

# 应用菌落裂解法快速检测质粒 DNA

周建光 于秀芹 马清钧

(军事医学科学院基础医学研究所)

某些细菌除了含有染色体 DNA 外,还带有质粒 DNA。质粒 DNA 往往带有抗药性基因,并且与某些细菌病原性有关。另外它在遗传工程研究中是一种十分有用的运载体<sup>[1]</sup>。因此无论在遗传工程技术,还是临床检验,都需要

有一种方法将质粒 DNA 检出,确定其大小,作进一步的研究和分析。对于快速简便检测质粒 DNA 的方法已有一些报道<sup>[2-4]</sup>。我们直接从琼脂平板上挑取菌落,并使其裂解,然后进行琼脂糖凝胶电泳,检测的效果是满意的。

# 材料和方法

## (一) 菌株

1. 带有 pBR 325、ColE<sub>1</sub>、pSC 101、pAO 1、pCR 1 质粒的大肠杆菌菌株。

2. 枯草杆菌 BD364 (pC194)、BD365 (pUB 112)、B168(pMMI 为 pUB110 和 pBR322 杂合质粒)、BD366 (pUB110)。

3. 含 pBR 322-HBV 重组质粒的大肠杆菌转化子。

## (二) 材料

1. LER 溶液: 将溶菌酶溶液 (20mg/ml 溶解在 20 mM Tris、20 mM NaCl、1mM EDTA 缓冲液中), 核糖核酸酶溶液 (10 mg/ml 溶于 10mM Tris-HCl pH 7.5、15 mM NaCl 中, 加热 100℃15 分钟) 和 250 mM EDTA 溶液 pH8.0。以 1:1:1 (V/V) 混合, 需新鲜配制。

2. SSB 溶液: 5% SDS, 20% 蔗糖, 0.02% 溴酚蓝贮存于 4℃ 备用。

## (三) 方法

1. 检测大肠杆菌质粒: 挑取 1—2 个生长较好的菌落, 悬浮在 20 $\mu$ l 灭菌水中, 加入 LRE 溶液 5 $\mu$ l 混匀, 置冰浴 30 分钟, 加 SSB 溶液 5 $\mu$ l, 混匀后在 70℃ 水浴中保温 5 分钟, 此时可见菌细胞悬液变得粘稠。然后将此裂解物在漩涡混合器上充分混合, 直接取样电泳, 电泳条件为: 琼脂糖浓度 1%, 电压 60 V, 泳动时间 4 小时。也可以再加 20 $\mu$ l 灭菌水, 混合后在微型离心机上离心 5 分钟, 去粘状沉淀, 取上清电泳。电泳缓冲液为 40mM Tris、5mM NaCl 和 1mM EDTA, pH 8.0。溴化乙锭染色后在 254 nm 波长紫外灯下观察并摄影。

2. 检测枯草杆菌质粒: 除加 LRE 溶液 7 $\mu$ l 置室温 30 分钟外, 其它步骤均与大肠杆菌相同。

## 结 果

1. 我们将各自带有不同分子量质粒 (2.6—10  $\times$  10<sup>6</sup> 道尔顿) 的大肠杆菌划线接种于 L 平板上, 按前述方法分离质粒后进行凝胶电泳 (图

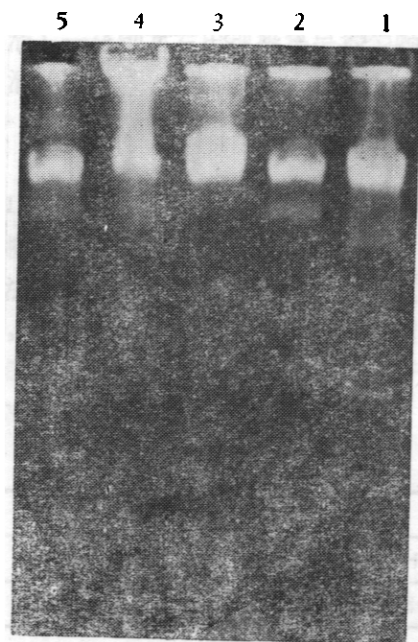


图 1 快速检测大肠杆菌质粒 DNA 的电泳图。

1. pBR 325, 3.5 Md.
2. Col E<sub>1</sub>, 4.2 Md.
3. pSC101, 5.8 Md.
4. pAO1, 6.7 Md.
5. pCR1, 8.7 Md.

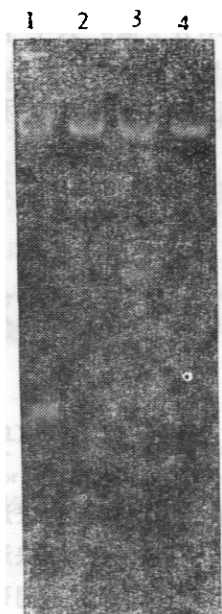


图 2 快速检测枯草杆菌质粒 DNA 的电泳图:

1. pUB 110.
2. pUB 112.
3. pMMI.
4. pC194.

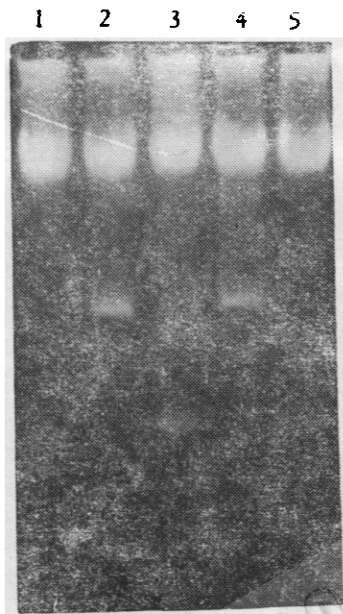


图3 快速检测转化子的重组质粒 DNA

1. pBR 322 质粒。

2—5. pBR322-HBV 转化子的重组质粒 DNA,  
(2、4 相当于 pBR322-HBV 的重组质粒。

3、5 相当于 pBR322 的质粒。)

1)。从图 1 可见被检测菌株中所含的质粒均可被检出,并能显示分子量。其中 pSC 101 虽为单拷贝质粒,但也能清楚显示其电泳区带,说明无论是多拷贝还是单拷贝质粒,利用本方法均能被检出。

2. 我们按前述方法也检测了革兰氏阳性的

枯草杆菌质粒 pUB 110、pUB 112、pMMI、pC 194、其中 pC 194 为单拷贝质粒,均获得了满意的结果(图 2)。

3. 我们在应用同聚物接尾次级克隆乙型肝炎病毒基因组的工作中应用本方法对转化子进行质粒检测和筛选(图 3),共筛选了 176 个菌落,按质粒大小确定其中 40 个含有 pBR 322 与 HBV DNA 重组质粒,初步判断为含重组子的菌落。后经  $P^{32}$ -HBV 探针所作的菌落原位杂交证明确为阳性<sup>[5]</sup>。

以上结果表明,我们应用的方法简便快速,不需特殊设备,它既可以检测革兰氏阳性菌,又可检测革兰氏阴性菌。适用于临床检验分析,遗传工程中重组质粒的筛选。本方法应注意,取菌细胞的量不宜过多,因细菌染色体 DNA 背景会影响检测效果。

## 参 考 文 献

- [1] Barnard, H. U. et al.: *Genetic Engineering* Vol. 12, p. 133, Plenum press. New York, 1980.
- [2] Brinboim, H. C. et al.: *Nucleic Acid Res*, 7: 1513, 1979.
- [3] Holmes, D. S. et al.: *Anal. Biochem*, 114: 193, 1981.
- [4] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, p. 366, 1982.
- [5] 马清钧等: 中华医学微生物学与免疫学杂志, 4(3): 190, 1984.