

# 细菌和放线菌质粒 DNA 的分离

董可宁

(中国科学院微生物研究所, 北京)

到目前为止, 所发现的细菌和放线菌的质粒 DNA 都是共价闭合超盘旋的环状结构。它的碱基组成与染色体 DNA 不同, 分子量较染色体 DNA 小得多, 有的质粒可以通过接合作用有效地转移到受体细胞中去。常利用质粒的这些特性来分离它们。现将几种分离质粒的方法介绍如下。

## 一、利用碱基组成的差异进行分离

当质粒由一种细菌转移到另一株 DNA 碱基组成不同的细菌中时, 后者的质粒即可用此法分离。例如从含有大肠杆菌性因子的奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*) 中分离质粒即利用这一特性。具体方法有:

1. 甲基白蛋白硅藻土色谱分离<sup>[1]</sup>: 先按 Marmur 的方法<sup>[2]</sup>提取 DNA (包括染色体 DNA 和质粒 DNA)。然后用甲基白蛋白硅藻土色谱柱 (7—8 厘米高, 直径 2—3 厘米) 分离。该柱先以  $0.6M$   $NaCl$ — $0.1M$   $PO_4^{3-}$  (pH7.3) 缓冲液平衡后, 加入 DNA 样品 1 毫克, 用同样缓冲液洗脱, 但  $NaCl$  的浓度逐渐增加到  $0.9M$ , 分部收集洗脱液, 每管 5 毫升。最先洗脱的 DNA 几乎是

纯的性因子 DNA。该柱对变性 DNA 有很大的亲和力, 利用染色体 DNA 片段对碱的不稳定性, 用碱处理样品 (pH12.5,  $20^\circ C$ , 3 分钟), 染色体 DNA 变性, 而质粒 DNA 不变性, 后者可被适当浓度的  $NaCl$  洗脱, 也能得到纯化的质粒 DNA。

每批甲基白蛋白和每批 DNA 制剂, 在使用前必须试验洗脱时的  $NaCl$  最适浓度。

2. 硝酸纤维素滤膜过滤分离<sup>[3]</sup>: 硝酸纤维素滤膜可以结合单链 DNA 而不结合双链 DNA。如果质粒 DNA 的解链温度比染色体 DNA 的高, 可使染色体 DNA 解链后结合在硝酸纤维素滤膜上被除去, 使质粒 DNA 分离。此法曾用于分离奇异变形杆菌的质粒 DNA。具体方法是: 以含  $15mM$   $NaCl$ — $1.5mM$  柠檬酸钠的 pH7.3 的溶液透析脱去蛋白质的 DNA 制剂, 透析后的样品经加热 10 分钟使染色体 DNA 变性 (对大肠杆菌的大多数常见质粒,  $81^\circ C$  足够), 迅速加入等体积预冷的含  $1MKCl$ ,  $20mM$   $Tris$  pH7.1 的缓冲液。直径 20—25 毫米, 孔径 0.45 微米的硝酸纤维素滤膜, 先以 60 毫升含  $0.5MKCl$  和  $10mM$   $Tris$  pH7.1 的缓冲液抽滤洗

涤,然后以2毫升/分的流速将DNA溶液通过滤膜。滤液含有较纯的质粒DNA。重复过滤一次,可使DNA纯度提高。通常每次过滤可使90%的变性DNA留在滤膜上,滤膜结合变性DNA的能力约为20微克/平方厘米。(如用硝酸纤维素柱,变性DNA的吸附量可大大增加)

## 二、利用分子大小差别进行分离

1. 非离子性乳化剂溶胞法<sup>[2-4]</sup>: 非离子性乳化剂多氧乙烯十六烷醚 (Polyoxyethylenecetyl ether, Brij-58) 可使经溶菌酶溶菌后的大肠杆菌原生质球能透过小分子,控制 $Mg^{2+}$ 浓度可使存在于细胞质中分子量较小的质粒DNA通过,染色体DNA则不能通过。分离操作步骤是:将细胞悬浮于含25%蔗糖,10 mM Tris pH8.1的溶液中,置于冰浴内。加入溶于0.25 M Tris中的浓度为850微克/毫升的溶菌酶,使终浓度为100微克/毫升,0℃,45秒钟溶菌,加5% Brij-58使最终浓度为0.5%,0℃继续培养2—5分钟。悬液0℃,5000g离心5分钟。菌体、染色体DNA和一部分RNA沉降于沉淀中,质粒DNA留在上清液中。此法所有器皿和操作都必须保持低温,而且操作不可太剧烈。但在操作上难以掌握,故未被广泛采用。

2. 高浓度氯化钠沉淀大分子DNA<sup>[5]</sup>: 在SDS存在时,高浓度的氯化钠可沉淀大分子DNA,小分子的质粒DNA留在上清液中。此法的优点是简便,得到的不单是超螺旋环状结构的质粒DNA,还能得到开环的和线状的质粒DNA及复制中间物。

天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) A3 (2) 的质粒即采用这种方法分离<sup>[6]</sup>。具体方法是:10毫升基本培养基以孢子接种后,30℃振荡培养50小时,4℃15000rpm离心收集菌体,以TES缓冲液(含0.03M Tris, 0.005M EDTA及0.05M NaCl, pH8.0)洗3次,菌丝悬浮在1毫升0.01 M Tris-HCl缓冲液(pH7.3,含蔗糖25%)中。悬液中再加0.3毫升的0.25M EDTA (pH8.0),溶菌酶2毫克。混合液37℃保温30分钟后加入SDS,至终浓度为0.5%,每升加200

毫克蛋白酶K。混合液再在37℃保温30分钟,然后将SDS浓度提高到1%,继续保温15分钟,加入5M的NaCl溶液至最终浓度为1M。置冰浴中2小时,再以4℃,16000rpm离心15分钟,上清液含质粒DNA。若要进一步纯化,则需作平衡超离心或柱层析。

## 三、利用质粒DNA的超螺旋闭合环状结构特点。

1. 溴化乙锭-氯化铯密度梯度离心<sup>[1,4]</sup>: 溴化乙锭插入DNA分子中,降低了它在氯化铯溶液中的密度。超螺旋闭合环状结构(简称CCC构型)的质粒DNA,每单位长度中能插入的溴化乙锭分子最大限量较线形DNA分子少,因而其密度降低也少。因此利用密度梯度离心可以把CCC构型的质粒DNA分离出来。

例如分离天蓝色链霉菌中的质粒,曾采用此法<sup>[6,7]</sup>。方法是:14毫升溶菌上清液,0.5毫升0.25M EDTA (pH8.0),0.5毫升溴化乙锭(10毫克/毫升)和11.6克氯化铯,置于钛60型转头上的硝酸纤维素管中混合,以Bakmann L5-65超速离心机20℃44000rpm离心40小时,收集CCC DNA区带,再放到钛50型转头上离心到平衡。CCC DNA可浓缩到50—100微克/毫升。从2克菌丝体的溶菌上清液中可得到20微克的CCC DNA。

2. 酚抽提法<sup>[8]</sup>: 在一定pH和离子强度条件下,构型不同的DNA分子在酚和水中的分配系数不同。酸性pH和低离子强度时,CCC DNA留在水相中,而酚相选择地抽提线形的和有缺口的环状DNA。此法的基本步骤是:1)含CCC DNA粗制品先除去蛋白质和RNA;2)DNA制品以乙醇沉淀并重新悬浮在含有50mM乙酸钠,75mM NaCl的pH4.0缓冲液中;3)以等体积的经50mM乙酸钠(pH4.0)平衡的重蒸酚抽提,一次抽提可使大于1500碱基对的线性和有缺口的开环DNA分子从水相中去除95%,三次抽提后可除去99%以上,而CCC DNA定量地留在水相中,此法不需特殊试剂,分离效果可与密度梯度离心法相比。此法要点是:1)必

须除净蛋白质, 以免使各种构型的 DNA 从水相中丢失; 2) pH 必须十分准确测定, 精确调整到 pH4.0, 因为 pH3.0 时 CCC DNA 会在水相中丢失, 而超过 pH4.0, 则 CCC DNA 与其它构型 DNA 无法分开; 3) 离子强度要低, 当 NaCl 浓度超过 125mM 时, 各种构型的 DNA 都会进入酚中; 4) 低温操作, 减少酸催化的脱嘌呤作用。

3. 双相法<sup>[9]</sup>: 闭合环状质粒 DNA 加热后能迅速恢复双链结构, 染色体 DNA 则仍呈单链。单链和双链 DNA 在葡聚糖和聚乙二醇两相中的分配系数不同, 因而可以分开。例如: 以氯霉素 170 微克/毫升处理对数生长后期的大肠杆菌细胞 16 小时, 使质粒 DNA 扩增, 加 Triton-100 溶菌, 溶菌后上清液用蛋白酶 K100 微克/毫升 37℃ 处理 30 分钟, 以酚和氯仿-异丙醇 (99:1) 各处理 2 次, 以 2 倍体积乙醇沉淀 DNA, 在微型离心管中以 0.2 毫升含 10mM Tris 1mMEDTA, pH8.0 的 TE 缓冲液溶解 DNA 成浓度为 20 微克/毫升的溶液, 在 100℃ 加热 2 分钟使染色体 DNA 变性, 然后立即置于干冰-乙醇中迅速冷却, 加入 500 微升葡聚糖溶液 (与水的重量比为 16.8%), 250 微升聚乙二醇 (与水的重量比为 18.4%) 和 0.5M, pH6.8 的磷酸钠缓冲液。操作于 4℃ 下进行, 加水至体积为 1 毫升, 混合后, 4℃ 离心 1 分钟, 收集上层聚

乙二醇相, 加 NaCl 至 0.2M, 加 2 倍体积的乙醇沉淀 DNA, 再以无水乙醇洗涤干燥后, 溶于少量水中。此法关键在于两相的浓度及缓冲液的 pH 要严格控制, 操作要在 4℃ 进行。据文献报道, 用此法可纯化 79 倍。

此法的优点是: 1) 较浮力密度离心法快速, 分离效果相近; 2) 适用于同时处理大批样品, 测定质粒 DNA 的限制性内切酶酶切图谱; 3) 可少量提取质粒 DNA, 也可以放大。

上述各类方法, 还应根据不同菌株中质粒的特点和实验室的具体条件, 作相应的修改。

## 参 考 文 献

- [1] Freifelder, D.: Isolation of Extrachromosomal DNA from Bacterial, *Methods in Enzymology* (ed. by Colowick, S. P. and N. O. Kaplan) Vol. 21, Nucleic Acids Part D, Academic Press, New York, 1971, pp. 153—163.
- [2] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3: 208—218, 1961.
- [3] Godson, G. N. and R. L. Sinheimer: *Biochim. Biophys. Acta*, 149: 476—488, 1976.
- [4] 王尔中: 遗传, 1979年第2期, 32—34页。
- [5] Guerry, P. et al.: *J. Bacteriol.*, 116: 1064—1066, 1973.
- [6] Schrepf, H. H. Bujard, D. A. Hopwood and W. Goebel: *J. Bacteriol.*, 121: 416—421, 1975.
- [7] Schrepf, H. and W. Goebel: *J. Bacteriol.*, 131: 251—258, 1977.
- [8] Zasloff, M., G. D. Ginder and G. Felsenfeld: *Nucleic Acids Res.*, 5: 1139—1152, 1978.
- [9] Chlsson, R., C. C. Hentschel and J. G. Williams: *ibid*, 5: 583—590, 1978.