

果。尤其是在使用薄层微粒胶片时,效果更为显著。该配方药品简单,配置冲洗也方便。在摄影有关资料上,虽有用加工普通照相的报道,也有与微粒显影及其他显影配方的性能比较<sup>[1,2]</sup>,但在显微摄影方面还很少应用。

### 参 考 文 献

- [1] 日本“写真工业”:特殊现象におはる粒状性,ユニトラスト,鲜锐性,1976年6月增刊 p 167。  
[2] 日本“写真工业”黑白用现像液の種類と特征,1978年5月 p 77。

## 一种快速简便的噬菌体DNA的抽提方法

聂慧玲 \*王 斌 郭彦文 郭礼和

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

噬菌体DNA的制备和纯化是分子生物学研究中极为重要的一环,在基因库和cDNA库的建立,以及DNA克隆和筛选等方面都是不可缺少的。

噬菌体DNA的制备可以通过噬菌体感染细菌在琼脂板上繁殖(称为平板法),也可以在液体培养液中繁殖(称为液体法)。平板法多用于噬菌体的扩增,由于琼脂含有许多限制性内切酶的抑制因子(如磺酸根等),用这种方法制备到的噬菌体DNA一般需要先通过Sephrose-6B柱纯化噬菌体颗粒<sup>[1]</sup>,否则不能被酶水解,对后面工作有影响。大量噬菌体DNA的取得通常是用液体培养法并经过氯化铯或甘油梯度超离心取得颗粒,再进一步制得<sup>[2]</sup>。这个方法的缺点在于需要长时间的超离心和透析。为了克服上述两种方法的缺点,我们参考了David C, Kaslow<sup>[3]</sup>的工作,经过摸索和改进,用两次核酸酶消化及两次聚乙二醇沉淀可制备到很纯的噬菌体DNA,满足各种实验要求。此法简便和迅速,无特殊仪器要求。

### 材 料 与 方 法

#### 主要培养剂和试剂

TB培养液 10克胰蛋白胨(美国Oxid产品), 5

克氯化钠,加水溶解至1升。125℃灭菌处理及冷却后,补加硫酸镁至10mmol/L,麦芽糖至0.2%(W/V)。

TE缓冲液 10mmol/L Tris-HCL (pH 8.0), 1mmol/L EDTA (pH 8.0)。

SM缓冲液 20mmol/L Tris-HCL (pH 7.5), 10mmol/L 硫酸镁, 100mmol/L 氯化钠, 0.02%明胶。

PEG(聚乙二醇)6000 日本进口分装。

脱氧核糖核酸酶(DNase I) Sigma产品。

核糖核酸酶(RNase A)及蛋白水解酶K(Proteinase K)Merck产品。

#### 方 法

挑选宿主细胞的单菌落在10ml TB中于32℃培养过夜。测600mμ的光吸收。按1A<sub>600</sub>为每毫升约8×10<sup>8</sup>个细胞来计算菌体的浓度。

按适当配比,在10<sup>10</sup>宿主菌中加入噬菌体,在37℃保温20分钟。菌体数与噬菌体数的配比因噬菌体而异<sup>(2)</sup>。对裂解型的噬菌体(如EMBL-3, charon 28等),将感染了噬菌体的菌体转入在37℃预热的含500毫升TB的2升三角烧瓶中,直接在37℃以每分钟约200转的速度摇动培养。培养液先从清到混,再从混变清,历时约4小时左右。对溶源型的噬菌体(如λgt 11),则需将感染了噬菌体的宿主菌先在32℃生长至O.D<sub>600</sub>约为0.4左右,然后将温度迅速提高到42℃并在此温

\* 上海肿瘤研究所进修生。

度维持15分钟后,再在38℃摇一小时。加氯仿2.5毫升,继续摇半小时后,移去过多氯仿。

加DNase I和RNase A各500毫克(最终浓度为1 $\mu$ g/ml),在37℃保温30分钟。

加固体氯化钠,使最终浓度为1 mol/L,摇至氯化钠完全溶解后,0℃保温1小时。以8000 g速度离心20分钟,除去细胞碎片。

上清液移入一清洁的三角烧瓶,加入50克PEG 6000,使最终浓度为10%(W/V),摇至溶解后,继续在冰浴上缓缓摇动1小时,8000 g速度离心20分钟。倒去上清液。

用4.5毫升SM悬液噬菌体颗粒,等体积氯仿抽提一次。于每毫升悬浮液中分别加100微克RNase A

及5微克DNase I,37℃保温30分钟。然后加SDS和EDTA使它们在溶液中的浓度分别为0.5%和20 mmol/L,再加进Proteinase K至每毫升为100微克,在68℃保温30分钟。依次用酚、酚/氯仿(1:1,v/v)和氯仿各抽提一次。加一半体积的5 mol/L醋酸铵(pH~7.5)及二倍体积的乙醇,0℃放置20分钟后,在4℃,1000 g离心15分钟,收集DNA,用2毫升水溶解沉淀物,加0.38毫升5 mol/L氯化钠和2.38毫升13% PEG(W/V),0℃放置1小时,1000 g离心15分钟。沉淀的噬菌体DNA用70%乙醇洗一次,干燥后,用TE溶解,放-20℃保存待用。一般从500毫升液体培养液可得到约25—30微克噬菌体DNA。

#### 样品的鉴定

图1为制备的EMBL-3 DNA紫外吸收全波。

图2为制备的EMBL-3 DNA用EcoRI和BamHI酶解产物在0.3% Agarose胶上电泳鉴定。

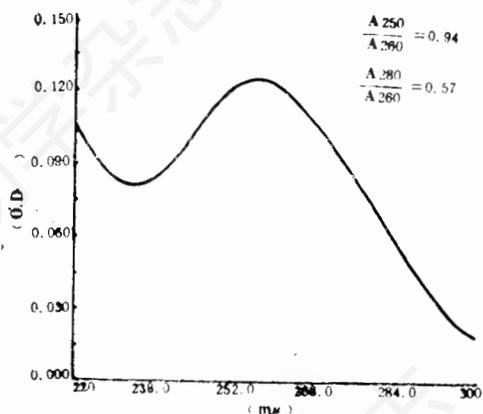


图1 EMBL-3 DNA 紫外全波分析

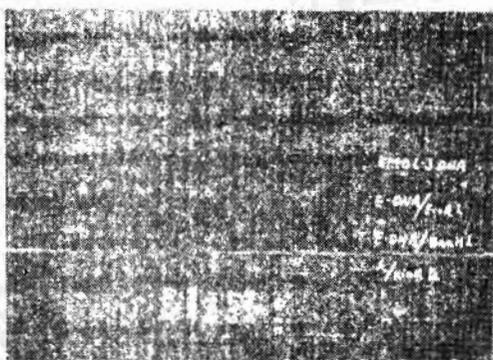


图2 EMBL-3 DNA 限制酶切分析

#### 结果与讨论

用此法制备噬菌体DNA既迅速又方便。从感染到最后取得DNA可在两天内完成。无特殊仪器和设备要求,容易掌握,在一般生化实验室都可进行。制备的噬菌体DNA无细菌DNA及RNA的污染,也不含其它干扰酶作用的因子,可被各种所需的限制性内切酶所水解,便于以后开展各项实验工作。

经过多次使用此法制备EMBL-3, charon 28和 $\lambda$ gt 11 DNA,证明方法稳定可靠。在产率和纯度上与超离心制备法相似。

#### 参考文献

- [1] Brzezinski, R. et al., 1984, *Gene Anal. Techn.*, 1: 67—69.
- [2] Maniatis, T., et al., 1982, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory.
- [3] David C. Kaslow, 1986, *Nucleic Acids Res.*, 14: 6767.