

一种琼脂糖凝胶电泳分离质粒DNA的方法

黄露 戎红梅 刘传暄 匡达人

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

分子无性繁殖已成为扩增特定DNA片段的广为使用的技术,而细菌质粒是很多无性繁殖工作中所选用的载体。近年来分离载体的方法,大多是根据载体DNA的共价闭环环状(CCC—DNA)性质及其对变性的抗性。在氯化铯—溴化乙锭梯度中,CCC—DNA密度大,比线状DNA沉降快,所以用密度梯度超离心方法可获得高纯度的CCC—DNA^[1]。但超离心方法在时间上、材料上都不够经济,在设备上也有一定的局限性。也有采用硝基纤维素过滤法和甲基白蛋白柱层析法分离质粒DNA的报道^[2]。Guerry等人^[3]采用SDS及1M NaCl沉淀染色体DNA,该方法可适用于很多菌种。Guerry等人的方法经Humphreys等人^[4]发展,在溶菌上清液中加入聚乙二醇(PEG),可进一步浓集质粒DNA,但是如此制备的产物往往还杂有染色体DNA。近来,Ohlsson等人^[5]报道了水溶性两相分离法,

Zasloff等人^[6]又报道了酸性酚抽提法,这些方法简便易行,并可大量制备质粒DNA。但如果一种菌株内存在几种不同分子量的质粒DNA时,用抽提法就无法将其分开。

本文介绍一种琼脂糖凝胶电泳制备质粒DNA的方法,它不需要复杂的器材,可获得高纯度的具有生物学活性的质粒DNA,方法稳定,重复性好。如果遇到某一菌株内存在几种不同分子量的质粒DNA时,可用本方法纯化出不同的质粒DNA,再分别转化受体菌,建立含有单一质粒的菌株。同时,本方法也适用于分离纯化被限制酶水解后产生的线性DNA片段。

材料和方法

一、菌株 转化实验中的受体菌为大肠杆菌C600。为抽提各种质粒所使用的各种菌株及其携带的质粒性质见表1。

表1 各种菌株及其携带的质粒性质

菌株	携带的质粒	质粒的分子量 ($\times 10^6$ 道尔顿)	质粒提供的表型 a	加入氯霉素后 质粒的扩增性 b
大肠杆菌 40R25	Col E1	4.2	Col ^{imm}	+
大肠杆菌 802	ρ BR322	2.6	T _c ^r , A _p ^r	+
大肠杆菌 477	ρ SC101	5.8	T _c ^r	-
大肠杆菌 J432	ρ CR1	8.7	K _m ^r	+

注: a. Col^{imm}, 大肠杆菌素免疫性; T_c^r, 四环素抗性; A_p^r, 氨苄青霉素抗性; K_m^r, 卡那霉素抗性。

b. +, 在细菌培养液内加入氯霉素后, 质粒继续复制; -, 在上述条件下, 质粒停止复制。

二、菌体培养 本实验所用培养基含有(克/升): 胰蛋白胨, 10; 牛肉膏, 10; NaCl, 5。

1. 大肠杆菌477生长10小时后, 按10%的接种量转接, 继续于37℃振荡培养过夜, 离心

收集菌体。

2. 大肠杆菌40R25, 大肠杆菌802和大肠杆菌J432生长过夜后, 按10%的接种量转接, 继续培养2小时后加入氯霉素, 使最终浓度达

200微克/毫升, 进一步于37°C振荡培养10小时, 离心收集菌体。

三、抽提细菌总 DNA 综合了Tanaka等人^[7]和Zasloff等人^[6]的方法, 并作了适当改进, 抽提包括质粒DNA在内的细菌总DNA (图1)。所有离心操作均在4°C, 于K70离心机上进行。在冰浴中, 将1克湿重菌体分散悬浮于10毫升TS缓冲液 (Tris—HCl, 50mM, pH8.0; 25%蔗糖), 离心 (15000Rpm, 10分钟), 倾去上清液。将洗涤过的菌体重新悬浮在4毫升TS

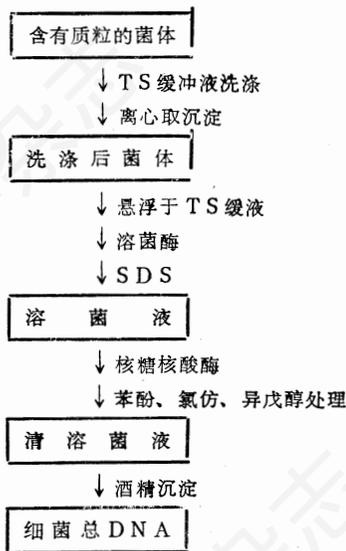


图1 抽提细菌总DNA简要流程

缓冲液中, 加入0.1毫升5 M NaCl及0.2毫升0.4M EDTA, pH8.0, 于冰浴中加入1毫升溶菌酶 (溶于TS缓冲液, 浓度为20毫克/毫升), 于0°C作用15分钟, 然后加入20毫升TE缓冲液 (Tris—HCl, 10mM, pH8.0; EDTA, 1 mM, pH8.0), 进行适当稀释, 再加入3毫升10%重结晶十二烷基磺酸钠 (SDS), 使细胞彻底裂解, 这时溶液变得及其粘稠。

将5毫克牛胰核糖核酸酶溶解在1毫升蒸馏水中, 预先于100°C处理15分钟, 使混杂在其中的脱氧核糖核酸酶 (DNase) 灭活, 然后加到上述溶菌液中, 混匀, 于37°C反应1.5小时。反应完毕, 将反应混合物转移到分液漏斗中, 对等体积的苯酚 (预先用水饱和, 并用

1 M Tris碱调至pH8.0) 及 $\frac{1}{2}$ 体积的氯仿—异戊醇 (24:1) 激烈振摇10分钟, 离心分相 (3500Rpm, 20分钟), 水相再次用上述混合有机溶剂抽提一次, 然后用等体积的氯仿—异戊醇 (24:1) 单独抽提一次。在水相 (清溶菌液) 中加入1/10体积的NaAc (2 M, pH5.0) 及二倍体积预冷的无水酒精, 沉淀DNA。离心, 倾去上清液, 将离心管底部的细菌总DNA沉淀溶解于10毫升TE缓冲液。全部抽提过程在一天内即可完成。

四、质粒的纯化及分析

1、制备用琼脂糖凝胶电泳

采用一般柱电泳装置, 电泳柱为0.8×12厘米玻管, 用尼龙布包扎住一端, 防止凝胶滑出玻管。0.7%琼脂糖配在制胶缓冲液中 (Tris—HAc, 40mM, pH8.0; NaAc, 5 mM; EDTA, 1 mM, pH8.0; 溴化乙锭, 0.5微克/毫升), 经加压处理使之溶解。待胶冷至60°C后, 先在玻管底部加入少量凝胶液封住管底, 然后添加至管顶。凝固之后, 倒出上端胶, 用眼科手术刀切去1厘米胶柱, 以产生平整的胶面。复位后, 将胶柱装入电泳装置。在方法三中制备的细菌总DNA溶液内加入蔗糖和溴酚蓝指示剂, 使最终浓度分别达10%和0.025%, 每根胶上样50微升左右 (上样量过大会影响分离效果), 然后在正负极电泳槽内加入电泳缓冲液 (即省去溴化乙锭的制胶缓冲液), 100伏, 电泳2小时。对于0.7%的琼脂糖, 溴酚蓝的迁移率相当于 10^5 — 3×10^5 分子量的DNA。待溴酚蓝染料标记接近胶底部时结束电泳, 倒出胶柱, 在紫外灯下观察DNA分离的情况, 有DNA的地方呈桔黄色的荧光带。用眼科手术刀切取各胶柱中质粒DNA位置上发荧光的凝胶薄片, 合并于一根预先装有一半支持胶的玻管中 (1.3×15cm), 含DNA的一端在下方, 接正极, 电泳洗脱胶中的DNA。洗脱缓冲液与电泳缓冲液相同, 洗脱电压为200伏。用恒流泵控制流速, 部分收集器收集, 15

分钟一管，每管1毫升左右，共收集15管，借助SP700紫外分光光度计上的0.4毫升小体积比色杯测出洗脱峰形，也可用分析用琼脂糖凝胶电泳检查各管DNA含量，每管取少量供分析，根据分析结果合并DNA含量高的各管，按Tanaka和Weisblum⁸方法除去DNA溶液中的溴化乙锭，或直接用于进一步研究工作。

2. 分析用琼脂糖凝胶电泳

玻管0.6×16厘米，制胶条件同制备电泳。分析样品上样体积视DNA浓度而异，一般为2—50微升，电压120伏，电泳2小时。电泳完毕，通过黄色滤光片，在紫外灯下拍照，记录电泳结果。

五、限制酶酶解 限制酶EcoR1由生物物理研究所三室三组赠送。酶解反应参照Tanaka和Weisblum⁸。

六、转化 转化方法参照Cohen¹⁹。

结 果

与Aaij和Borst¹⁰及Sharp¹¹等人不同，在制备电泳和分析电泳中，我们仅仅在配制凝胶时于缓冲液中加入溴化乙锭染料，而电泳缓冲液中一律不加染料，在本文描述的实验条件下，这样做对DNA的检测并无影响，它既可大大节约染料（约省去90%用量），又可避免过多的溴化乙锭有使DNA失活的危险¹²。



图2 琼脂糖凝胶电泳。

1. 大肠杆菌40R25的总DNA，自上而下(下同)，第一带为染色体DNA，第二带为开环的Col E1 DNA，第三带为闭环超螺旋Col E1 DNA。2. 大肠杆菌477总DNA，第一带为染色体DNA，第二带为闭环超螺旋pSC101 DNA。3. 大肠杆菌7462总DNA，第一带为染色体DNA，第二带为闭环超螺旋pCRI DNA。

按材料和方法三抽提的DNA，经电泳鉴定发现有几个带，包括质粒DNA和大量染色体DNA(见图2)。

用制备电泳方法可将其中几个带分开，并分别予以收集(图3)。图2中第一根胶上有三条带，第二带为开环的质粒Col E1 DNA，由于含量较低，未予收集。

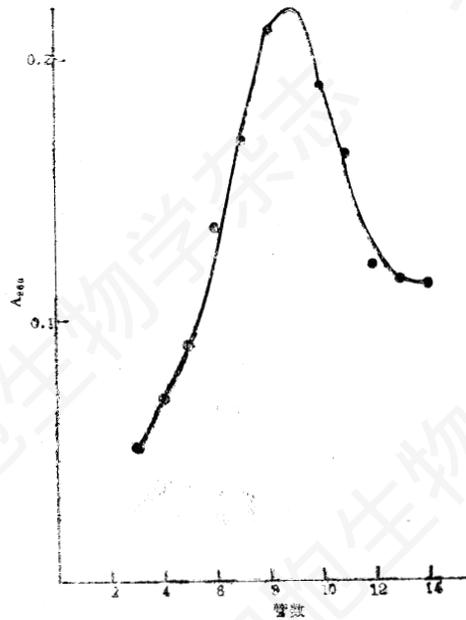


图3 从琼脂糖凝胶中电泳洗脱质粒DNA的洗脱图形。图中的DNA为用pCRI质粒DNA转化大肠杆菌C600，再从转化子中抽提的pCRI质粒DNA。

为了除去纯化样品中的溴化乙锭染料，除采用异戊醇抽提法外⁸，也采用异丁醇抽提法，它们都能除去DNA溶液中及嵌入DNA分子内的染料，同时也观察到即使不用有机溶剂抽提，将DNA溶液对大量缓冲液透析亦可除去溴化乙锭(图4)。但是如果采用本文介绍的制备电泳方法，带进DNA样品内的溴化乙锭染料并不多，它并不影响DNA的进一步酶解及转化活性。

图5表明pSC101及pCRI两种质粒的纯化结果。从图5可看出，用制备电泳纯化的质粒不具有检测杂质(ColE1及pBR322)中获得同样的纯化效果，未给图)。

将制备电泳纯化得到的ColE1、pSC101

和 pCRI 三种质粒 DNA 分别用 EcoRI 酶解，酶解产物均呈一条带，走在相应的环状质粒后



图4 DNA的全波(以水为对照)。

(1) 含有溴化乙锭的DNA溶液。(2) 用异丁醇、异戊醇抽提，或对大量缓冲液透析除去溴化乙锭的DNA溶液



图5 两种质粒纯化的凝胶电泳。

1. 大肠杆菌 477 的总 DNA。第一带为染色体 DNA，第二带为质粒 DNA。2. 经制备电泳纯化后的 pSC101 质粒 DNA。3. 大肠杆菌 477 的染色体 DNA。4. 大肠杆菌 J432 的总 DNA。第一带为染色体 DNA，第二带为质粒 DNA。5. 经制备电泳纯化后的 pCRI 质粒 DNA。6. 大肠杆菌 J432 的染色体 DNA。

面(图6)，表明用琼脂糖凝胶电泳法纯化的质粒可被限制酶降解。

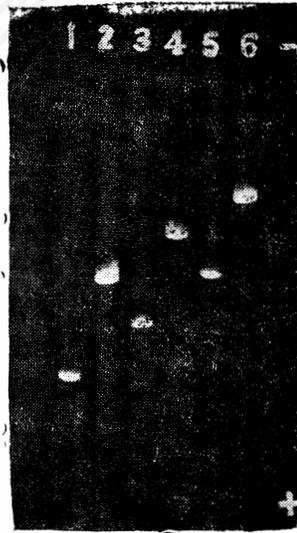


图6. 质粒 Col E1、pSC101 和 pCRI 及其酶解产物凝胶电泳。

1,3,5,分别为ColE1、pSC101 和 pCRI 的闭环超螺旋 DNA。2,4,6 分别为 1,3,5 中的样品经 EcoRI 酶解后的线性 DNA。

将纯化的质粒 pBR322、pSC101 和 pCRI 转化大肠杆菌 C600，分别统计对氨苄青霉素—四环素、四环素和卡那霉素有抗性的转化子数，上述各种质粒每微克 DNA 均可产生大于 10^4 转化子(见表 2)。

表2 制备电泳法纯化的质粒DNA的转化活性

DNA 种类	转化子/微克DNA
pBR 322	
闭环超螺旋构型的质粒	1.8×10^5
从转化子中抽提的闭环超螺旋质粒	1.2×10^5
无 DNA	0
无菌	0
pSC 101	
闭环超螺旋构型的质粒	2.1×10^4
从转化子中抽提的闭环超螺旋质粒	3.4×10^4
无 DNA	0
无菌	0
pCRI	
闭环超螺旋构型的质粒	4.3×10^4
从转化子中抽提的闭环超螺旋质粒	1.4×10^4
无 DNA	0
无菌	0

我们又从 pBR322、pSC101 和 pCRI 的转化子中再次抽提了 DNA，同样用制备电泳加

以纯化,取得了与亲本质粒具有相同电泳行为的纯质粒 DNA,而且它们同样能将大肠杆菌 C600 分别转化成为抗氨基青霉素——四环素、抗四环素及抗卡那霉素的细菌(见表 2)。说明用琼脂糖凝胶电泳纯化的质粒 DNA 具有生物学转化活性。

参 考 资 料

- [1] Bauer, W and J. Vinograd, 1968. *J. Mol. Biol.* 33: 141—171.
- [2] Freifelder, D. 1971. *Methods in Enzymology.* Vol. XXI, part D, 153—163.
- [3] Guerry, P. et al., 1973. *J. Bacteriol.*, 116: 1064—1066.
- [4] Humphreys, G. O et al., 1975. *Biochem. Biophys. Acta.*, 383: 457—463.
- [5] Ohlsson, R. et al., 1978. *Nucleic Acids Research.*, 5: 583—590.
- [6] Zasloff, M. et al., 1978. *Nucleic Acids Resear-ch.* 5: 1139.
- [7] Tanaka, T. et al., 1977. *J. Bacteriol.*, 129: 1487—1494.
- [8] Tanaka, T. and B. Weisblum, 1975. *J. Bacteriol.*, 121: 354—362
- [9] Cohen, S. N, et al., 1972. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 69: 2110—2114.
- [10] Aaij, C and P. Borst. 1972. *Biochem. Biophys. Acta.*, 269: 192—200
- [11] Sharp, P. A. et al., 1973. *Biochemistry.*, 12: 3055.
- [12] Strongin, A. Y, et al. 1977. *Anal. Biochem.*, 79: 1—10.

武汉大学生物系微生物专业 75 级毕业生冯新元和伏晓敏两位同学在我组实习期间参加了部分实验工作。

文章内的全部电泳照片均由我所钟逸新、许海滨两位同志拍摄,特此致谢。



哺乳动物细胞杂交中降低聚乙二醇毒性的简易方法

聚乙二醇(PEG)对某些细胞系具有高度毒性。作者将两个仓鼠细胞的温度敏感突变株 AF8 和 K12 细胞接种于平皿内,在贴壁、伸展后,加入 50% 的 PEG 溶液诱导细胞融合。所用的 PEG 有二种: 1. Baker PEG, 2. Koch-Light PEG, 分子量均为 1000。PEG 作用 30 秒钟后洗去,加入生长培养液,置于温度敏感突变株的许可温度 34℃ 下培养 16—24 小时,再移至非许可温度 40.6℃ 下培养二周,其间每隔 3—4 天更换一次。上述部分材料在 34℃ 培养后,以胰酶消化,用生长培养液 1:20 稀释后再接种于平皿内,于 40.6℃ 培养。12—15 天后染色,计算集落数。同时在缺钙的培养液内用 PEG 诱导细胞融合,比较产生的杂种细胞集落数。

实验表明:用 PEG 在缺钙的培养液内诱导细胞融合,并保持 15 分钟以上,可使杂种细胞的集落数大为增加。在缺 Ca⁺⁺ 的培养液中 Baker PEG 诱导细胞融合的能力比 Koch-Light PEG 更为明显。并证明了杂种细胞集落数的增加是由于 PEG 的毒性的降低,而非融合效率的增高。

此法可用于各种细胞系,也适用于悬液中的细胞。有助于对 PEG 毒性极敏感的细胞系进行细胞杂交的研究。

蔡静妍摘自 *Somat. Cell Genet.*
Vol. 5 No. 2 263—269 1979

上接封三

- [26] Mitchell, C. H. & Attard G., 1978. *Somatic Cell Genet.*, 4: 737.
- [27] Bunn C. L. et al., 1977. *Somatic Cell Genet.*, 3: 71
- [28] Watanabe T. et al., 1978. *Proc. Nat. Acad. Sci. S.*, 75: 5113.
- [29] Howell A. N. & Sager R., 1978. *Proc. Nat. Acad. Sci. US.*, 75: 2358.
- [30] Schor S. et al., 1975. *J. Cell Sci.*, 19: 281.
- [31] Fournier R. E. K. & Ruddle F. H., 1977. *Proc. Nat. Acad. Sci. US.*, 74: 319.
- [32] Krondahl U. et al., 1977. *Proc. Nat. Acad. Sci. US.*, 74: 604.
- [33] Ringertz N. R. et al., 1978. *Exptl. Cell Res.*, 113: 233.
- [34] Linder S. et al., 1979. *Exptl. Cell Res.*, 120: 1—14.