

吳郭魚基因組 DNA 萃取方法的比較

余俊欣·曾福生*·朱惠真·周賢鏘·盧民益·林金榮

行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

摘要

本研究以吳郭魚作為試驗生物材料，研發準確、快速、便宜、穩定且無毒性的基因組 DNA 萃取方法，以商業套組法 (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen)、酚-氯仿法 (phenol-chloroform method)、醋酸鉍法 (ammonium acetate method)、蛋白質析出法 (protein salting-out method) 及簡單加熱法 (simple boiling method) 等 5 種方法萃取 DNA，比較所萃取的 DNA 純度及產量，以及在微隨體 (microsatellite) 和隨機擴增片段多形性 DNA (random amplified polymorphism DNA, RAPD) 等 PCR 擴增分析應用上有無差異。

比較 5 種萃取方法所得之結果，在 DNA 純度方面，商業套組法、酚-氯仿法及醋酸鉍法 3 者 OD 比值並沒有顯著差異 ($p > 0.05$)，但皆顯著高於蛋白質析出法和簡單加熱法 ($p < 0.05$)；而蛋白質析出法 OD 比值顯著高於簡單加熱法 ($p < 0.05$)。至於 5 種萃取方法在 DNA 產量上，簡單加熱法 DNA 產量顯著高於其他 4 種方法 ($p < 0.05$)，但其純度差，可能導致產量上的錯估；蛋白質析出法產量和醋酸鉍法沒有顯著差異 ($p > 0.05$)，但顯著高於商業套組法和酚-氯仿法 ($p < 0.05$)；醋酸鉍法產量和酚-氯仿法沒有顯著差異 ($p > 0.05$)，但顯著高於商業套組法 ($p < 0.05$)；而酚-氯仿法產量和商業套組法沒有顯著差異 ($p > 0.05$)。

微隨體 PCR 擴增 UNH106 及 GM139 DNA 兩種片段結果顯示，以商業套組法、酚-氯仿法、醋酸鉍法及蛋白質析出法所萃取的 DNA，經 PCR 擴增兩種片段，成功率皆 100% (30/30)；簡單加熱法之成功率則分別為 86.7% (26/30) 及 63.3% (19/30)。RAPD-PCR 擴增 DNA 片段結果，以商業套組法、酚-氯仿法、醋酸鉍法及蛋白質析出法所萃取的 DNA，經 PCR 擴增條帶之成功率皆為 100% (30/30)；簡單加熱法成功率則為 70.0% (21/30)；簡單加熱法在 30 個 DNA 樣本中，雖然有 21 個樣本能擴增出條帶，但其所擴增的條帶數並不足以進行 RAPD 的分析。

本研究所建立的操作技術在酚-氯仿法及醋酸鉍法能達到商業套組法的水準，而醋酸鉍法的使用又能避免使用具毒性的酚及氯仿，在萃取高純度的 DNA 方面是值得推薦的有效方法。此外，蛋白質析出法和簡單加熱法，具有經濟、快速、安全及簡便性，惟 DNA 純度無法達到商業套組法的水準。

關鍵詞：吳郭魚、DNA 萃取、微隨體、隨機擴增片段多形性 DNA

前言

DNA 標誌已經越來越廣泛的運用在魚類族群遺傳和育種研究上，其所需的基因組 DNA 萃取方法，是從事相關研究的基本操作技術，在試驗生物萃取基因組 DNA 時選擇之部位需符合容易收集、體積小及可信賴等基本要素 (Kumar *et al.*, 2007)。

一般在魚類基因組 DNA 萃取中，所採的樣本多為血液 (Harris *et al.*, 1991; Song *et al.*, 2008)、肌肉 (Taggart *et al.*, 1992)、肝臟 (Taggart *et al.*, 1992)、魚苗 (Amsterdam *et al.*, 1995; Higashijima *et al.*, 1997)、胚胎 (Cretekos and Grunwald, 1999; Davidson *et al.*, 2003)、鱗 (Taggart *et al.*, 1992; Rong *et al.*, 2002; 張等, 2008) 和鱗片 (Kumar *et al.*, 2007) 等。

目前魚類基因組 DNA 萃取時，大多使用酚 (phenol)、氯仿 (chloroform) 及異戊醇 (isoamyl alcohol)，其中酚會造成蛋白質變性，並藉由氯仿

* 通訊作者 / 基隆市和一路 199 號; TEL: (02) 2463-3101; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: fstseng@mail.tfrin.gov.tw

與酚互溶，將酚帶至下層有機溶劑中與上層水溶液分離，變性的蛋白質雜質則會沉澱在兩層之間的介面，而異戊醇是一種去泡劑，可減少實驗過程中泡沫（大多為含蛋白質的物質）的產生。酚及氯仿皆為有毒的化學物質，對研究人員和環境均有相當的危險性，但若不以有毒的酚及氯仿進行基因組 DNA 萃取，便需轉而使用昂貴的商業套組 (Medina-Acosta and Cross, 1993; Rong *et al.*, 2002; 張等, 2008; Song *et al.*, 2008)，如此情況限制了需要大量樣本進行 DNA 萃取研究的應用性。因此，準確、快速、便宜、穩定且無毒性的基因組 DNA 萃取方法的研發，將非常有助於相關研究工作的推展，目前在這方面的相關研究，如：用於原生動物 DNA 萃取的蛋白質析出法 (protein salting-out method) (Rotureau *et al.*, 2005)；用於魚類鱗、肌肉及魚苗樣本 DNA 萃取的簡單加熱法 (simple boiling method) (Yue and Orban, 2005)；用於老鼠組織 (Truett *et al.*, 2000) 及斑馬魚 (zebrafish) 研究所應用的熱鹼法 (hot sodium hydroxide) (Meeker *et al.*, 2007)。

基本上，生物樣本進行基因組 DNA 萃取的目的，是要能使用所萃取的 DNA 進行所欲達成的基因學相關研究，如運用在 DNA 標誌研究方面，以 PCR 擴增分析為基礎的微隨體 (microsatellite) 及隨機擴增片段多形性 DNA (random amplified polymorphism DNA, RAPD) (Rong *et al.*, 2002; 黃和劉, 2003; Liu and Cordes, 2004; Chistiakov *et al.*, 2006)。然而不同基因組 DNA 萃取方法，往往會影響 PCR 擴增的成功率 (Sepp *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2003)。因此，研究基因組 DNA 萃取方法，需考慮所萃取的 DNA 能否提供試驗需求。

綜上所述，本試驗以吳郭魚作為試驗生物材料，基於同一部位可同時取得較多的組織考量，選擇魚體背部肌肉進行基因組 DNA 萃取，如此可降低在比較不同方法上吳郭魚個體差異性的影響，並以蛋白酶 (proteinase) 分解蛋白質為基礎，比較商業套組法 (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen)、酚-氯仿法 (phenol-chloroform method)、醋酸鉍法 (ammonium acetate method)、蛋白質析出法 (protein salting-out method) 及簡單加熱法 (simple boiling method) 等 5 種方法，在

DNA 純度及產量，微隨體和 RAPD 等 PCR 擴增分析應用上有無差異。研究中並詳列酚-氯仿法、醋酸鉍法、蛋白質析出法及簡單加熱法之操作流程，以便作為其他研究者在萃取基因組 DNA 時的應用參考。

材料與方法

一、樣本

本研究室所繁養殖的雜交品系吳郭魚 (*Oreochromis sp.*)，從同一對親魚繁殖的 142 尾同一批仔魚中隨機採樣 10 尾 (9.0~19.2 g)，每尾魚取 15 塊背部肌肉 (約 10 mg/塊)，分別放入 2 mL 微量離心管，共計 150 管肌肉樣本，冰存於-25℃ 備用。5 種基因組 DNA 萃取方法各取來自同尾魚的肌肉樣本 3 管，10 尾魚共 30 管樣本進行試驗。

二、基因組 DNA 萃取

(一) 商業套組法

使用核酸自動純化系統 (QIAcube) 及 DNeasy Blood & Tissue Kit (目前價格為 250 個反應新台幣 33,000 元整)，萃取步驟根據製造廠商的操作說明 (<http://www1.qiagen.com/QIAcube/>)。

(二) 酚-氯仿法

根據 Taggart *et al.* (1992) 萃取鮭魚組織 DNA 的方法並作部份修正。略述如下：冰存的背部肌肉樣本放入 500 μ L 消化液 A 【配方：100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA (pH 8.0)、0.2% SDS、200 mM NaCl 並含有 proteinase K (200 μ g/mL)】，置於 55℃ 下至組織完全消化 (肌肉溶解於消化液中，消化液呈透明澄清)，加入核糖核酸酶 (RNase) 於 37℃ 乾浴加熱器作用後，以等量酚-氯仿-異戊醇 (混合比例 25:24:1) 混合溶液分離 DNA，再以 2 倍體積的無水酒精沉澱 DNA，用高轉速離心將 DNA 離心下 (此時 DNA 沉澱於微量離心管的底部和靠近底部的管壁)，再以 70% 酒精沖洗 DNA，並經高轉速離心後吸除 70% 酒精，將 DNA 於室溫陰乾後溶於 TE 溶液 【配方：10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA

(pH 8.0)】，冰存於 -20°C 備用 (詳細步驟如附錄一)。

(三) 醋酸鉍法

參考游仲逸和張永福編著的分子生物學技術實驗手冊 Genomic DNA 的製備 (<http://biotech-deu.bio.kmu.edu.tw/download/handbook.doc>)，用 10 M 高濃度醋酸鉍沉澱蛋白質取代酚-氯仿-異戊醇混合溶液的使用，其餘方法同酚-氯仿法 (詳細步驟如附錄二)。

(四) 蛋白質析出法

參考斑馬魚基因組萃取方法 (http://zfin.org/zf_info/zfbook/chapt9/9.3.html) 及 Rotureau *et al.* (2005) 的方法並作部份修正。略述如下：冰存的背部肌肉樣本放入 500 μL 消化液 A (配方同酚-氯仿法)，置於 55°C 下至組織完全消化，以 2 倍體積無水酒精沉澱 DNA，用高轉速離心將 DNA 離心下，DNA 於室溫陰乾後溶於 TE 溶液，冰存於 -20°C 備用 (詳細步驟如附錄三)。

(五) 簡單加熱法

參考斑馬魚基因組萃取方法 (http://zfin.org/zf_info/zfbook/chapt9/9.3.html) 及 Cao *et al.* (2003) 的方法並作部份修正。略述如下：冰存的背部肌肉樣本放入 100 μL 消化液 B【配方：10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、2 mM EDTA、0.2% Triton X-100、1% Tween 20 並含有 proteinase K (1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)】，置於 55°C 下至組織完全消化，再於 97°C 乾浴加熱器加熱使 proteinase K 失去活性，經高轉速離心後直接將離心管 (此時 DNA 溶於離心液中) 冰存於 -20°C 備用 (詳細步驟如附錄四)。

三、DNA 純度與產量

參考 Cao 等人 (2003) 的方法，用分光光度計 (GeneQuant pro Amersham Biosciences) 測波長 260 nm 與 280 nm 之吸光值，以 OD 比值 (OD260/OD280) 計算 DNA 純度，去除雜質後純的 DNA OD 比值約為 1.8，比值太低時，表示蛋白質殘留太多 (吳等, 2006)。以 OD260 吸光值計算

DNA 濃度，計算方式為 OD260 為 1 時，DNA 濃度為 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，換算產量後再除以肌肉樣本重量，並換算成單位產量 ($\mu\text{g}/10\text{ mg}$) 以進行比較。

此外，將所萃取的 DNA，依據濃度測定結果，5 種萃取方法除簡單加熱法取 5 μL DNA 溶液外，餘均取 250 ng，加入 1 μL 6 倍追蹤染劑 (loading dye)，混合後注入含有 1% 瓊膠 (agarose gel) 樣本槽中進行電泳分析，電泳緩衝液使用 0.5 倍 Tris-acetate (TAE)，電泳後膠體浸泡在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 溶液中染色 1 分鐘，再以蒸餾水退染 10 分鐘，退染後於紫外燈下顯影，再由影像分析系統 (Bio Imaging System) 觀察和拍照，以分析軟體 (gene tools) 判讀結果。

四、聚合酶連鎖反應

(一) 微隨體

以吳郭魚基因連鎖輿圖第 3 對染色體上的微隨體 UNH106 及 GM139 基因座 (Lee, *et al.*, 2005)，利用基因資料庫 (GenBank) 查詢其序列及引子。得知 UNH106 引子對為 5'-CCTTCAGCATCCGTATAT-3' (forward) 和 5'-GTCTCTTTCTCTCTGTCACAAG-3' (reverse)，PCR 的 DNA 產物片段大小為 134 bp；GM139 引子對為 5'-GTGGGATCTACCAAGAAGAG-3' (forward) 和 5'-TTTGAGTAACCACCCTAACAC-3' (reverse)，PCR 的 DNA 產物片段大小為 237 bp。以此兩組引子對和 5 種方法萃取的 150 個 DNA 樣本進行微隨體 PCR 片段擴增與解析。

微隨體 PCR 反應液成分如下：萃取出的基因組 DNA 除簡單加熱法取 3 μL (因其純度差，以 OD260 吸光值計算 DNA 濃度可能失去正確性，故不定量) 餘各取 25 ng、引子對 (10 μM) 各 1 μL 、 MgCl_2 (25 mM) 1.5 μL 及 Taq Plus Mix (LAMDA BIOTECH) 12.5 μL ，加入無菌水至總體積為 25 μL 。將 PCR 反應液置於溫度循環機 (Bio-Rad) 中進行 PCR 反應。反應條件為： 94°C 預熱 5 分鐘，再以 94°C 變性 30 秒， 50°C 煉合 50 秒， 68°C 延展 30 秒，共經 25 個循環，結束後以 68°C 延展 7 分鐘使作用完全，再以 4°C 終止反應。將反應完成物以 1 倍 Tris-broate (TBE) 溶液等倍稀釋，並加入 2 μL 6 倍追蹤染劑，混合後取 10 μL 進

Table 1 Comparisons of the OD ratio and DNA yield with different DNA extraction from muscle tissues of tilapia

Method	OD260/OD280	Yield ($\mu\text{g}/10 \text{ mg}$)
Commercial kit method (DNeasy Blood & Tissue Kit)	1.80 ± 0.07^a	2.24 ± 0.99^d
Phenol-chloroform method	1.78 ± 0.05^a	4.57 ± 1.52^{cd}
Ammonium acetate method	1.79 ± 0.07^a	6.84 ± 1.61^{cb}
Protein salting-out method	1.70 ± 0.10^b	8.22 ± 2.54^b
Simple boiling method	0.80 ± 0.07^c	53.24 ± 10.65^a

Mean \pm S.D. (n = 30)Values within each column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

行非變性聚丙烯醯胺膠體電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)。UNH106 及 GM139 等兩種微體 PCR 產物中 UNH106 PCR 產物使用 10% PAGE；GM139 PCR 產物使用 12% PAGE。電泳緩衝液使用 0.5 倍 TBE，電泳時先經 90 伏特電壓 10 分鐘，再經 120 伏特電壓 80 分鐘，電泳後膠體浸泡在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EtBr 染色兩分鐘，再以蒸餾水退染 30 分鐘，退染後於紫外燈下顯影，再由影像分析系統觀察和拍照，並以分析軟體判讀結果。

(二) RAPD

從生技公司合成的 22 個 RAPD 引子，以 DNeasy Blood & Tissue Kit 萃取的基因組 DNA 作為模板，經由 PCR 反應篩選出 1 個產物電泳條帶可清楚辨識且再現性高的引子 5'-GACCGCTTGT-3'，再以此引子和 5 種方法萃取的 150 個 DNA 樣本進行 PCR 片段擴增與解析。

RAPD-PCR 反應液成分如下：萃取出來的基因組 DNA 除簡單加熱法取 3 μL 餘各取 25 ng、引子 (10 μM) 2 μL 、dNTP (10 mM) 0.5 μL 、DNA polymerase (10 mg/mL, LAMDA BIOTECH) 0.5 μL 及 PCR 反應液 (10 倍 w/MgCl₂, 東生生物科技股份有限公司) 2 μL ，加入無菌水至總體積為 25 μL 。將 PCR 反應液置於溫度循環機中進行 PCR 反應，反應條件為：94 $^{\circ}\text{C}$ 預熱 15 分鐘；再以 94 $^{\circ}\text{C}$ 變性 45 秒，42 $^{\circ}\text{C}$ 煉合 45 秒，72 $^{\circ}\text{C}$ 延展 1 分鐘，共經 30 個循環；結束後以 72 $^{\circ}\text{C}$ 延展 10 分鐘使作用完全，再以 4 $^{\circ}\text{C}$ 終止反應。將反應完成物加入 6 倍追蹤染劑 1 μL ，混合後取 10 μL 注入含有 1.6% 瓊膠樣本槽中進行電泳分析，電泳緩衝液使用 0.5

倍 TAE，電泳的條件為 125 伏特電壓 55 分鐘，電泳後膠體浸泡在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EtBr 染色 1 分鐘，再以蒸餾水退染 10 分鐘，退染後於紫外燈下顯影，再由影像分析系統觀察和拍照，並以分析軟體判讀結果。

五、統計分析

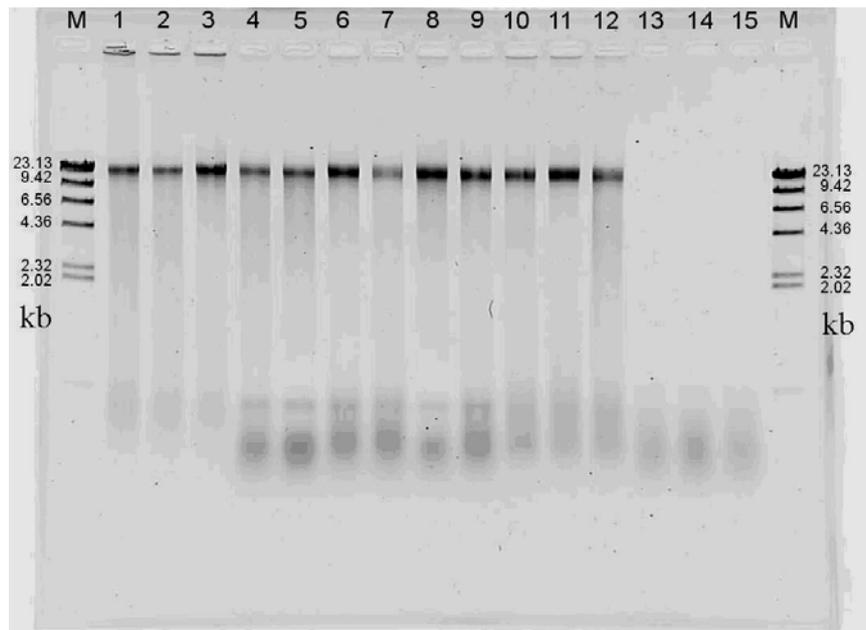
以變方分析 (ANOVA) 及鄧氏多變域測驗法 (Duncan's multiple range test) 比較 5 種方法萃取的 DNA 純度與產量，使用農委會 SAS 網路版軟體處理，差異顯著水準定在 $\alpha = 0.05$ 。以費氏精確測驗法 (Fisher exact test) (沈, 1993)，比較 5 種方法萃取的 DNA 有否成功擴增出 PCR 產物，差異顯著水準定在 $\alpha = 0.05$ 。

結果

一、DNA 純度與產量

用分光光度計測波長 260 nm 與 280 nm 之吸光值，以 OD 比值判斷 DNA 純度，5 種萃取方法各 30 個基因組 DNA 樣本 OD 比值，其平均值及標準偏差結果 (Table 1)。以變方分析及鄧氏多變域測驗法統計分析結果，商業套組法、酚-氯仿法及醋酸鉍法 3 者 OD 比值並沒有顯著差異 ($p > 0.05$)，但皆顯著高於蛋白質析出法和簡單加熱法 ($p < 0.05$)；而蛋白質析出法 OD 比值顯著高於簡單加熱法 ($p < 0.05$)。以 OD260 吸光值計算 DNA 濃度並換算成單位產量 ($\mu\text{g}/10 \text{ mg}$)，其平均值及標準偏差結果 (Table 1)。以變方分析及鄧氏多變域

Fig. 1 The genomic DNA extracted from tilapia by 5 different extraction methods. Lane M Lambda Hind III DNA marker, lane 1-3 Commercial kit method (DNeasy Blood & Tissue Kit), lane 4-6 Phenol-chloroform method, lane 7-9 Ammonium acetate method, lane 10-12 Protein salting-out method, lane 13-15 Simple boiling method.



測驗法統計分析結果，簡單加熱法 DNA 產量顯著高於其他 4 種方法 ($p < 0.05$)；蛋白質析出法產量和醋酸鉍法沒有顯著差異 ($p > 0.05$)，但顯著高於商業套組法和酚-氯仿法 ($p < 0.05$)；醋酸鉍法產量和酚-氯仿法沒有顯著差異 ($p > 0.05$)，但顯著高於商業套組法 ($p < 0.05$)；而酚-氯仿法產量和商業套組法沒有顯著差異 ($p > 0.05$)。

電泳分析經影像分析系統及分析軟體判讀結果，商業套組法、酚-氯仿法、醋酸鉍法及蛋白質析出法所萃取的 DNA 在 20 Kb 處呈現明顯單一的條帶，簡單加熱法則無。酚-氯仿法、醋酸鉍法、蛋白質析出法及簡單加熱法所萃取的 DNA 在 500 bp 以下存在明顯的淡暈帶，商業套組法所萃取的 DNA 則淡暈帶較不明顯 (Fig. 1)。若將酚-氯仿法、醋酸鉍法、蛋白質析出法及簡單加熱法萃取後的 DNA，再經核糖核酸酶作用處理，則部分淡暈帶即被去除，所以此淡暈帶部分應為 RNA；至於無法再被去除的部分，可能是碎片化之 DNA。

二、聚合酶連鎖反應

以 PCR 反應擴增 5 種萃取方法各 30 個基因組 DNA，以其擴增產物的有無及正確性來評估所萃取的基因組 DNA 其有效性及穩定性。

(一) 微隨體

以吳郭魚基因連鎖圖第 3 對染色體上微隨體 UNH106 及 GM139 基因座，經 PCR 擴增的片段大小應分別為 134 bp 和 237 bp，電泳分析經影像分析系統及分析軟體判讀結果，在 UNH106 的部分，5 種 DNA 萃取方法有成功擴增條帶的形態為在 112 bp 呈現明顯單一條帶或在 112 和 108 bp 有 2 條明顯條帶 (Fig. 2)；而在 GM139 的部分所呈現的形態則為在 270 bp 呈現明顯單一條帶或 270 和 262 bp 有 2 條明顯條帶 (Fig. 3)。全部樣本分析結果，商業套組法、酚-氯仿法、醋酸鉍法和蛋白質析出法所萃取的 DNA，經 PCR 擴增條帶之成功率皆 100% (30/30)；簡單加熱法，成功率則分別為 86.7% (26/30) 和 63.3% (19/30) (Table 2)。以費氏精確測驗法，比較成功率 100% 的 4 種萃取方法和簡單加熱法有否顯著差異，結果在 UNH106 的部分並沒有顯著差異 ($p > 0.05$)；而在 GM139 的部分則有顯著差異 ($p < 0.05$)。且簡單加熱法在 GM139 的部分雖然有 19 個樣本能擴增出條帶，但其所擴增的條帶較淡暈。

(二) RAPD

RAPD 經 PCR 擴增的片段大小電泳分析，經影像分析系統及分析軟體判讀在 1,500 bp 以下穩

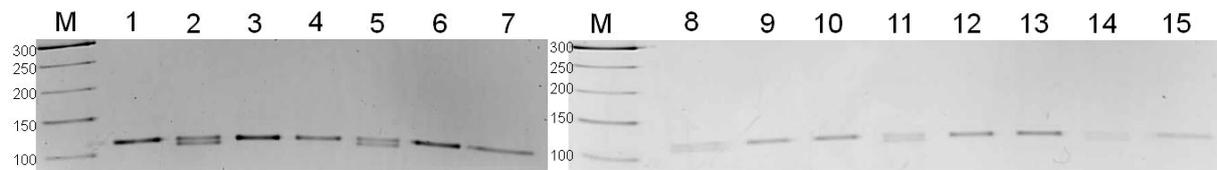


Fig. 2 The UNH106 gene fragments were amplified from genomic DNA extracted from tilapia, by 5 different extraction methods. Lane M 50 bp DNA Ladder, lane 1-3 Commercial kit method (DNeasy Blood & Tissue Kit), lane 4-6 Phenol-chloroform method, lane 7-9 Ammonium acetate method, lane 10-12 Protein salting-out method, lane 13-15 Simple boiling method. Lane 1, 4, 7, 10, 13 samples were fish 1; Lane 2, 5, 8, 11, 14 samples were fish 2; Lane 3, 6, 9, 12, 15 samples were fish 3.

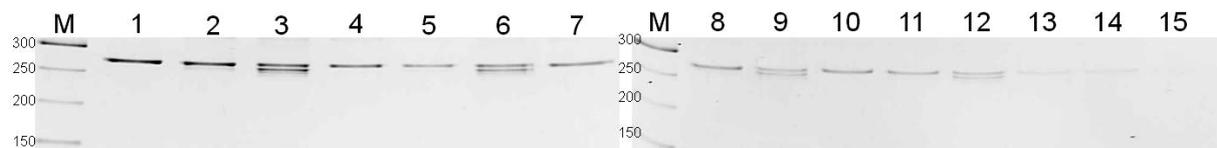


Fig. 3 The GM139 gene fragments were amplified from genomic DNA extracted from tilapia, by 5 different extraction methods. Lane M 50 bp DNA Ladder, lane 1-3 Commercial kit method (DNeasy Blood & Tissue Kit), lane 4-6 Phenol-chloroform method, lane 7-9 Ammonium acetate method, lane 10-12 Protein salting-out method, lane 13-15 Simple boiling method. Lane 1, 4, 7, 10, 13 samples were fish 1; Lane 2, 5, 8, 11, 14 samples were fish 2; Lane 3, 6, 9, 12, 15 samples were fish 3.

Table 2 Amplification of UNH106, GM139 and RAPD polymorphisms from muscle tissues of Tilapia, by different DNA extraction methods

Method	UNH106 (134bp)		GM139 (237bp)		RAPD 5'-GACCGCTTGT-3'	
	+	-	+	-	+	-
Commercial kit method (DNeasy Blood & Tissue Kit)	30	0	30	0	30	0
Phenol-chloroform method	30	0	30	0	30	0
Ammonium acetate method	30	0	30	0	30	0
Protein salting-out method	30	0	30	0	30	0
Simple boiling method	26	4	19	11	21	9
P-value	0.0562		0.0002*		0.0010*	

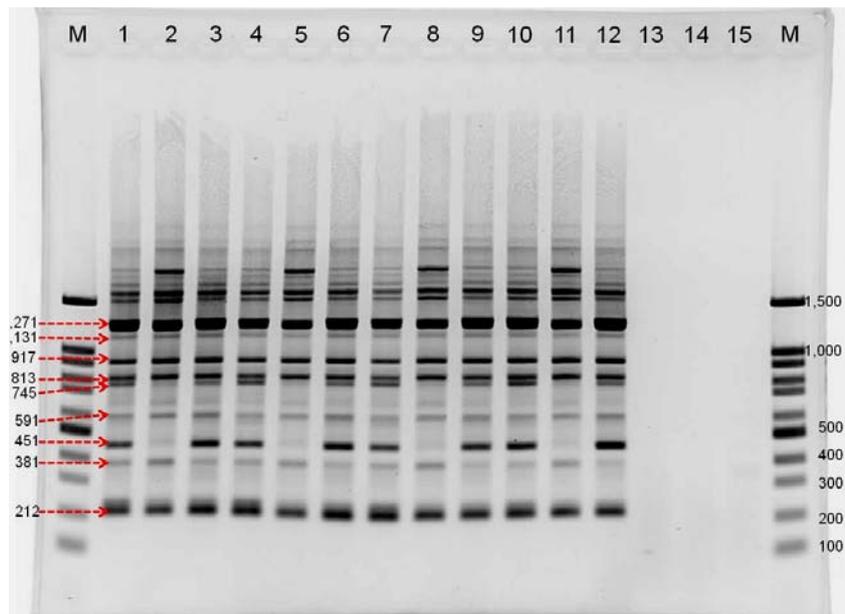
(+): Results obtained; (-): no results.

*Fisher exact test significant difference is $P < 0.05$

定呈現的條帶。結果商業套組法、酚-氯仿法、醋酸鉍法及蛋白質析出法所萃取的 DNA 經 PCR 反應，成功擴增可分析比較的主要條帶為 1271、1131、917、813、745、591、451、381、212 bp 共 9 條，其中 745 及 451 bp 條帶具多形性 (Fig. 4)；而簡單加熱法部分樣本僅能在 212 bp 呈現 1 條可分析條帶 (Fig. 5)。全部樣本分析結果，商業

套組法、酚-氯仿法、醋酸鉍法和蛋白質析出法所萃取的 DNA，經 PCR 擴增條帶之成功率皆 100% (30/30)；而簡單加熱法成功率則為 70.0% (21/30)，以費氏精確測驗法檢驗有顯著差異 ($p < 0.05$) (Table 2)。且簡單加熱法雖然有 21 個樣本能擴增出條帶，但其所擴增的條帶數並不足以進行 RAPD 的分析。

Fig. 4 The RAPD patterns were amplified from genomic DNA extracted from tilapia, by 5 different extraction methods. Lane M 100 bp DNA Ladder, lane 1-3 Commercial kit method (DNeasy Blood & Tissue Kit), lane 4-6 Phenol-chloroform method, lane 7-9 Ammonium acetate method, lane 10-12 Protein salting-out method, lane 13-15 Simple boiling method. Lane 1, 4, 7, 10, 13 samples were fish 1; Lane 2, 5, 8, 11, 14 samples were fish 2; Lane 3, 6, 9, 12, 15 samples were fish 3.



討 論

一、不同基因組 DNA 萃取方法在 DNA 純度與產量上的比較

相關核酸樣品純度之探討，OD 比值介於 1.8 ~ 2.0 表示核酸樣品的純度高，OD 比值 < 1.7 表示核酸樣品的純度不高，可能樣品中有蛋白質或酚殘留 (王等, 2006)。Taggart *et al.* (1992) 使用酚-氯仿所萃取的鮭魚組織 DNA，OD 比值介於 1.6 ~ 2.1，100 mg 新鮮肌肉組織可萃取出 50 μ g DNA。Garcia-Closa *et al.* (2001) 以酚-氯仿及商業套組法 (QIAamp kit, Qiagen) 萃取人類口腔黏膜細胞 (buccal cells) DNA，從每 1 次漱口量所萃取的 DNA，以酚-氯仿所萃取的 DNA 產量為 57.3 ~ 27.5 μ g，高於以商業套組法萃取的 DNA 產量 35.2 ~ 10.6 μ g。Cao *et al.* (2003) 使用石蠟包埋的組織樣本 (paraffin-embedded tissues) 以簡單加熱、酚-氯仿及商業套組法 (DNA Mini Kit, Qiagen) 等 3 種方法萃取 DNA，OD 比值分別為 1.13、1.79 及 1.71，產量分別為 48.6、6.0 及 9.0 μ g。以上這些學者使用簡單加熱、酚-氯仿或商業套組法，萃取不同生物組織 DNA，其結果皆與本研究有相同趨勢。本研究在酚-氯仿法及醋酸鉍法所萃取的 DNA，純度均能達到商業套組法所萃取的 DNA 純度 (OD 比值 1.80)；在 DNA 產量比較部分，醋

酸鉍法產量 (6.84 μ g/10 mg) 和酚-氯仿法 (4.57 μ g/10 mg) 無顯著差異，但顯著高於商業套組法 (2.24 μ g/10 mg)，並且無使用有毒的酚及氯仿，故在萃取高純度的 DNA 方面，醋酸鉍法是值得推薦的有效方法。而蛋白質析出法雖然在純度方面 (OD 比值 1.70) 不及商業套組法、酚-氯仿法及醋酸鉍法，但遠高於簡單加熱法 (OD 比值 0.80)；至於 DNA 產量上，蛋白質析出法 (8.22 μ g/10 mg) 與醋酸鉍法沒有顯著差異，但顯著低於簡單加熱法 (53.24 μ g/10 mg)，然而簡單加熱法純度差，可能導致其產量上的錯估。

二、不同基因組 DNA 萃取方法在本研究中微隨體和 RAPD 的應用結果探討

微隨體和 RAPD 近年來廣泛的應用在魚類遺傳育種及物種鑑定等方面研究上 (黃和劉, 2003; Rong *et al.*, 2002; Liu and Cordes, 2004; Chistiakov *et al.*, 2006)，本研究在微隨體方面選擇 2 個不同片段大小的基因座，分別為與體色有關的 UNH106 (134 bp) 及與性別有關的 GM139 (237 bp) (Lee, *et al.*, 2005)。微隨體基因座以其特定序列位點 (sequence tagged site, STS) 經由 PCR 所擴增的 DNA 片段大小，在電泳分析上須使用非變性 PAGE。PAGE 濃度 3.5 ~ 20.0%，適合分析 6 ~ 3,000 bp 大小之核酸 (王等, 2006)，本研究考慮 DNA 片

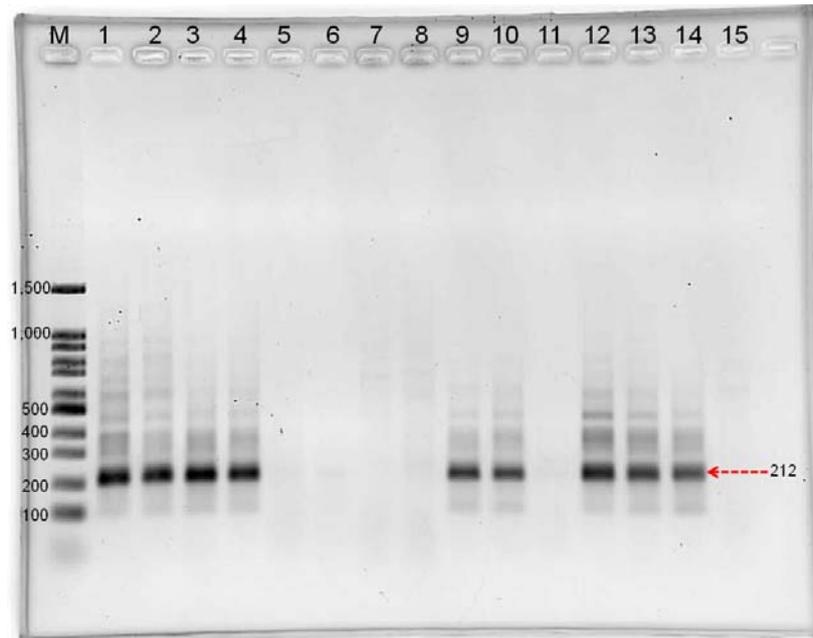


Fig. 5 The RAPD patterns were amplified from genomic DNA extracted from tilapia, by simple boiling method. Lane M 100 bp DNA Ladder, lanes 1-15 Simple boiling method.

段大小及解析度，分別使用 10% 和 12% PAGE 進行 UNH106 及 GM139 的 PCR 電泳分析。此外，以吳郭魚基因連鎖圖第 3 對染色體上微隨體 UNH106 及 GM139 基因座，其微隨體選殖自尼羅吳郭魚 (*Oreochromis niloticus*)，與本研究所用的吳郭魚不同，由於微隨體的解析度很高，故其 DNA 片段大小也會略有差異，本研究在 UNH106 的部分中 5 種萃取方法有成功擴增條帶的形態出現在 112 bp (呈現明顯單一條帶) 或在 112 和 108 bp (有 2 條明顯條帶)；而在 GM139 的部分所呈現的形態則為在 270 bp (呈現明顯單一條帶) 或 270 和 262 bp (有 2 條明顯條帶) 等 2 種形態。Song *et al.* (2008) 在橙色莫三比克吳郭魚 (*O. mossambicus*) 微隨體多樣性分析研究，在 UNH106 基因座有 2 個等位基因，大小在 113-138 bp，與本研究 (112 ~ 108 bp) 略有不同，可應證在不同吳郭魚其形態及片段大小確實會有不同，亦可據此分析其親緣性。

在 RAPD 電泳分析上，一般使用瓊膠濃度為 0.3~2.0%，適合分析 100 ~ 60,000 bp 大小之核酸 (王等, 2006)，本研究使用瓊膠濃度 1.6%，電泳分析 5 種方法有否成功擴增條帶，結果所呈現的形態為：商業套組法、酚-氯仿法、醋酸鉍法和蛋白質析出法均能在 1,500 bp 以下穩定呈現可分析比較的主要條帶 (1271 ~ 212 bp)，而樣本來自同 1 對親魚同 1 批次所產的仔魚，故其 RAPD 形態非

常類似，但來自同一尾魚以不方法所萃取的 DNA 樣本，其 RAPD PCR 擴增條帶形態相同，而不同尾魚其擴增條帶形態有差異，故仍有多型性 (polymorphism) 現象。而簡單加熱法則部分樣本僅能在 212 bp 呈現條帶，其所擴增的條帶數並不足以進行 RAPD 的分析。

三、不同基因組 DNA 萃取方法在 PCR 擴增片段大小成功率的探討

研究中微隨體的擴增分析結果，商業套組法、酚-氯仿法、醋酸鉍法和蛋白質析出法所萃取的 DNA，經 PCR 擴增條帶之成功率均為 100%，可應用在兩種片段大小 (UNH106 小片段 DNA 112 和 108 bp，GM139 較大片段 DNA 270 和 262 bp)；而簡單加熱法，成功率則分別為 86.7% 和 63.3%，僅適用於擴增小片段。RAPD 電泳分析 5 種方法有否成功擴增條帶，結果所呈現的形態為：商業套組法、酚-氯仿法、醋酸鉍法和蛋白質析出法均能穩定呈現 9 條明顯條帶 (1271 ~ 212 bp)，經 PCR 擴增條帶之成功率皆為 100%，而簡單加熱法雖然 70.0% DNA 樣本經由 PCR 能擴增出 DNA 片段，但則僅能在 212 bp 呈現明顯條帶，故此法並不適合應用在 RAPD 分析上。

Sepp *et al.* (1994) 研究發現以簡單加熱法所

萃取的 DNA，以 PCR 擴增的 DNA 片段最大僅能擴增 400 bp 片段大小。Chan 等人 (2001) 以微波法、酚-氯仿和商業套組法 (DNA Mini Kit) 萃取以石蠟包埋的子宮頸鱗狀癌細胞 (cervical squamous cell carcinoma)，結果酚-氯仿法能高成功率地擴增 β -globin (片段大小為 256 bp)，而商業套組法 (DNA Mini Kit, Qiagen) 則在 HPV DNA PCR 最有效。Cao *et al.* (2003) 在人類口腔黏膜細胞的 DNA 萃取及 PCR 擴增研究中，以簡單加熱法、酚-氯仿及商業套組法 (DNA Mini Kit, Qiagen) 等 3 種方法所萃取的 DNA 擴增 β -globin 的失敗率分別為 87.5%、5.9% 及 25%；至於擴增 GSTT1 (片段大小 459 bp)、GSTM1 (片段大小 219 bp) 及 GSTP1 (片段大小 176 bp) 等不同基因片段的穩定性方面，以前述 3 種方法各萃取 16 個 DNA 樣本進行 PCR 試驗，簡單加熱法所萃取的 DNA 皆無法以 PCR 擴增出 DNA 片段，效果顯著比酚-氯仿法和商業套組法差。在人類膀胱和肺臟石蠟包埋的組織以簡單加熱法、酚-氯仿和商業套組法 (DNA Mini Kit, Qiagen) 萃取 DNA，進行 β -globin PCR 擴增，簡單加熱法和酚-氯仿萃取 DNA 的 PCR 成功率分別為 88.2 和 85.3%，而使用商業套組法雖然 DNA 純度高於簡單加熱法，但 DNA 濃度較低，所以成功率僅有 52.9% (Cao *et al.*, 2003)。在原生動物的 DNA 萃取及 PCR 應用研究上，以蛋白質析出法、酚-氯仿和商業套組法 (DNA Mini Kit, Qiagen) 萃取 DNA，在 PCR 的應用上蛋白質析出法、酚-氯仿和商業套組法有相同的效果 (Rotureau *et al.*, 2005)。從以上不同學者針對不同生物組織樣本，以不同基因組 DNA 萃取方法，所進行的 PCR 擴增研究結果皆與本研究有相同的趨勢，即商業套組法、酚-氯仿法、醋酸鉍法和蛋白質析出法所萃取的 DNA 可有效應用在微隨體及 RAPD 的 PCR 擴增研究；簡單加熱法在有效擴增 DNA 的片段大小及成功率則有一定的限制。然而 Yue and Orban (2005) 以簡單加熱法萃取魚鱗、肌肉組織和整尾斑馬魚仔魚 DNA，認為以此法所萃取的 DNA 可有效應用在微隨體、粒線體之 RAPD-PCR 擴增研究，其結論與本研究認為簡單加熱法不適合使用在 RAPD 分析上有所不同，原因可能是其所使用的消化液配方不同 (配方：5 % w/v Chelex 100 resin、0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ proteinase K)，或是其 RAPD-PCR 煉合溫度較低所導致的結果。

四、不同基因組 DNA 萃取方法在南方點墨法的應用性探討

以不同基因組 DNA 萃取方法，應用在南方點墨法 (Southern blot) 的可行性方面，Harris *et al.* (1991) 及 Taggart *et al.* (1992) 使用酚-氯仿萃取魚類組織 DNA 可從事南方點墨法研究。在斑馬魚基因轉殖與表現的研究方面，若是僅用於 PCR 擴增分析，則以簡單加熱法即可；若要進行南方點墨法或點墨法 (dot-blot) 分析，DNA 的萃取須使用酚-氯仿 (Amsterdam *et al.*, 1995; Higashijima *et al.*, 1997; Cretekos and Grunwald, 1999)。而 Davidson *et al.* (2003) 以含有蛋白酶的消化液消化斑馬魚胚胎組織，再以異丙醇 (isopropanol) 沉澱 DNA (類似本研究的蛋白質析出法)，所萃取的 DNA 可進行南方點墨法分析。因此，本研究商業套組法、酚-氯仿法、醋酸鉍法及蛋白質析出法，可嘗試應用於南方點墨法。

五、萃取後的基因組 DNA 冰存問題探討

至於萃取後的基因組 DNA 能存放多久的問題，Taggart *et al.* (1992) 研究經驗，使用 Miller *et al.* (1988) 無毒的鹽析法 (類似本研究的蛋白質析出法) 所萃取的 DNA 比使用酚-氯仿所萃取的 DNA，存放後可能更易降解。Yue and Orban (2005) 以簡單加熱法萃取 DNA 的研究，認為所萃取的 DNA 可存放在 4 °C 2 個月和 -20 °C 至少半年，不會影響到 PCR 擴增結果。本研究以不同方法所完成萃取的 DNA 冰存於 -25 °C，冰存 6 個月後取出部分樣本，以同樣方法再進行微隨體和 RAPD-PCR 分析，結果微隨體 PCR 和之前結果相同；而 RAPD-PCR 部分，以商業套組法、酚-氯仿法、醋酸鉍法及蛋白質析出法冰存的 DNA 樣本，結果和冰存之前相同，而簡單加熱法原能擴增出 212 bp 條帶的 DNA 樣本，冰存後則無法再擴增出任何條帶。

總 結

本研究中所建立的操作技術在酚-氯仿法及醋酸鉍法能達到商業套組法的水準，而醋酸鉍法

的使用能避免使用具毒性的酚及氯仿，在萃取高純度的 DNA 方面是值得推薦的有效方法。此外，蛋白質析出法及簡單加熱法，具有經濟、快速、安全及簡便性，雖然在本研究中 DNA 純度無法達到商業套組法的水準，但是蛋白質析出法可應用在微隨體及 RAPD 等 PCR 的擴增分析，而簡單加熱法則在微隨體小片段 DNA 的 PCR 擴增上具有相當的應用價值。

參考文獻

- 王之仰, 江友中, 沈朋志, 邱明堂, 張誌益, 莊國賓, 陳福旗, 陳又嘉, 廖明輝, 劉宏仁, 鄭雪玲 (2006) 生物技術實習. 國立屏東科技大學農學院叢書系列, 262 pp.
- 吳美莉, 許祥純, 莊秀琪, 邱謝聰 (2006) 生物化學實習. 國立屏東科技大學農學院叢書系列, 211 pp.
- 沈明來 (1993) 試驗設計學. 九州圖書文物有限公司, 台北, 617 pp.
- 張湧泉, 陳榮華, 張格銓, 劉富光 (2008) RAPD 及 PCR-RFLP 生物技術應用在台灣紅色吳郭魚之選擇育種研究. 水產研究, 16(1): 29-37.
- 黃家富, 劉富光 (2003) DNA 指紋分子標記技術. 水試專訊, 3: 1-10.
- Amsterdam, A., S. Lin and N. Hopkins (1995) The *Aequorea Victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. Dev. Biol., 171(1): 123-129.
- Cao, W., M. Hashibe, J. Y. Rao, H. Morgenstern and Z. F. Zhang (2003) Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. Cancer Detect. Prev., 27(5): 397-404.
- Chan, P. K., D. P. Chan, K. F. To, M. Y. Yu, J. L. Cheung and A. F. Cheng (2001) Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. J. Clin. Pathol., 54(5): 401-403.
- Chistiakov, D. A., B. Hellemans and F. A. M. Volckaert (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics, Aquaculture, 255(1-4): 1-29.
- Cretekos, C. J. and D. J. Grunwald (1999) Alyron, an insertional mutation affecting early neural crest development in zebrafish. Dev. Biol., 210(2): 322-338.
- Davidson, A. E., D. Balciunas, D. Mohn, J. Shaffer, S. Hermanson, S. Sivasubbu, M. P. Cliff, P. B. Hackett and S. C. Ekker (2003) Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. Dev. Biol., 263: 191-202.
- Garcia-Closas, M., K. M. Egan, J. Abruzzo, P. A. Newcomb, L. Titus-Ernstoff, T. Franklin, P. K. Bender, J. C. Beck, L. Le Marchand, A. Lum, M. Alavanja, R. B. Hayes, J. Rutter, K. Buetow, L. A. Brinton and N. Rothman (2001) Collection of genomic DNA from adults in epidemiological studies by buccal cytobrush and mouthwash. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 10(6): 687-696.
- Harris, A. S., S. Bieger, R. W. Doyle and J. M. Wright (1991) DNA fingerprinting of tilapia, *Oreochromis niloticus*, and its application to aquaculture genetics. Aquaculture, 92: 157-163.
- Higashijima, S. I., H. Okamoto, N. Ueno, Y. Hotta and G. Eguchi (1997) High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. Dev. Biol., 192(2): 289-299.
- Kumar, R., P. J. Singh, N. S. Nagpure, B. Kushwaha, S. K. Srivastava and W. S. Lakra (2007) A non-invasive technique for rapid extraction of DNA from fish scales. Indian J. Exp. Biol., 45(11): 992-997.
- Lee, B.Y., W. J. Lee, J. T. Strelman, K. L. Carleton, A. E. Howe, G. Hulata, A. Slettan, J. E. Stern, Y. Terai and T. D. Kocher (2005) A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.). Genetics, 170(1): 237-244.
- Liu, Z. J. and J. F. Cordes (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture, 238(1-4): 1-37.
- Medina-Acosta, E. and G. A. Cross (1993) Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. Mol. Biochem. Parasitol., 59(2): 327-329.
- Meeker, N. D., S. A. Hutchinson, L. Ho and N. S. Trede (2007) Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. Biotechniques, 43(5): 610-614.
- Miller, S. A., D. D. Dykes and H. F. Polesky (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res., 16(3): 12-15.
- Rong, Z., M. Wu and H. Yin (2002) *Danio rerio* fingerprinting study using amplified polymorphic DNA. Shanghai Environ. Sci., 21: 350-352.

- Rotureau, B., A. Gego, and B. Carne (2005) Trypanosomatid protozoa: A simplified DNA isolation procedure. *Exp. Parasitol.*, 111(3): 207-209.
- Sepp, R., I. Szabo and H. Uda (1994) Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. *J. Clin. Pathol.*, 47: 318-323.
- Song, H. M., J. J. Bai, X. Ye and Y.F. Liu (2008) Genetic diversity analysis of red *Oreochromis mossambicus* with microsatellites and selection of differential loci between red *O. mossambicus* and *O. niloticus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 15(3): 400-406.
- Taggart, J. B., R. A. Hynes, P. A. Prodöhl and A. Ferguson (1992) A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J. Fish Biol.*, 40: 963-965.
- Truett, G. E., P. Heeger, R. L. Mynatt, A. A. Truett, J. A. Walker and M. L. Warman (2000) Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*, 29(1): 52, 54.
- Yue, G. H. and L. Orban (2005) A simple and affordable method for high-throughput DNA extraction from animal tissues for polymerase chain reaction. *Electrophoresis*, 26(16): 3081-3083.

附錄一、酚-氯仿法

1. 取冰存的背部肌肉樣本，加入 500 μL 消化液，放入 55 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱裡的震盪機上輕搖，至組織完全消化 (約 2~3 小時)。
2. 加入 2 μL RNase A solution (5 mg/mL)，上下反轉數次，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 乾浴加熱器作用 30 分鐘。
3. 加入 500 μL 酚-氯仿-異戊醇混合溶液，上下反轉均勻混合後 (使上層呈白濁即可)，以 12,100 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 5 分鐘。
4. 取 400 μL 上清液置於新的微量離心管，加入 800 μL 無水酒精，上下反轉均勻混合。
5. 樣本置於 -70 $^{\circ}\text{C}$ 沉澱 1 小時，以 12,100 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 20 分鐘後，小心吸除上清液。
6. 加入 500 μL 70% 酒精，以 12,000 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 5 分鐘後，小心吸除上清液。
7. 於室溫陰乾 DNA (約 10 分鐘)，加 100 μL TE 溶液回溶 DNA，冰存於 -25 $^{\circ}\text{C}$ 。

附錄二、醋酸鉍法

1. 取冰存的背部肌肉樣本，加入 500 μL 消化液，放入 55 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱裡的震盪機上輕搖，至組織完全消化 (約 2~3 小時)。
2. 加入 2 μL RNase A solution (5 mg/mL)，上下反轉數次，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 乾浴加熱器作用 30 分鐘。
3. 加入 200 μL 10 M 醋酸鉍，上下反轉均勻混合後，以 12,100 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 5 分鐘。

4. 取 600 μL 上清液置於新的微量離心管，加入 1,200 μL 無水酒精，上下反轉均勻混合。
5. 樣本置於 -70 $^{\circ}\text{C}$ 沉澱 1 小時，以 12,100 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 20 分鐘後，小心吸除上清液。
6. 加入 500 μL 70% 酒精，以 12,000 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 5 分鐘後，小心吸除上清液。
7. 於室溫陰乾 DNA (約 10 分鐘)，加 100 μL TE 溶液回溶 DNA，冰存於 -25 $^{\circ}\text{C}$ 。

附錄三、蛋白質析出法

1. 取冰存的背部肌肉樣本，加入 500 μL 消化液，放入 55 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱裡的震盪機上輕搖，至組織完全消化 (約 2~3 小時)。
2. 加入 1,000 μL 無水酒精，上下反轉均勻混合。
3. 樣本置於 -70 $^{\circ}\text{C}$ 沉澱 30 分鐘，以 12,100 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 20 分鐘後，小心吸除上清液。
4. 於室溫陰乾 DNA (約 10 分鐘)，加 100 μL TE 溶液回溶 DNA，冰存於 -25 $^{\circ}\text{C}$ 。

附錄四、簡單加熱法

1. 取冰存的背部肌肉樣本，加入消化液 100 μL ，放入 55 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱裡的震盪機上輕搖，至組織完全消化 (約 2~3 小時)。
2. 樣本置於 97 $^{\circ}\text{C}$ 乾浴加熱器加熱 5 分鐘，使 proteinase K 失去活性。以 12,100 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 5 分鐘，直接將離心管冰存於 -25 $^{\circ}\text{C}$ 。

Comparison of Methods for Genomic DNA Extraction from Tilapia

Chun-Shin Yu, Fu-Shen Tseng*, Huei-Jen Chu, Shiarn-Chiang Chou,
Min-Yih Lu and King-Jung Lin

Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

This study was to find an accurate, fast, cheap, stabile and no-toxic genomic DNA extracting method for tilapia. Purity, yield and PCR amplified microsatellite and RAPD of extracted DNA from (1) commercial kit method (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen); (2) phenol-chloroform method; (3) ammonium acetate method; (4) protein salting-out method and (5) simple boiling method were compared. Methods (2) to (4) were modified to fit the sample.

In DNA purity, the phenol-chloroform method and ammonium acetate method were as good as commercial kit method ($p>0.05$); and the protein salting-out method was worse than phenol-chloroform method and ammonium acetate method ($p<0.05$), but far higher than simple boiling method ($p<0.05$). In DNA yield, the simple boiling method was the highest ($p<0.05$), but its purity was poor. The DNA yield of protein salting-out method and ammonium acetate method were not difference ($p>0.05$), but higher than commercial kit method and phenol-chloroform method ($p<0.05$); the ammonium acetate method and phenol-chloroform method were not difference ($p>0.05$), but higher than commercial kit method ($p<0.05$).

The PCR amplifications of microsatellite UNH106 and GM139 were successful in 30 of 30 (100%) by commercial kit method, phenol-chloroform method, ammonium acetate method, and protein salting-out method, 26 of 30 (86.7%) and 19 of 30 (63.3%) by simple boiling method. The PCR amplifications of RAPD were successful in 30 of 30 (100%) by commercial kit method, phenol-chloroform method, ammonium acetate method, and protein salting-out method, and 21 of 30 (70.0%) by simple boiling method. Although there were 21 samples from simple boiling method that could be amplified from RAPD-PCR, but the number of bands were not enough to run RAPD test.

The results showed that protein salting-out method and simple boiling methods were not effectively to extract pure DNA. Among the phenol-chloroform method, ammonium acetate method and commercial kit method, the study would recommend ammonium acetate method due to effective, cheap and no toxic solvent use.

Key words: tilapia, DNA extraction, microsatellite, RAPD

*Correspondence: Aquaculture Division, Fisheries Research Institute, 199 Hou-Ih Rd., Keelung 202, Taiwan. TEL: (02) 24633101; FAX: (02)24628138; E-mail: fstseng@mail.tfrin.gov.tw