

一种有效纯化低拷贝质粒 DNA 的改良硅藻土法

余宏傲 张岚岚 徐昌杰*

(浙江大学园艺系, 农业部园艺植物生长发育与生物技术重点开放实验室, 杭州 310029)

摘要 碱法制备的低拷贝质粒因含有大量杂质而无法获得有效的测序结果。为此, 以纯 λ DNA 为样品, 对硅藻土纯化 DNA 的方法进行了优化, 表明硅藻土悬液的最佳用量是 20 μ l/ μ g λ DNA, 回收率达 77.31%。应用此改良硅藻土法纯化一长为 14 953 bp 的低拷贝质粒 pLZ14, 所得质粒纯度达 23.87%, 比未纯化前提高了 11.06 倍。经纯化的 pLZ14 质粒测序信号强、无误认碱基, 而未经纯化的质粒测序时信号弱、错误普遍存在。

关键词 硅藻土; 盐酸胍; 质粒; DNA 纯化

植物表达载体的构建是植物转基因研究的必要环节, 在应用于转基因研究之前, 植物表达载体的正确性需要得到鉴定。鉴定表达载体正确与否的常用方法有 PCR、酶切和测序。PCR 鉴定最简便, 但载体上重复序列(如 pBI121 有两处 NOS 终止子序列)的存在有时对鉴定带来麻烦, 另外偶而发生的不是在预期的酶切位点的连接不能被有效发现; 酶切鉴定在实际操作中经常遇到难以切开或酶切结果难以解释等问题; 测序是最可靠也是最有说服力的鉴定方法, 商业化的测序服务使得一周内即可对植物表达载体的正误作出判断。

对于克隆于 pUC 或 pBS 等高拷贝质粒中的插入片段, 商业化测序具有接近 100% 的成功率, 而植物表达载体的测序成功率往往较低, 有时测序公司需要多次优化调整方能获得结果, 但所得的测序图谱仍然不够理想, 测序错误普遍存在。究其原因, 是因为植物表达载体大多属于低拷贝质粒, 质粒样品 DNA 的纯度远低于高拷贝质粒 DNA。因而, 由研究者向测序公司提供经纯化的质粒样品较为理想。

商业化测序公司在质粒提取和纯化过程中通常也应用了各种来源的质粒提取和纯化试剂盒, 这表明这些试剂盒仍不足以实现低拷贝质粒的有效纯化。而且, 在实际应用经历中, 我们发现不同批次的试剂盒纯化效果的不一致性也十分常见。因而, 建立一种稳定的可重复的适于低拷贝质粒纯化的方法十分必要。

自 Vogelstein 等^[1]发明应用玻璃粉或硅石粉以及高浓度 NaI 纯化 DNA 以来, 这一方法得到了持续不断的改进和应用^[2-23]。目前多数方法应用硅石粉为

DNA 的吸附介质, 但也有研究^[3,4,14,16,17]发现硅藻土也同样有效。同时, 用胍盐(盐酸胍^[19,22]或异硫氰酸胍^[3-6,16,22])取代 NaI 也比较普遍, 可避免 NaI 试剂久贮变色及 pH 升高导致的低回收率问题。然而, 先前的方法均没有就硅藻土等吸附介质的用量、回收率以及纯化效果等进行定量描述, 因而也就在一定程度上导致了纯化效果和回收率的低重复性, 影响了方法的推广应用。本研究对以往方法中的吸附介质用量进行了优化, 建立了一种回收率较高、纯化效果显著、操作简便、重复性好的质粒纯化方法, 并用此方法对一低拷贝质粒进行了纯化并用于测序, 获得了十分理想的结果。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 质粒与菌株 所应用的质粒 pLZ14 是一种基于 pBI121 的植物表达载体, 长 14 953 bp, 是一种低拷贝质粒。所应用的大肠杆菌菌株为 TG1。

1.1.2 硅藻土的制备 称取 1 g 硅藻土(Celite 545, Fluka), 用 5 ml 蒸馏水悬浮并轻轻倒入已装有 45 ml 蒸馏水的 Falcone 管中, 4 min 后回收悬浊液, 悬浊液再经 1 300 g 离心 0.5 min, 弃上清液。离心所得的颗粒用等体积蒸馏水悬浮, 经高压灭菌后 4 °C 保存备用。

收稿日期: 2005-04-05 接受日期: 2005-06-10

国家自然科学基金(No.30370989, No.30100125)和浙江省自然科学基金(No.301291)资助

* 通讯作者。Tel: 0571-85952426, Fax: 0571-86049815, E-mail: chjxu@zju.edu.cn

1.1.3 试剂 盐酸胍为上海生工生物工程有限公司产品, λ DNA 为 TaKaRa 产品, 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 细菌的培养和质粒的提取 按《分子克隆实验指南》常规碱裂解法^[24]进行。

1.2.2 质粒 DNA 的定量 质粒 DNA 样品与已知含量的 λ DNA 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 拍摄电泳照片, 再用 BandScan 4.50 软件进行定量。

1.2.3 DNA 纯化标准方案 ①在 DNA 样品中加入适量硅藻土悬浮液(根据电泳定量结果, 每微克质粒加入 20 μ l 硅藻土悬浮液), 混匀; ②加入 3 倍于质粒 DNA 样品及硅藻土悬浮液总体积的 6 mol/L 盐酸胍(含 50 mmol/L Tris, 20 mmol/L EDTA, pH 7.0~8.0), 混匀, 冰上放置 15 min, 每分钟混匀 1 次(轻弹多下促使充分悬浮); ③ 12 000 r/min 离心 5 min, 吸弃上清液, 沉淀用 70% 乙醇悬浮; ④重复步骤③; ⑤ 12 000 r/min 离心 5 min, 充分吸弃上清液, 沉淀于 37 $^{\circ}$ C 干燥 10 min; ⑥加入经 70 $^{\circ}$ C 预热的 100 μ l TE, 70 $^{\circ}$ C 保温 10 min, 每分钟混匀 1 次(轻弹多下促使充分悬浮), 12 000 r/min 离心 5 min; ⑦小心吸取上清液至新管, 重复步骤⑥, 将两次上清液合并, 于 12 000 r/min 离心 5 min, 小心吸取上清液至新管; ⑧加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH 5.2)和等体积异丙醇, 混匀, 置室温 10 min 后于 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 沉淀用 70% 乙醇漂洗后于 37 $^{\circ}$ C 充分干燥; ⑨溶于适量体积的 TE, 如用于回收率比较, 则恢复至纯化前的体积。

1.2.4 硅藻土最佳用量的确定 取 6 个 1.5 ml 离心管, 每管加入 1 μ g λ DNA(20 μ l), 分别加入 1、2、5、10、20 和 50 μ l 硅藻土, 用蒸馏水补充至总体积 70 μ l, 随后按 DNA 纯化标准方案步骤②~⑧进行, 最后 DNA 溶于 20 μ l TE, 取 5 μ l 电泳检测, 并以 5 μ l 未经纯化的 λ DNA 为对照。

1.2.5 质粒纯度的定义以及纯化倍数的计算 分别应用电泳法(1.2.2)和测定 A_{260} 法对质粒 DNA 的浓度进行定量, 在本研究中, 质粒的纯度定义为电泳法定量结果与 A_{260} 法定量结果的比值, 纯化倍数 = 纯化后的纯度 / 纯化前的纯度。

1.2.6 测序 由上海生工生物工程有限公司完成。

2.1 硅藻土最佳用量

研究表明, 硅藻土的合适用量对于 DNA 的回收十分重要, 过多过少地使用均不利于回收。最佳用量是每微克 DNA 样品中加入 20 μ l 硅藻土悬浮液, 此时回收率达 77.31%。硅藻土悬浮液用量为 10 μ l 和 50 μ l 时的回收率分别为 65.97% 和 63.48%(图 1)。

2.2 pLZ14 质粒纯化的回收率和纯化倍数

应用所建立的 DNA 纯化标准方案, 对碱法提取的 pLZ14 质粒进行了纯化, 并对纯化前后的质粒纯度进行了计算。纯化后质粒电泳结果如图 2 所示, 表明质粒得到了有效回收, 经过 BandScan 分析表明, 回收率达 76.2%。另外, 通过纯化有效地去除了质粒样品中的小分子 RNA(图 2)。

质粒样品中不可避免地含有杂质, 有些杂质会造成 A_{260} 吸收, 从而使得通过 A_{260} 计算的 DNA 含量大大超出通过电泳法计算的含量, 超出程度越大, 表明 DNA 纯度越低。pLZ14 质粒纯化前的纯度为 1.98%, 远低于用相同方法提取所得的 pUC19 质粒的纯度(17.60%)。经过纯化, pLZ14 质粒样品的

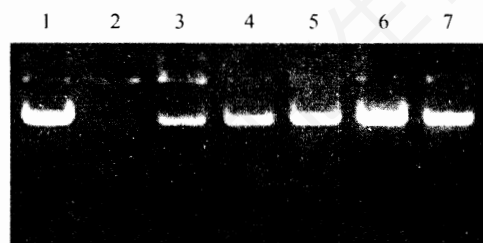


图 1 硅藻土用量对 DNA 回收的影响

1: 纯化前; 2~7: 分别应用 1、2、5、10、20 和 50 μ l 硅藻土悬浮液。

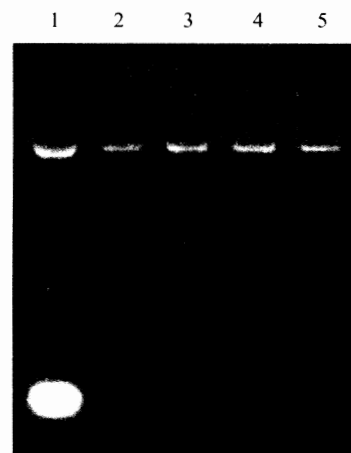


图 2 硅藻土法对 pLZ14 质粒 DNA 的纯化

1: 纯化前; 2~5: 纯化后。

2 结果

纯度上升至 23.87%，比纯化前提高了 11.06 倍。

2.3 质粒纯化对测序结果的影响

对未经纯化(指未经本研究纯化,但测序公司的质粒制备过程中包括了常规纯化步骤)和经过纯化的质粒进行测序,获得了截然不同质量的测序结果(图 3)。经过与已知序列对比分析,在所选区域中,经纯化的质粒的测序结果与预计结果完全一

致,而未经纯化的质粒的测序结果中普遍存在不能判断碱基、碱基判断出错以及碱基数判断失误等错误(表 1)。表明未经本研究纯化的质粒不宜测序,也表明经过硅藻土纯化的质粒达到了测序要求。

3 讨论

硅藻土是古生物硅藻残骸的沉积物,是一种多孔

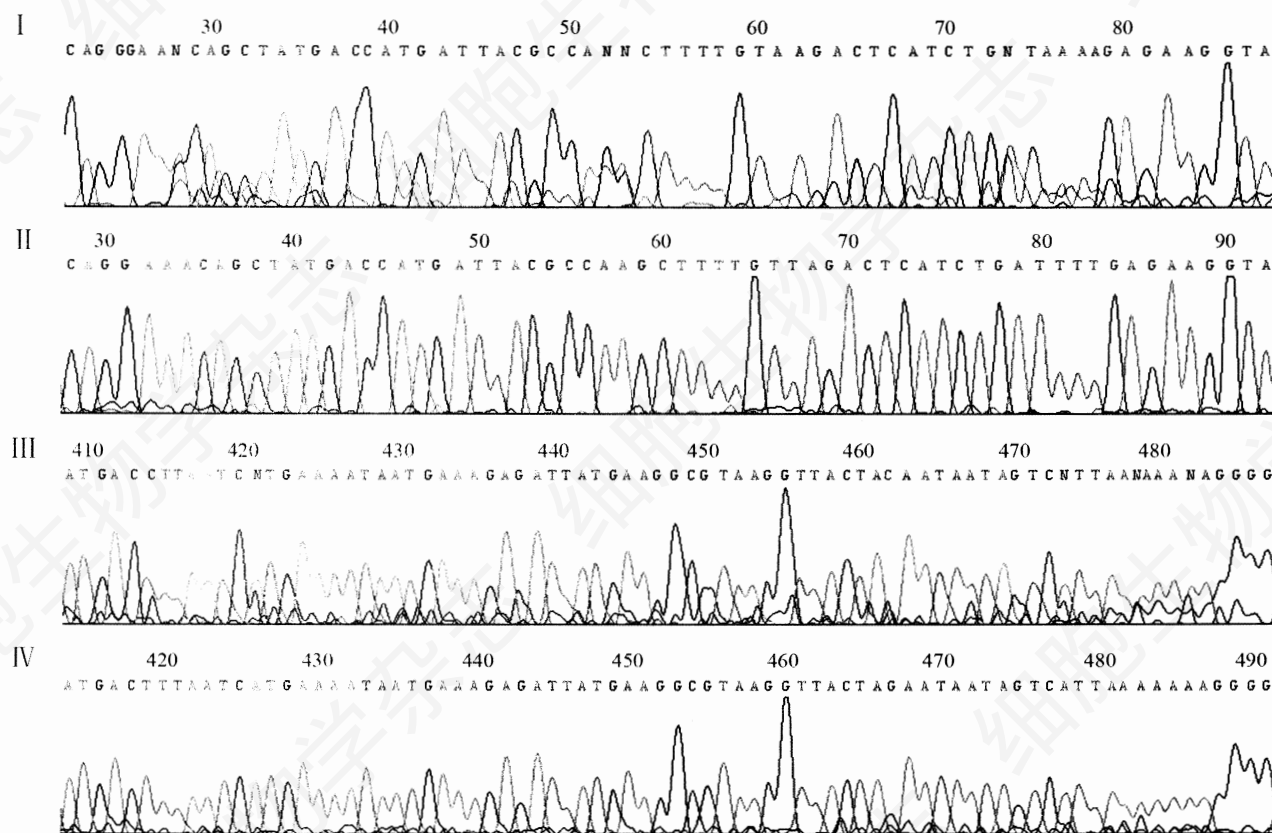


图 3 未经纯化和经过纯化的质粒测序图谱

I、III: 未经纯化的质粒测序图谱; II、IV: 经纯化的质粒测序图谱。

表 1 未经纯化的 pLZ14 质粒在测序时发生的差错

发生差错的碱基	在图谱中的位置	对应的正确碱基	在图谱中的位置	差错类型
N	I(28*)	A	II(34)	未能判断碱基
N	I(52)	A	II(58)	未能判断碱基
N	I(53)	G	II(59)	未能判断碱基
N	I(73)	A	II(79)	未能判断碱基
N	III(421)	A	IV(426)	未能判断碱基
N	III(473)	A	IV(478)	未能判断碱基
N	III(478)	A	IV(483)	未能判断碱基
N	III(482)	A	IV(487)	未能判断碱基
A	I(61)	T	II(67)	碱基判断出错
AAAA	I(56~58)	TTT	II(81~83)	碱基判断出错
C	III(414)	T	IV(419)	碱基判断出错
C	III(462)	G	IV(467)	碱基判断出错
GGG	I(23~25)	GG	II(30~31)	碱基判断出错

* 出现在图 3 I 的 28 位,其余以此类推。

非晶体硅石, 比较易得和便宜。在 DNA 纯化中应用的硅藻土是白硅藻土, 其 SiO_2 含量一般较高(>80%), 而且几乎不含有有机物, 使用前不必经过酸洗^[4]。但无论是普通硅石粉还是硅藻土粉, 在使用前大多要进行分级, 以去除过粗和过细的颗粒。

颗粒大小对 DNA 吸附能力有显著影响, 研究表明^[1], 沉降速度为 6 cm/min、1 cm/min 和 0.25 cm/min 的颗粒的 DNA 吸附能力约分别为 0.009 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、0.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和 2.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。细小颗粒具有较大的 DNA 吸附容量, 然而那些通过离心不能有效沉降的过于细小的颗粒势必导致 DNA 回收率的下降以及最终 DNA 样品中细微颗粒的残留。过粗颗粒因 DNA 吸附能力极弱也不宜应用。因而, 本研究去除了沉降速度大于 2 cm/min(50 ml Falcone 管中装入 45 ml 水后液面高度约为 8 cm, 沉降了 4 min)的粗颗粒, 并通过低速短暂离心去除过细颗粒, 保证了合适的 DNA 吸附能力和回收率。研究表明, 为吸附 1 μg λDNA , 以加入 20 μl 硅藻土悬浮液(约含 10 mg 硅藻土颗粒)最为合适, 因而硅藻土颗粒的吸附能力约为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。考虑到本研究硅藻土颗粒的沉降速度大多介于 1~2 cm/min 之间, 这一结果与 Vogelstein 等^[1]的结果比较相近。王柏秋等^[7]提及的一种吸附能力达 3~4.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 的二氧化硅基质可能是一种较细的颗粒。我们发现如果舍弃沉降速度介于 1~2 cm/min 之间的颗粒, 则每克硅藻土试剂可制得的硅藻土悬浮液急剧减少。鉴于不同厂商或不同批次生产的硅藻土颗粒粗细可能有所不同, 也许本研究使用的硅藻土并不是最适于 DNA 纯化的品牌。另外, 有些研究者不进行颗粒分级而直接使用, 在这种情况下宜对硅藻土产品进行 DNA 吸附能力的测定, 否则实验的重复性难以得到有效保证。

合适的硅藻土用量是保证 DNA 纯化效果和回收率的关键, 这不仅需要对颗粒 DNA 吸附能力进行测定, 还要求对进行纯化的 DNA 进行精确定量。传统的 DNA 定量是通过测定 A_{260} 进行, 实际上这一方法很不可靠, 因为 DNA 样品中含有大量可导致 A_{260} 吸收的杂质。本研究采用凝胶电泳法对样品的 DNA 含量进行定量, 保证了定量的精确性和实验的重复性。另外, 紫外吸收定量结果高出电泳定量结果越多, 在一定程度上反映 DNA 越不纯, 因而本研究将 DNA 纯度定义为电泳定量结果和紫外吸收定量结果的比值, 尽管这一 DNA 纯度结果与真实的 DNA

纯度结果可能有所偏离, 但鉴于目前没有其他有效的简便方法可对 DNA 真实纯度进行估计, 因而这一纯度概念的提出仍属必要。通过计算, 我们发现 pLZ14 质粒样品的纯度仅为 1.98%, 如果测序时质粒 DNA 的浓度是根据 A_{260} 计算而来, 那么由于测序反应中模板用量过少, 测序信号弱甚至失败应在情理之中。另外, 质粒样品中过多杂质的存在抑制了测序酶的活性, 也是导致测序失败的主要原因。

硅石(含硅藻土)粉法可适用的 DNA 长度范围较宽, Boom 等^[3]研究表明可纯化低至 40~60 bp, 高至 48 kb 的 DNA。朱帆等^[23]认为玻璃粉吸附的核酸长度限制在 0.5~5 kb 之间, 这一观点与众多报道不符, 我们以 48 kb 的 λDNA 为试验 DNA, 最高回收率达 77.31%, 同时我们应用本文提出的改良方法成功地对长达 20 kb 以上的基因组 DNA 进行了纯化。应用硅藻土粉或硅石粉提取纯化基因组 DNA 也屡有报道^[15,17,20]。因而, 本方法可适用于 PCR 产物、质粒 DNA、噬菌体 DNA 以及基因组 DNA 的纯化, 具有成本低廉、操作简便、回收率高、重复性好等特点。

参考文献 (References)

- [1] Vogelstein B et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 615
- [2] Marko MA et al. *Anal Biochem*, 1982, **121**: 382
- [3] Boom R et al. *J Clin Microbiol*, 1990, **28**: 495
- [4] Carter MJ et al. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**: 1044
- [5] Höss M et al. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**: 3913
- [6] Zeillinger R et al. *BioTechniques*, 1993, **14**: 202
- [7] 王柏秋等. *国外医学遗传学分册*, 1995, **18**:167
- [8] Kaur R et al. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23**: 4932
- [9] Boyle JS et al. *Trends Genet*, 1995, **11**: 8
- [10] Hansen NJ et al. *Biochem Mol Biol Int*, 1995, **35**: 461
- [11] 郭仁峰等. *基础医学与临床*, 1998, **18**:238
- [12] Engelstein M et al. *Microbiol Comp Genomics*, 1998, **3**: 237
- [13] Thomson JM et al. *BioTechniques*, 1998, **24**: 942
- [14] Koo K et al. *Biotechnol Tech*, 1998, **12**: 549
- [15] Huang J et al. *BioTechniques*, 2000, **28**: 432
- [16] Hansen NJ et al. *Anal Biochem*, 2001, **296**: 149
- [17] Tanaka J et al. *Breed Sci*, 2002, **52**: 151
- [18] Dederich DA et al. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**: e32
- [19] Todorova K et al. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2002, **16**: 145
- [20] Rogstad SH. *Plant Mol Biol Rep*, 2003, **21**: 463a
- [21] Prevorovsky M et al. *BioTechniques*, 2003, **35**: 698
- [22] Borodina TA et al. *Anal Biochem*, 2003, **321**: 135
- [23] 朱帆等. *微生物学杂志*, 2004, **24**: 59
- [24] Sambrook J et al. (金冬雁等译, 侯云德等校), *分子克隆实验指南*, 第二版, 北京: 科学出版社, 1995, 19

An Improved Protocol for Low Copy Number Plasmid DNA Purification with Diatomaceous Earth

Hong-Ao Yu, Lan-Lan Zhang, Chang-Jie Xu*

(*Department of Horticulture; The State Agriculture Ministry Laboratory of Horticultural Plant Growth, Development & Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

Abstract Sequencing of low copy number plasmid DNA failed quite often due to high amount of impurities in sample. To develop an efficient and highly repeatable DNA purification protocol especially suitable for low copy number plasmid DNA, the amount of diatomaceous earth suspension applied to bind DNA was optimized. It was found that 1 μg of pure λDNA was most efficiently recovered when 20 μl of the suspension was applied, with a recovery as high as 77.31%. pLZ14, a low copy number plasmid of 14 953 bp, was purified 12.06-fold with the improved protocol, reaching a purity of 23.87%. Strong, clear sequencing signals and correct results were obtained with the purified pLZ14 plasmid DNA, while weak, confusing signals and universal errors were found for DNA from routine alkaline lysis and purification protocols.

Key words diatomaceous earth; guanidine hydrochloride; plasmid; DNA purification

Received: April 5, 2005 Accepted: June 10, 2005

The work was supported by the National Natural Science Foundations of China (No.30370989, No.30100125) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. 301291)

*Corresponding author. Tel: 86-571-85952426, Fax: 86-571-86049815, E-mail: chjxu@zju.edu.cn