

文章编号: 1000 - 2286(2007)02 - 0279 - 03

中华蜜蜂王浆中 DNA 的提取方法研究

邹阳, 黄康, 颜伟玉, 曾志将*

(江西农业大学 动物科技学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 在国内外首次以中华蜜蜂新鲜王浆为材料, 采用改进的苯酚-氯仿法, 提取出其 DNA 并对其含量及纯度进行测定。结果表明: 中华蜜蜂新鲜王浆中 DNA 的含量为 $66.29 \sim 105.34 \mu\text{g/g}$ 平均含量为 $(82.95 \pm 10.39) \mu\text{g/g}$ 平均纯度 (A_{260}/A_{280}) 为 1.69 ± 0.08 以其作为模板进行 RAPD-PCR 扩增, 扩增的条带较清晰、明亮、稳定性好。

关键词: 中华蜜蜂; 蜂王浆; DNA 提取; 定量; RAPD-PCR

中图分类号: S896.3 文献标识码: A

A Study on Extraction of DNA from Fresh Royal Jelly of *Apis cerana*

ZOU Yang HUANG Kang YAN Wei-yu ZENG Zhi-jiang*

(College of Animal Science and Technology, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract In the present investigation the DNA from fresh royal jelly of *Apis cerana* was extracted with modified phenol-chloroform method and its content and purity were determined. The results showed that the mean content of DNA extracted from fresh royal jelly of *Apis cerana* was $(82.95 \pm 10.39) \mu\text{g/g}$ the mean purity (A_{260}/A_{280}) was 1.69 ± 0.08 . Taking the DNA as the template for RAPD-PCR, the obtained bands were clear, bright and complete.

Key words *Apis cerana*; royal jelly; DNA extraction; quantification; RAPD-PCR

蜂王浆是由蜜蜂工蜂王浆腺分泌的乳白色或淡黄色浆状物质。蜂王浆的成分十分复杂, 营养极为丰富, 已广泛应用在治病、保健及美容等领域^[1]。目前对蜂王浆和蜜蜂的相关报道比较多^[2~4]。蜂王浆中除含有蛋白质、脂类、糖类、氨基酸等外, 还含有核酸。1964年, Marko 等人通过测定首次报导了意大利蜜蜂王浆冻干粉中含有核酸^[5]; 1979年, 牛春艳等人提取并测定了意大利蜜蜂新鲜王浆中的 DNA^[6]。但目前, 国内外尚无关于中华蜜蜂王浆中 DNA 的任何报道。为了确定中华蜜蜂王浆中是否含有 DNA 及其含量, 我们对中华蜜蜂新鲜王浆中的 DNA 进行提取并测定其含量。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验王浆: 实验所用王浆产自江西农业大学蜜蜂研究所饲养的中华蜜蜂, 共 14 份; 分别产自不同的蜂群。-70℃贮藏。

收稿日期: 2006-11-14

基金项目: 江西省自然科学基金资助项目 (0530031)

作者简介: 邹阳 (1981-), 男, 硕士研究生, 主要从事蜜蜂科学研究工作; *通讯作者: 曾志将, E-mail: bees1965@si

na.com

1.2 主要试剂

STE (30 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, pH 8.0); 10% 的 SDS 细胞裂解液; 蛋白酶 K (200 μg/mL); 水饱和酚, $V_{\text{苯酚}}:V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}} (25:24:1)$ 混合液, $V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}} (24:1)$; TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0); $\varphi=75\%$ 乙醇; 琼脂糖, 溴化乙锭; 引物 S 系列 (购自上海生工); DAN marker, Taq DNA 聚合酶 (5.0 U/μL)、10 mmol/L dNTPs (大连宝生物公司)、10×PCR Buffer (含 Mg^{2+}) 购自大连宝生物有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 的提取 (1)大离心管中加入约 2~3 g 左右的王浆, 加入 10 倍于王浆体积的双蒸水, 搅拌均匀, 18 000 r/min 离心 15 min 弃上清。(2)重复步骤 (1) 2~3 次, 直至离心后的上清不浑浊为止。(3)称取离心后的王浆约 0.5 g 加入 450 μL STE 缓冲液 (30 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, pH 8.0) 和终浓度分别为 10% 的 SDS 80 μL 和 200 μg/mL 的蛋白酶 K。(4)充分混匀后置 56 °C 温箱中消化 8~12 h 至澄清。(5)加入等体积的水饱和酚, 缓慢混匀 30 min (手摇), 6 000 r/min 离心 10 min, 上清液转至另一干净的 Eppendorf 管中。(6)加入等体积的 $V_{\text{苯酚}}:V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}} (25:24:1)$ 混合液缓慢混匀抽提 30 min (手摇), 6 000 r/min 离心 10 min, 上清液转至另一干净的 Eppendorf 管中。(7)再加入等体积的 $V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}} (24:1)$ 抽提 20 min (手摇), 6 000 r/min 离心 10 min, 上清液转至另一干净的 Eppendorf 管中。(8)加入等体积的异丙醇沉淀 DNA, -20 °C 过夜放置, 6 000 r/min 离心 10 min 后, 弃上清。(9)加入 800 μL $\varphi=70\%$ 乙醇洗涤, 10 000 r/min 离心 10 min 后, 弃上清, 重复 1 次。(10)将 DNA 样品置于真空干燥器干燥 3 min 左右 (视管中乙醇残留量多少适当调整干燥时间)。(11)加入适量 TE (pH=8.0) 缓冲液溶解, 置 4 °C 冰箱待用或保存于 -20 °C。

1.3.2 DNA 质量和浓度检测 (1)电泳分析。取 2 μL DNA 加样于 0.9% 琼脂糖凝胶泳道中, 电泳缓冲液为 10×TAE, 电场强度为 6 V/cm, 电泳时间为 20 min, 凝胶成像仪上观察 DNA 分子的大小、完整性并拍照。

1.3.3 DNA 含量和纯度的测定 取 1 μL DNA 样品, 加 ddH₂O 至 50 μL, 在 Eppendorf BioPhotometer (德国, EPPENDORF 公司) 核酸定量仪上测定 OD₂₆₀, OD₂₈₀, OD_{260}/OD_{280} , 及 DNA 的含量。RAPD-PCR 反应: 10 μL 反应体系中包括: 模板 10 ng/μL, MgCl₂ 2.5 mmol/L, dNTP 25 mmol/L, 引物 0.3 μmol/L, Taq DNA 聚合酶为 1 U/10 μL, RAPD-PCR 扩增反应条件为: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 1 min, 37 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 40 个循环; 后延伸 10 min。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

利用改进的苯酚-氯仿法对中华蜜蜂新鲜王浆中的 DNA 进行提取, 对其进行定量检测: A_{260}/A_{280} 在 1.56~1.82 之间, 表明 DNA 的纯度较高; 其得率在 66.29~105.34 μg/g 之间。

根据琼脂糖凝胶电泳图 (图 1) 可以看出: 中华蜜蜂王浆中提取的 DNA 清晰、明亮且所得片段较大。

表 1 各样品提取的 DNA 纯度和产量

Tab 1 Purity and yield of DNA from different samples

中华蜜蜂王浆样品	A_{260}/A_{280}	DNA 含量 μg·g ⁻¹	中华蜜蜂王浆样品	A_{260}/A_{280}	DNA 含量 μg·g ⁻¹
1#	1.56	74.93	9#	1.82	66.29
2#	1.59	88.33	10#	1.72	75.70
3#	1.67	105.34	11#	1.64	84.92
4#	1.75	75.31	12#	1.60	82.17
5#	1.76	84.02	13#	1.73	99.92
6#	1.66	76.61	14#	1.65	78.73
7#	1.70	78.90	平均数 ± 标准误	1.69 ± 0.08	82.95 ± 10.39
8#	1.79	90.09			

2.2 RAPD-PCR 扩增结果

用中华蜜蜂新鲜王浆中提取的 DNA 作为模板进行 RAPD-PCR 扩增, 结果见图 2 获得了清晰稳定的条带, 说明用改进的苯酚-氯仿法提取中华蜜蜂新鲜王浆中的 DNA, 完全可以满足 RAPD 分析的需求, 这对进一步开展中华蜜蜂王浆中的 DNA 研究打下了基础。

3 讨 论

蜂王浆中只含有微量的 DNA, 而含有较多的糖类、脂类物质和蛋白质。用标准的苯酚-氯仿法很难将这些物质有效地去除, 因而几乎得不到 DNA。本研究在苯酚-氯仿抽提之前, 向装有新鲜王浆的大离心管中加入相当于王浆体积 10 倍的双蒸水, 搅拌均匀; 18 000 r/min 离心 15 min 能够较为有效地去除王浆中部分的糖类和脂类物质。DNA 的产率为 66.29 ~ 105.34 $\mu\text{g/g}$ A_{260}/A_{280} 比值为 1.56 ~ 1.82 平均为 1.69 \pm 0.08 说明其纯度较高。以此法提取的 DNA 作模板进行 RAPD-PCR 扩增, 获得了较为清晰稳定的条带, 说明用改进的苯酚-氯仿法提取中蜂王浆中 DNA 效果好, 完全可以满足王浆中 DNA 的分子标记。本研究在国内外首次提取出中华蜜蜂王浆中的 DNA 并对其定量, 从实验上证实了中华蜜蜂王浆中含有 DNA 并且能够被提取出来, 这为往后科学工作者们进一步开展中华蜜蜂王浆中的 DNA 的研究打下了基础。在提取过程中要注意:

(1) DNA 提取过程的步骤 (1)、(2) 不能省略, 否则得不到 DNA。

(2) 收集的王浆样品应尽早置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 防止王浆中的 DNA 过分降解, 影响实验结果。

(3) 在 DNA 提取过程中, 为提高 DNA 的纯度, 可重复 DNA 提取步骤 (7) 2 ~ 3 次, 能够更好地除去王浆中的脂类和蛋白质, 从而得到更纯的 DNA。

参考文献:

- [1] 曾志将, 熊红华, 郭东生. 蜂王浆增产剂筛选及其应用[J]. 江西农业大学学报, 1997, 19(3): 82-86
- [2] 颜伟玉, 吴晓波, 邹阳, 等. 蜜蜂花粉中 SOD 同工酶的研究[J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(5): 773-775.
- [3] 颜伟玉, 谢宪兵, 饶波, 等. 蜜蜂 DNA 提取纯化与 RAPD 反应体系的建立[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(5): 783-786
- [4] 郭冬生, 李琳, 李洪群, 等. 蜂群内温度的变化及调节研究[J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(6): 902-904
- [5] Marko B. Pecháň I, Vittek J et al. Some phosphorus compounds in royal jelly[J]. Nature, 1964, 202: 188-189
- [6] 牛春艳, 申春玲, 李玉海, 等. 王浆核算含量的测定和核糖核酸的提取[J]. 中国养蜂, 1979(6): 17-19.

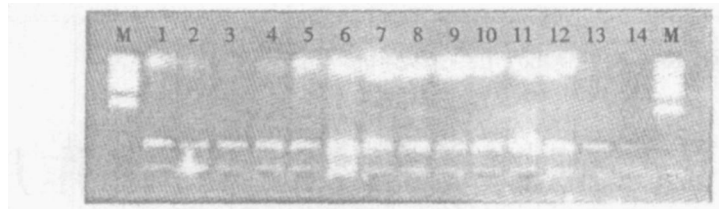


图 1 中华蜜蜂王浆 DNA 电泳胶图

Fig. 1 Electrophoresis map of agarose of DNA extracted from royal jelly of *Apis cerana*

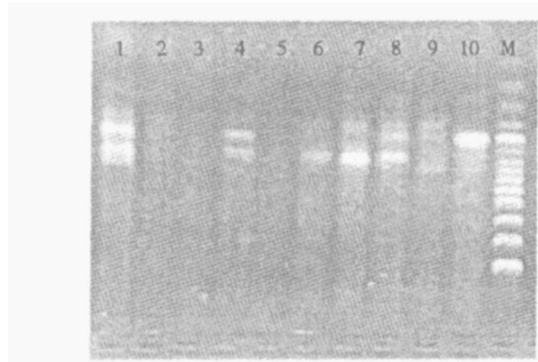


图 2 引物 S27 对中华蜜蜂王浆中 DNA 的 RAPD 扩增结果

Fig. 2 Random amplified polymorphic DNA of DNA extracted from royal jelly of *Apis cerana*