

一种制备 λ -DNA 的简便方法

汪训明 袁汉英 严维耀

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

一定纯度的 λ -DNA 是基因工程研究常用的材料。目前所通用的提纯方法氯化铯密度梯度离心法或聚乙二醇 6000 沉淀-柱层析法, 或则耗费昂贵, 或则不易纯化。我们采用了一种较简便有效的差速离心法制备和纯化 λ -DNA, 介绍如下:

采用 λ 噬菌体溶源性大肠杆菌 [*Escherichia*

coli 225 (λ cI857 Sam7)], 按 Millev 等^[1]的方法制备噬菌体裂解液, 以 MSE · SS-25 型冷冻高速离心机 8000rpm 离心 15 分钟, 除去裂解碎片。以 21000rpm 离心 70 分钟沉淀 λ 噬菌体, 悬浮在少量 SM 缓冲液中 (0.1M NaCl, 0.01% 明胶, 5mM MgSO₄, 50mM Tris-HCl, pH7.5), 即为高浓度的噬菌体裂解液。用 TSE (Tris 10mM,

NaCl 5m M, EDTA 1m M, pH8.0) 缓冲液饱和的酚抽提 λ -DNA 两次, 以氯仿: 异戊醇 (体积比 24:1) 抽提 1 次, 最后对 TSE 缓冲液透析, 即得 λ 噬菌体 DNA。

λ 噬菌体经差速离心后, 按裂解液体积的 1/30, 用 SM 缓冲液悬浮, 效价为 1.2×10^{13} p. f. u./毫升, 回收率可达 95%。所制备的 λ -DNA 不经浓缩其浓度即可达 1100 微克/毫升, 实际得率为 50 毫克 λ DNA/升培养液。

λ -DNA 及其经 EcoRI 酶水解后的产物, 用

琼脂糖凝胶电泳鉴定, 与文献报道一致 (见图 1); 产物经噬菌体体外包装, 效价达 10^7 p. f. u./微克 DNA; 产物经碱部分变性电镜观察, 得到部分变性图谱, 与文献报道一致 (见图 2)。

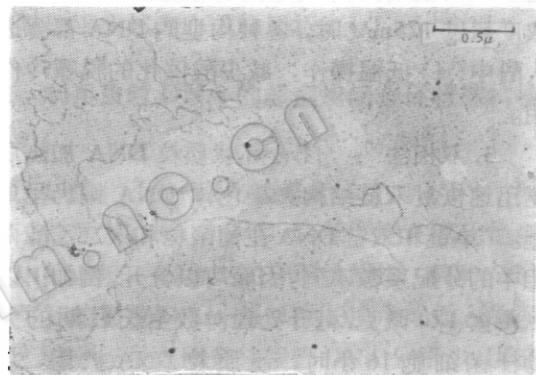


图 2 λ -DNA 的碱部分变性电镜照片

左端为双链, 右端已变性为两条单链。采用 M. Wu 等^[2]的改良法制片, pH 11.50, 25℃ 处理 10 分钟

用此法制备 λ -DNA (透析前), 从裂解液开始只需 4—5 小时, 操作简便, 得率高, 设备要求较低, 一般实验室可考虑采用。

参 考 文 献

- [1] Miller, J. H.: *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, 1972, p. 319.
- [2] Wu, M. et al.: *Nucleic Acid Research*, 6(11): 2497, 1978.

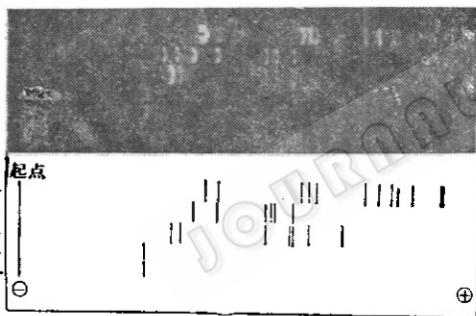


图 1 λ -DNA 经限制性内切酶酶解后的电泳图谱

A: PstI 酶; B: Bam HI 酶, 因酶不足, 产生部分酶解片段, 其主要片段, 自左至右为 (kb): 17.40, 6.47+5.54=12.01, 7.30, 6.76, 6.47, 5.54; C: EcoRI 酶, 各电泳带为: 21.80+3.38=25.18, 21.80, 7.55, 5.93, 5.54, 4.80, 3.38。D 和 E: λ -DNA。

电泳用 0.3% 琼脂糖, 胶长 17 厘米, 80 伏, 3 小时, 缓冲液含 Tris 89m M, 硼酸 89m M, 2.5m M Na₂EDTA, 内含 0.5 微克/毫升溴化乙锭