

一种共生藻 PCR 模板 DNA 的快速制备法

龙 寒, 裯金彩

(广西民族大学海洋与生物技术学院、广西海洋微生物资源产业化工程技术研究中心、广西多糖材料与改性重点实验室, 广西 南宁 530008)

摘要:采用 Chelex-100 树脂法制备了 26 个物种(分别属于腔肠动物门、海绵动物门和软体动物门)的共生藻以及一株纯培养共生藻的 DNA 样品。通过 PCR 扩增叶绿体 23S rRNA 基因片段获得了 26 个有效序列, 测序比对结果显示获得的序列与扩增目的基因相符。该方法不仅样品消耗量小、操作时间短、设备需求低廉, 而且可以避免使用有害化学试剂。这是一种高效、环保的 DNA 提取方法, 可为共生藻分子研究提供技术参考。

关键词:海洋生物学; Chelex-100; 共生藻; DNA 提取

DOI: 10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2019. 04. 014

中图分类号: P735

文献标识码: B

文章编号: 2095-4972(2019)04-0585-07

共生藻(Symbiodinium)是共生于海洋无脊椎动物体内的单细胞藻类, 依靠光合作用为宿主提供氨基酸、糖等生长必需的化合物^[1]。异养营养尽管能为宿主供给部分代谢能量^[2], 但由于其自然来源的不稳定性等特征, 只能作为宿主的次要能量来源。因此, 在含藻共生体生活史上, 共生藻具有不可替代的重要性。

目前国内外对共生藻的研究主要包括共生藻的分类鉴定^[3]、共生藻的逆境生理^[4]、共生藻与宿主的共生机制^[5]等, 其中利用基因组学和转录组学展开的基因表达调控机制是共生藻研究的前沿和热点, 而作为 PCR 模板的 DNA 制备是对共生藻开展分子水平研究的基础。

对于共生藻 DNA 的提取, 既有采用先与宿主分离再进行 DNA 提取的方法^[6], 也有采用与宿主混合采样的提取方法^[7]。在实际操作中, 许多共生体(如珊瑚)由于其产生大量粘多糖, 共生藻往往难于分离, 李秀保等(2009)提出用冲洗法对活体珊瑚共生藻进行分离^[8]; 张露(2017)比较了冲洗法、液氮研磨法和酒精研磨法对共生藻的分离效果, 发现酒精研磨法分离效率高、分离质量好^[9]; 张跃环等(2018)提出了用毛细管法获得砵磗单克隆共生

藻^[10]。在共生藻 DNA 提取方面, 目前常用的方法有 TRIZOL 提取法、CTAB 提取法、改良 SDS 提取法等。SDS 对于多糖的去除能力较差, 提取效果不佳; CTAB 法操作繁琐、耗时长、试剂具有毒性; TRIZOL 抽提法尽管样品消耗量小操作较为简单, 但苯酚、异硫氰酸胍等试剂毒性强, 对人体及环境危害性大。

本研究采用 Chelex-100 树脂法, 制备可应用于 PCR 的模板 DNA, 旨在探索一种便捷、高效、安全的共生藻 DNA 提取法。Chelex-100 是由苯乙烯、二乙烯苯共聚体组成的化学螯合树脂, 含有成对的亚氨基二乙酸盐离子, 可螯合多价离子, 对高价金属离子有很高的亲和力和螯合作用。在低离子强度、碱性及煮沸的条件下, Chelex-100 可以使细胞膜破裂、蛋白质变性, 能有效去除非核酸有机物, 保留 DNA。Chelex-100 树脂法由于其便捷性被广泛应用于法学鉴定如血液、血痕、组织和骨骼等 DNA 的提取中^[11-13], 在真菌^[14]、细菌^[15]、放线菌^[16]等原核生物以及高等植物^[17-18] DNA 提取中也有使用, 但目前未见用于藻类 DNA 提取的报道。

本研究首次将 Chelex-100 应用于藻类 DNA 提取, 成功制备了共生状态及纯培养状态下的 27 份共生藻样品 DNA, 并通过叶绿体 23S rDNA 基因片段

收稿日期: 2018-08-30

基金项目: 广西高校中青年教师基础能力提升项目资助项目(2017KY0169, 2017KY0166); 广西科技重大专项资助项目(桂科 AA18242026); 广西科技基地和人才专项资助项目(桂科 AD18126005); 广西民族大学研究生科研创新项目(gxun-chxz2018061)

作者简介: 龙寒(1979—), 女, 硕士, 实验师; E-mail: longh00@163.com

通讯作者: 裯金彩(1960—), 女, 高级实验师; E-mail: xuanjcgxum@163.com

扩增验证了提取效果(叶绿体 23S rDNA 含有演化速度很高的 V 区域,在共生藻种属水平分类上是十分有效的研究工具^[19]),以期为共生藻分子分类、功能基因研究等分子水平研究工作的效率提升提供一定的技术参考。

表 1 供试生物样品及其编号

Tab. 1 Biological samples for experiment and numeration

编号	种名	编号	种名
1	刺石芝珊瑚(<i>Fungia echinata</i>)	14	群柱虫软珊瑚(紫色共肉)(<i>Clavularia viridis</i>)
2	蛙状龟甲菊珊瑚(<i>Goniastrea austrariensis</i>)	15	花瓶珊瑚(<i>Euphyllia divisa</i>)
3	翘齿蜂巢珊瑚(<i>Favia mathaii</i>)	16	海绵(<i>Tethya</i> sp.)
4	开放脑珊瑚(<i>Scolymia cubensis</i>)	17	佳丽鹿角珊瑚(<i>Acropora pulchra</i>)
5	血红沙珊瑚(<i>Psammodora haimeana</i>)	18	尖锐轴孔(<i>Acropora aculeus</i>)
6	气泡菇珊瑚(<i>Ricordea florida</i>)	19	柱状珊瑚(<i>stylophora pisillata</i>)
7	南海圆形短指软珊瑚(<i>Sinularia brassica</i>)	20	叶状蔷薇珊瑚(<i>Montipora foliosa</i>)
8	香菇珊瑚(<i>Discosoma</i> sp.)	21	滨珊瑚(<i>Porites</i> sp.)
9	多琳巨指海葵(<i>Macrodactyla doreensis</i>)	22	肉芝珊瑚(<i>Sarcophyton</i> sp.)
10	角海葵(<i>Cerianthus</i> sp.)	23	尼罗河珊瑚(<i>Catalaphyllia ardinei</i>)
11	沙群海葵(<i>Palythoa</i> sp.)	24	火柴头珊瑚(<i>Euphyllia glabrescens</i>)
12	花群海葵(<i>Zoanthids</i> sp.)	25	榔头珊瑚(<i>Euphyllia ancora</i>)
13	群柱虫软珊瑚(粉色共肉)(<i>Clavularia</i> sp.)	26	番红砗磲(<i>Tridacna crocea</i>)

1.1.2 试剂 Chelex-100 的制备:将 Chelex-100 胶体颗粒浸泡于去离子水中,在 121℃ 下灭菌 15 min 用于 DNA 提取;23S-M 引物由北京奥科鼎盛公司合成提供,序列为 23S-M/F (5'-CACGACGTTGTA-AAACGACGGCTGTA ACTATAACGGTCC-3'), 23S-M/R (5'-GGATAACAATTTACACAGGCCATCG-TATTGAACCCAGC-3')^[19];新设计引物 23S-N 由上海生工合成提供,序列为 23S-N/F (5'-CCTGCAT-GAAACATAGAACGATT-3'), 23S-N/R (5'-CAGGC-CATCGTATTGAACCC-3');2×Taq PCR Master Mix、DL2000 DNA marker 购自康为世纪。

1.1.3 培养基 共生藻 GY-H50 采用 f/2 海水培养基进行培养^[20]。

f/2 海水培养基(1 000 cm³):NaNO₃ 75 mg, NaH₂PO₄·H₂O 5 mg,维生素 B₁ 0.1 mg,维生素 B₁₂ 0.000 5 mg,生物素 0.000 5 mg,Na₂SiO₃·9H₂O 30 mg,微量元素母液 1.0 cm³。

微量元素母液(1 000 cm³):ZnSO₄·7H₂O 22 mg,EDTANa₂ 4.36 g,Na₂MoO₄·2H₂O 6 mg,CuSO₄·5H₂O 10 mg,CoCl₂·6H₂O 10 mg,MnCl₂·

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试生物 供试生物样品及其编号见表 1,纯培养共生藻 GY-H50 分离自东海舟山海域。

4H₂O 180 mg,FeCl₃·6H₂O 3.15 g。

1.2 方法

1.2.1 实验取材 具有伸展组织的生物体在其自然伸展状态下迅速剪取小块组织约 2 mm³(如葵珊瑚的触手、砗磲的外套膜等);脑珊瑚、海绵用眼科剪连骨剪取约 3~4 mm³的组织。剪取的组织放入装有 0.5 cm³无菌海水的 EP 管内,轻轻震荡后,将组织转移至另一只装有 0.2 cm³无菌蒸馏水的 EP 管内,以灭菌解剖针对其进行捣碎,捣碎时,可见管内液体变黄。吸取黄色样品液 0.1 cm³放入 PCR 管内,再加入 Chelex-100 胶体颗粒 25 mm³。

在生物体(砗磲、海葵、葵珊瑚等)自然伸展状态下迅速剪取材料,可见生物体仍然保持伸展状态,几乎不受取样影响,而所有的生物体在取样后均能正常生长,可见,此取样方法对生物体基本不构成伤害,能确保生物体继续存活并可支持更多次实验。

取共生藻 GY-H50 的纯培养藻液 1 cm³,于 6 000 r/min 下离心 10 min 收集藻体,沉淀用 0.1

cm³ 无菌水重悬后转移至 PCR 管,加入 Chelex-100 胶体颗粒 25 mm³。

1.2.2 DNA 提取 样品经沸水浴(99 ~ 100℃)15 min 后,6 000 r/min 离心 3 min,上清液即为 DNA 提取液。

1.2.3 PCR 扩增及效果检验 PCR 扩增反应 25 mm³ 体系包括:2 × Taq PCR Master Mix 12.5 mm³、上游引物 0.5 mm³、下游引物 0.5 mm³、DNA 提取液 1 mm³、双蒸水 10.5 mm³。

PCR 程序为:95℃ 预变性 7 min;95℃ 变性 0.5 min,55℃ 退火 1.5 min,74℃ 延伸 1 min 30 s,循环 30 次;74℃ 延伸 10 min。

PCR 产物初步检验:采用 2% 琼脂糖凝胶进行水平电泳。电泳在 120 V 电压下进行 20 min 左右。以 DL2000 为 marker,marker 与样品上样量均为 2 mm³。电泳结束后将凝胶置于 0.5 ug/cm³ EB 染液中浸泡 30 min 显色,再于凝胶成像仪内 260 nm 紫外光下进行拍照。

PCR 产物测序:将电泳检验中有条带的扩增样品送至广州天一辉远基因科技有限公司进行测序,所得

序列在 NCBI 中进行 Nucleotide BLAST 查询比对。

1.2.4 引物设计 用序列比对软件 AlignX 分析最初获得的 22 条 23S rDNA 序列,判断序列的保守区。选择一条序列作为模板,载入引物设计软件 Oligo7,根据保守区选择上游引物位置并设定预期扩增片段长度为 650 bp,Search 完成引物设计。设计完成的引物通过 Analyse 进行评价,确定序列。

2 结果与讨论

2.1 琼脂糖凝胶电泳结果

经过 Chelex-100 树脂热裂解后制备所得的 27 份 DNA 样品,取 1 mm³ 为模板,以 23S-M 为引物进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶水平电泳检验,结果如图 1 所示,得到了 22 条清晰条带的电泳图,其中 4、8、11、12、20 号样品为双条带,判断原因为引物特异性不足造成;3、5、10、15、19、21 号生物样品未扩增出条带。所有获得条带除 23 号样品(750 bp)外,大小基本一致,在 700 bp 左右;marker 及样品上样量均为 2 mm³,从亮度对比来看,所获得的扩增产物具有较高的浓度,符合测序要求。

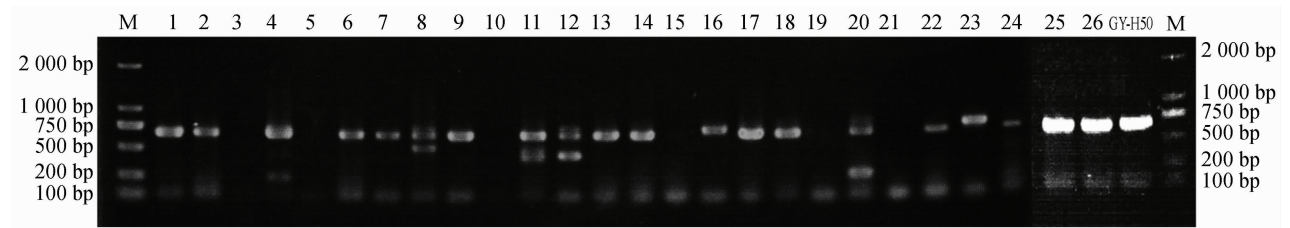


图 1 供试生物样品共生藻及 GY-H50 DNA 提取物的 23S-M PCR 扩增结果

Fig.1 23S-M PCR products by DNA extracts from experimental biological samples' symbiodiniums and GY-H50

M:DL2000 DNA marker;1 ~ 26、GY-H50;1 ~ 26 号样品共生藻及 GY-H50 DNA 提取物的 23S-M PCR 扩增产物;
其中,1 ~ 24 对应左侧 marker,25、26、GY-H50 对应右侧 marker。

针对未扩增出条带的 6 份样品,利用测序返回的 22 份序列,按照“1.2.4”的方法进行引物设计,得到新引物 23S-N。PCR 所使用的模板 DNA 仍然采用“1.2.2”制备的 DNA 提取液(-20℃ 保存),无需重新制备。扩增产物经琼脂糖凝胶水平电泳检验,结果如图 2 所示,除 3 号样品外,其余均扩增出了 700 bp 左右的条带,条带明亮、清晰,符合测序要求。3 号样品未扩增成功的原因,可能是所设计的引物不匹配。

2.2 扩增序列测序结果

扩增产物针对 700 bp 片段进行测序,共获得 26 个基因序列,将序列依次在 NCBI 中进行 Nucleotide BLAST 查询比对,选择分值最高项且 E 值最小项编

入表 2(E 值是分值 score 的可靠性评价,即随机情况下,其他序列与目标序列)。从表 2 可以看到,所有比对结果与扩增的目的基因一致,均为叶绿体 23S rDNA,覆盖率最低为 95%,一致性最低为 90%,说明比对结果可信度高,序列扩增正确。该结果说明由 Chelex-100 树脂热裂解制备的模板 DNA 具有 PCR 可操作性。

从表 2 统计结果中可看到:在被测 27 份共生藻中,A 类群共生藻仅见于帘形目即番红砗磲(*Tridacna crocea*),B 类群共生藻跨类珊瑚目和角海葵目两目,存在于气泡菇珊瑚(*Ricordea florida*)及角海葵(*Cerianthus* sp.)中,C 类群共生藻共生范围跨度最大,存在于石珊瑚目、软珊瑚目、海葵目、群体海葵目

及韧海绵目中,东海舟山海域分离培养的共生藻 GY-H50 为 E 类群共生藻,为共生藻属中营自由生活的种类。本次实验为确保采样种类的多样性,使用了 3 门 3 纲 9 目 20 科 23 属 26 个物种作为生物样品。测序结果发现 C 类群共生藻是本次模拟调

查范围中的优势种,该结果与 Huang 等(2006)对造礁石珊瑚共生藻遗传多样性调查结果一致^[21]。实验结果还可为后续共生藻分子系统发育树的构建、共生藻的系统发生关系分析以及共生关系生态学研究提供参考数据。

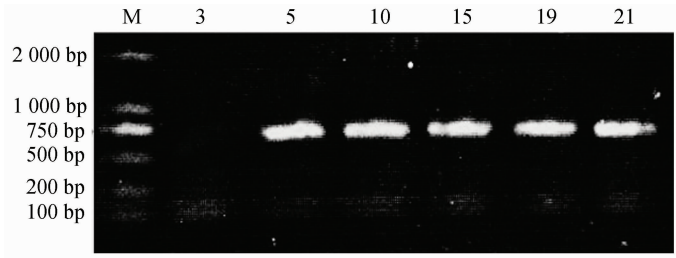


图 2 部分供试生物样品共生藻 DNA 提取物的 23S-N PCR 扩增结果

Fig. 2 23S-N PCR products by DNA extracts from part experimental biological samples' symbiodiniums

M:DL2000 DNA marker;3、5、10、15、19、21: 3、5、10、15、19、21 号样品共生藻 DNA 提取物的 23S-N PCR 扩增产物。

表 2 供试生物样品共生藻及 GY-H50 的 PCR 扩增序列比对结果

Tab. 2 BLAST results of PCR amplified sequences from experimental biological samples' symbiodiniums and GY-H50

编号	比对结果描述	最高 分值	总分值	覆盖率 /%	E 值	相似性 /%	来源
1	<i>Symbiodinium</i> sp. Cp9 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	1 038	1 038	98	0	99	FJ461486.1
2	<i>Symbiodinium</i> sp. Achy17_Pool400 clade C 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	1 066	1 066	99	0	100	HQ631382.1
4	<i>Symbiodinium</i> sp. Achy17_Pool400 clade C 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	1 070	1 070	99	0	100	HQ631382.1
5	<i>Symbiodinium</i> sp. C1 isolate CC35 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	937	937	100	0	100	KR002412.1
6	<i>Symbiodinium</i> sp. clade_B isolate Pk13 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast gene for chloroplast product	1 086	1 086	98	0	100	AY055231.1
7	<i>Symbiodinium</i> sp. clade C chloroplast gene for 23S ribosomal RNA, partial sequence	1 081	1 081	99	0	99	AB159231.1
8	Ncultured <i>Symbiodinium</i> sp. clone Pavd1522c1FFS 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	307	445	95	0	90	KF623573.1
9	<i>Symbiodinium</i> sp. C1cp chloroplast partial 23S rRNA gene, isolate 6341X	1 068	1 068	98	0	100	FN298482.1
10	<i>Symbiodinium</i> sp. clade B isolate SSB01 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	931	931	100	0	100	JX221048.1
11	<i>Symbiodinium</i> sp. clade C chloroplast gene for 23S ribosomal RNA, partial sequence	1 064	1 064	99	0	99	AB159231.1
12	<i>Symbiodinium</i> sp. clade C chloroplast gene for 23S ribosomal RNA, partial sequence	617	700	98	0	99	AB159231.1
13	<i>Symbiodinium</i> sp. clade C chloroplast gene for 23S ribosomal RNA, partial sequence	1 077	1 077	99	0	99	AB159231.1
14	<i>Symbiodinium</i> sp. C1cp chloroplast partial 23S rRNA gene, isolate 6341X	1 072	1 072	98	0	100	FN298482.1

续表 2

编号	比对结果描述	最高 分值	总分值	覆盖率 /%	E 值	相似性 /%	来源
15	<i>Symbiodinium</i> sp. Achy17_Pool400 clade C 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	933	933	99	0	100	HQ631382.1
16	<i>Symbiodinium</i> sp. clade C chloroplast gene for 23S ribosomal RNA, partial sequence	854	854	100	0	94	AB159231.1
17	<i>Symbiodinium</i> sp. clade C chloroplast gene for 23S ribosomal RNA, partial sequence	1 077	1 077	99	0	99	AB159231.1
18	<i>Symbiodinium</i> sp. Achy17_Pool400 clade C 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	1 057	1 057	97	0	99	HQ631382.1
19	<i>Symbiodinium</i> sp. Achy17_Pool400 clade C 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	904	904	99	0	99	HQ631382.1
20	<i>Symbiodinium</i> sp. MS-2014 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	436	436	98	0	92	KT223627.1
21	<i>Symbiodinium</i> sp. C1 isolate CC35 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	929	929	99	0	99	KR002412.1
22	<i>Symbiodinium</i> sp. C1cp chloroplast partial 23S rRNA gene, isolate 6341X	1 068	1 068	98	0	99	FN298482.1
23	<i>Symbiodinium</i> sp. LR_212 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	1 243	1 243	99	0	99	KJ806186.1
24	<i>Symbiodinium</i> sp. clade C chloroplast gene for 23S ribosomal RNA, partial sequence	1 075	1 075	99	0	99	AB159231.1
25	<i>Symbiodinium</i> sp. clade C chloroplast gene for 23S ribosomal RNA, partial sequence	1 068	1 068	100	0	99	AB159231.1
26	<i>Symbiodinium</i> sp. clade_A isolate CassEL1 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast gene for chloroplast product	1 086	1 086	99	0	100	AY035410.1
GY-H50	<i>Symbiodinium</i> sp. clade E isolate SSE01 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	1 013	1 013	96	0	97	JX221049.1

注:3 号供试生物样品共生藻未扩出。

2.3 讨论

对于 Chelex-100 树脂法,戴文申等(2006)利用该法提取痕量 DNA 的研究中指出,56℃保温 15 ~ 30 min、100℃保温 15 min 左右(不超过 30 min)有利于细胞核的裂解,促进 DNA 的释放^[22],但周双清等(2010)在对放线菌进行 Chelex-100 树脂热裂解时仅通过沸水浴 10 min 即获得了良好的 PCR 模板 DNA^[23]。共生藻在共生生物体内含量可高达 3.95 × 10⁶ cells/cm²^[24],即使是少量的材料(如本次实验采样量),在稍加搅拌或吹打的情况下,即可见棕黄色的藻液被释放出来,可见细胞含量充足,不属于痕量 DNA 提取,因此可以缩短实验步骤,不进行 56℃保温;而与原核生物相比,藻类 DNA 提取又存在细胞壁破碎这一屏障,因此实验采用了 Chelex-100 树脂热裂解 15 min 提取的共生藻 DNA 样品。扩增产物电泳条带明亮清晰、能够测出有效序列,说明 Chelex-100 树脂法能够快速实现腔肠动物、海绵动

物、软体动物的共生藻-宿主混合样品或者纯培养共生藻样品的 DNA 提取,且制备的模板 DNA 能够满足 PCR 扩增需求。

值得注意的是,许多含有共生藻的生物都属于珍稀物种[如石珊瑚、库氏砗磲(*Tridacna gigas*)等],进行科研实验时,在确保完成科研工作的基础上探索更合理的可持续实验模式是每一位科研工作者都应当充分考虑的问题,具体做法如尽可能减少样品的消耗量、采用不危及生物体生命的采样方式、采用人工养殖代替自然采集(如果是生态调查,应当在满足调查的同时尽可能减少取样量)、生态调查中所取的样品合理地放回原环境等^[25]。

3 结论

采用 Chelex-100 进行了 3 门 3 纲 9 目 20 科 23 属 26 个物种的共生藻及 1 株纯培养共生藻的 PCR 模板 DNA 快速制备,并通过 PCR 扩增 23S rDNA 基

因片段进行制备效果检验,结果表明,制备过程通过 Chelex-100 树脂热裂解 15 min,即能为 26 份样品提供合格的 PCR 扩增 DNA 模板(有 1 份样品未能扩增成功判断原因为引物不匹配)。实验结果说明

Chelex-100 树脂法能够用于多种状态及类型共生藻的 PCR 模板 DNA 制备,且具有操作简单、耗时短、无污染、无设备要求、样品消耗量小等优点。

参考文献:

- [1] TRENCH R K. The cell biology of plant-animal symbiosis[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1979, 30(1): 485-531.
- [2] 杨阳楚翘, 洪文霆, 王淑红. 共生珊瑚异养营养研究进展[J]. 应用生态学报, 2017, 28(12): 4 143-4 149.
- [3] 董志军, 黄晖, 黄良民, 等. 虫黄藻的分类和遗传多样性研究进展[J]. 海洋通报, 2008, 27(3): 95-101.
- [4] TOLLER W W, ROWAN R, KNOWLTON N. Zooxanthellae of the montastraea annularis species complex: patterns of distribution of four taxa of symbiodinium on different reefs and across depths[J]. Biology Bulletin, 2001, 201(3): 348-359.
- [5] LIN S, CHENG S, SONG B, et al. The *Symbiodinium kawagutii* genome illuminates dinoflagellate gene expression and coral symbiosis[J]. Science, 2015, 350(6 261): 691-694.
- [6] 沈城, 刘楚吾, 刘丽. 温度胁迫及恢复初期稀杯盔形珊瑚共生虫黄藻 Hsp70、Hsp90、psaA、psbA 基因表达分析[J]. 热带海洋学报, 2016, 35(3): 72-78.
- [7] 刘丽, 陈育盛, 申玉春, 等. 造礁石珊瑚共生藻的分子分类研究[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 718-722.
- [8] 李秀保, 黄晖, 黄良民, 等. 活体珊瑚共生藻的制备方法: CN101538535[P]. 2009-09-23.
- [9] 张露. 几种处理方法对脑珊瑚基因提取效率的影响比较研究[C]//中国水产学会海洋牧场研究会编委会. 现代海洋(淡水)牧场国际学术研讨会论文摘要集. 大连: 中国水产学会海洋牧场研究会, 2017: 136-137.
- [10] 张跃环, 肖述, 张扬, 等. 一种砗磲虫黄藻的分离纯化、离体培养及规模化生产方法: CN107574123A[P]. 2018-01-12.
- [11] 杨电, 张丽萍, 刘超, 等. Chelex 法和两种磁珠法提取接触 DNA 效果的比较[J]. 刑事技术, 2012, 37(1): 11-13.
- [12] 步嵘, 王耀平, 叶元康. 以 Chelex 100 为介质抽提 DNA[J]. 中华病理学杂志, 1999, 28(5): 59-60.
- [13] 陈辉, 刘永波, 谢庆瑞, 等. 有机酚法和 Chelex-100 法提取不同组织微量 DNA 效果比较[J]. 郑州大学学报(医学版), 2004, 39(6): 988-991.
- [14] 李焕宇, 付婷婷, 张云, 等. 5 种方法提取真菌基因组作为模板效果的比较[J]. 中国农学通报, 2017, 33(16): 28-35.
- [15] 钱雪琴, 张军, 沈芳. Chelex-100 法和碱性裂解法提取细菌 DNA 的比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(8): 1 565-1 566.
- [16] 周双清, 黄小龙, 黄东益, 等. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板[J]. 生物技术通报, 2010, 24(2): 123-125.
- [17] 王永, 兰青阔, 张莉, 等. 改良 Chelex-100 法和 CTAB 法用于转基因抗草甘膦大豆检测效果的比较[J]. 大豆科学, 2008, 27(5): 898-901.
- [18] 蔡翠霞, 肖维威, 康文杰, 等. 改良 Chelex-100 法快速提取转基因农产品 DNA[J]. 生物技术通报, 2011, 16(10): 210-214.
- [19] SANTOS S R, TAYLOR D J, HIDAKA M, et al. Molecular phylogeny of symbiotic dinoflagellates inferred from partial chloroplast large subunit (23S)-rDNA sequences[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2002, 23(2): 97-111.
- [20] 张培军. 海洋生物学[M]. 济南: 山东教育出版社, 2004: 171-172.
- [21] HUANG H, DONG Z J, HUANG L M, et al. Restriction fragment length polymorphism analysis of large subunit rDNA of symbiotic dinoflagellates from scleractinian corals in the Zhubi coral reef of the Nansha islands[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2006, 48(2): 148-152.
- [22] 戴文申, 徐银龙, 叶健, 等. 关于 Chelex 100 提取 DNA 方法的进一步研究: 延长保温时间对 Chelex 100 提取 DNA 的影响[J]. 河北公安警察职业学院学报, 2006, 6(4): 41-43.
- [23] 周双清, 黄小龙, 黄东益, 等. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板[J]. 生物技术通报, 2010, 15(2): 123-125.
- [24] 李淑, 余克服, 施祺, 等. 南海北部珊瑚共生虫黄藻密度的种间与空间差异及其对珊瑚礁白化的影响[J]. 科学通报, 2007, 52(22): 2 655-2 662.
- [25] 杨小东, 肖宝华, 廖宝林, 等. 不同光照对稀杯盔形珊瑚生长及钙化的影响[J]. 海洋环境科学, 2017, 36(4): 523-530.

A rapid extraction method for symbiodinium PCR template DNA

LONG Han, XUAN Jin-cai

(School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi University for Nationalities, Guangxi Marine
Microbial Resources Industrialization Engineering Technology Research Center,
Guangxi Key Laboratory for Polysaccharide Materials and Modifications, Nanning 530008, China)

Abstract: DNA samples of symbiodiniums from 26 species of Cnidaria, Spongiatia and Mollusca, and 1 species of pure culture symbiodinium were extracted by Chelex-100 resin method. Twenty-six valid sequences were obtained by PCR of chloroplast 23S rRNA. BLAST showed that these obtained sequences were consistent with target genes. This method has the advantages of small sample consumption, short operation time and low equipment requirements, and the avoidance of using toxic chemical reagents. It is an efficient and environmentally friendly DNA extraction method and will provide a technical reference for the molecular study of symbiodinium.

Key words: marine biology; Chelex-100; symbiodinium; DNA extract

DOI:10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2019. 04. 014

(责任编辑:王 静)