关系:

$$A = OD = \epsilon lc$$

其中,  $\epsilon$  是摩尔消光系数,  $c$  是浓度; 而  $l$  是比色皿的光路长度。蛋白质和核酸在 210 nm 到 300 nm 波长的紫外光范围内的有光吸收值。如前所述, DNA 和 RNA 的最大光吸收在 260 nm 处, 而蛋白质在 280 nm。因为 DNA 和 RNA 在 280 nm 处有部分的光吸收, 而蛋白质在 260 nm 处有部分的光吸收, 所以 260 nm 和 280 nm 处读数的比率 ( $A_{260}/A_{280}$ ) 可用于评估核酸的纯度。制备的纯 DNA 和 RNA 的  $A_{260}/A_{280}$  的比值分别为 1.8 和 2.0。对于在 10 mm 的光路和 260 nm 的波长下, 吸收度  $A=1$  相当于大约 50  $\mu\text{g/ml}$  的 dsDNA、大约 37  $\mu\text{g/ml}$  的 ssDNA、大约 40  $\mu\text{g/ml}$  的 RNA 或大约 30  $\mu\text{g/ml}$  的寡核苷酸。如果存在蛋白质杂质,  $A_{260}/A_{280}$  的比值常比以上述的小, 这时将不能准确地定量核酸。必须注意的是: 由于 RNA 的存在而造成不纯的 DNA 样品不能用分光光度计检测。可以用 325 nm 处的吸光度来确定溶液中是否存在碎片或查看比色皿本身是否干净。

## 核酸浓度的测定

**比色皿的选择.** 用于测定吸光度  $A$  的核酸溶液的量由比色皿的容量决定。选择适宜的比色皿要根据样品的浓度范围、稀释因子和可用样品体积。在大多数用于检测转基因生物的方法中, 所选基因组 DNA 的体积在 50 到 100  $\mu\text{l}$  之间。常用容量在 5 到 70  $\mu\text{l}$  之间的各类微量比色皿来进行微量核酸的分光光度计定量测定。

**调整.** 为了校准分光光度计, 这一步骤是非常重要的:

- 设置正确的光路
- 设置正确的系数 (在 dsDNA、ssDNA 和 RNA 之间选择)
- 测定水或缓冲液 ( $A_{260}=0$ ) 的空白溶液作参考
- 定期地重设参照
- 测定已知量的纯核酸溶液以确定设置参照的可靠性

**测量未知样品.** 根据所使用的比色皿容积, 用一定量的 DNA 溶液用于浓度测定 (例如: 比色皿的容积小于 0.2 ml, 就用 5  $\mu\text{l}$  DNA 溶液稀释于 195  $\mu\text{l}$  水中)。在校准分光光度计及加入核酸溶液后, 盖上比色皿盖, 混合溶液, 然后测定吸光度。为了减少移液管的误差, 至少要重复测量两次以上, 并至少使用 5  $\mu\text{l}$  DNA 原溶液。由于存在高度边缘误差的可能, 当  $A_{260}$  读数低于 0.02 或在 1 到 1.5 之间 (根据使用的仪器) 时应放弃读数。

使用以下公式计算溶液中存在的特定核酸的浓度  $c$ :

- 单链 DNA:  $c \text{ (pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}/0.027$
- 双链 DNA:  $c \text{ (pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}/0.020$
- 单链 RNA:  $c \text{ (pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}/0.025$
- 寡核苷酸:  $c \text{ (pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}100/1.5N_A+0.71N_C+1.20N_G+0.84N_T$

其中,  $A_{260}$  是 260 nm 处测定的吸光度。

如表 2 中, 显示了在 10 mm 光路的比色皿中, 以  $A_{260}=1$  的 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 dsDNA 为参照 DNA 的条件下, 悬浮于 1 $\times$ TNE 缓冲液中高度纯化的小牛胸腺 DNA 的吸光值读数。DNA 的浓度为 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

**表 2.** 1 $\times$ TNE 缓冲液中高度纯化的小牛胸腺 DNA 的吸光度

波长	吸光度	A260/A280	浓度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
325	0.01	-	-
280	0.28	-	-
260	0.56	2.0	28
230	0.30	-	-

## 实验

### 仪器

#### 备注

所有的仪器设备在使用前都要进行灭菌处理，任何残留的 DNA 都不能存在。为防止污染，应该使用浮质过滤移液枪头。

- 粉碎或切割仪器，如：消毒的外科手术刀和研钵
- 水浴锅或加热炉
- 微型离心机
- 微量移液器
- 漩涡混匀器
- 1.5 ml 离心管
- 称量纸或等同物
- 抹刀
- 可精确到 0.01 g 的天平
- 药勺
- 离心管架
- 真空干燥器 (可选)

### 试剂

#### 备注

所有的化学试剂都应是分子生物学级别。去离子水和缓冲液要预先高压灭菌备

用。此外，所有的化学试剂都不能含有 DNase 或 DNase。

- 十六烷基三甲基溴化铵 (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide, CTAB) CAS 124-0.3-8
- 氯仿
- 异丙醇
- Na<sub>2</sub>EDTA CAS 6381-92-6
- 乙醇
- NaCl
- 蛋白酶 K
- RNase A
- Tris-HCl
- 灭菌去离子水

#### CTAB-缓冲液

20 g/l CTAB	4 g
1.4 M NaCl	16.4 g
0.1 M Tris-HCl	3.15 g
20 mM Na <sub>2</sub> EDTA	1.5 g

- 加 100 ml 去离子水
- 用 1 M NaOH 调整 pH 至 8.0
- 加水补充至 200 ml 并高压灭菌
- 将缓冲液储存于 4°C 下，最多 6 个月

#### CTAB-沉淀溶液

5 g/l CTAB	1g
0.04 M NaCl	0.5g

- 加 100 ml 去离子水
- 用 1 M NaOH 调整 pH 至 8.0
- 加水补充至 200 ml 并高压灭菌
- 将溶液储存于 4℃ 下,最多 6 个月

#### 1.2M NaCl

- 溶解 7.0 g NaCl 于 100 ml 去离子水中
- 高压灭菌并储存于室温下

#### 70%乙醇溶液 (v/v)

70 ml 无水乙醇同 30 ml 灭菌去离子水混合配制

*RNase A* 10 mg/ml, -20℃ 保存。

蛋白酶 *K* 20 mg/ml, -20℃ 保存。

### 实验步骤

实验需要在无菌条件下进行。通过使用一次性设备、灭菌溶液和避免灰尘形成,以防止样品制备过程中的污染。

- 将 100 mg 均质样品加入灭菌的 1.5ml 微型离心管中
- 加 300  $\mu$ l 灭菌去离子水, 混匀
- 加 500  $\mu$ l CTAB-缓冲液, 混匀
- 加 20  $\mu$ l 蛋白酶 *K* (20 mg/ml), 震动混匀, 置于 65℃ 温育 30-90 min
- 加 20  $\mu$ l *RNase A* (10 mg/ml), 震动混匀, 置于 65℃ 温育 5-10 min
- 16,000 $\times$ g 离心 10 min

- 转移上清液至干净离心管中，加 500  $\mu\text{l}$  氯仿，震动混匀 30 s
- 16,000 $\times$ g 离心 10 min，直至分层
- 转移 500  $\mu\text{l}$  上清液至一新离心管中，加 500  $\mu\text{l}$  氯仿，震动混匀
- 16,000 $\times$ g 离心 5 min
- 转移上清液至一新离心管中
- 加两倍体积 CTAB 沉淀溶液，移液器混匀
- 室温下放置 60 min
- 16,000 $\times$ g 离心 5 min
- 弃上清
- 加入 350  $\mu\text{l}$  NaCl (1.2 M) 溶液溶解沉淀
- 加 350  $\mu\text{l}$  氯仿，震动混匀 30 s
- 16,000 $\times$ g 离心 10 min，直至分层
- 转移上清液至一新离心管中
- 加 0.6 体积异丙醇，震动混匀
- 16,000 $\times$ g 离心 10 min
- 弃上清
- 加 500  $\mu\text{l}$  70%乙醇溶液，小心震动
- 16,000 $\times$ g 离心 10 min
- 弃上清
- 干燥 DNA 沉淀,并重新溶解 DNA 于 100  $\mu\text{l}$  灭菌去离子水中

DNA 溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中存储最多两周，-20 $^{\circ}\text{C}$  冷藏柜中可以储存更长时间。

## 参考文献

- Hotzel, H., Muller, W. and Sachse, K.(1999). Recovery and characterization of residual DNA from beer as a prerequisite for the detection of genetically modified ingredients. *European Food Research Technology* **209**, 192-196.
- Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K. and Engel, K.H.(1998). Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* **206**, 203-207.
- Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G. and Anklam, E.(2001). Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research Technology* **212**, 497-504.
- Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J. and Anklam, E.(1999). IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International* **82**, 923-928.
- Meyer, R. and Jaccaud, E.(1997). Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of PCR assay for the specific detection of glyphosate-tolerant soybeans. In Amado, R. Battaglia(Eds.). Proceedings of the ninth European conference on food chemistry(Vol. 1). *Authenticity and adulteration of food-the analytical approach*. 24-26 September 1997. Interlaken **1**, 23-28. ISBN: 3-9521414-0-2.
- Murray, M.G. and Thompson, W.F.(1980). Rapid isolation of high molecule weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**, 4321-4325.
- Poms, R.E., Glossl, J. and Foissy, H.(2001). Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat. *European Food Research Technology* **213**, 361-365.
- Wagner, D.B., Furnier, G.R., Saghay-Marroof, M.A., Williams, S.M., Dancik, B.P. and Allard, R.W.(1987). Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **84**, 2097-2100.
- Zimmermann, A., Luthy, J. and Pauli, U.(1998). Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A* **207**, 81-90.