

# 一种大量提取纯化 SPP1-DNA 的简便方法

郑文尧

(中国科学院微生物研究所, 北京)

自从 Silvano 等<sup>[1]</sup>于 1969 年发表了关于枯草杆菌噬菌体 SPP1 及其 DNA 的研究论文后, 十几年来有关 SPP1 及其 DNA 的研究日渐深入<sup>[2,3]</sup>。本文介绍一种简便而大量提取该噬菌体 DNA 的方法, 该法在对 Silvano 等人的方法予以改进和简化之后, 避免了使用昂贵的药品氯化铯和超速离心机, 从而使噬菌体 SPP1 的效价达到了一定的高度, 便于获得大量的 SPP1-DNA。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌株和噬菌体

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) MCB 以及噬菌体 SPP1, 均由董可宁同志从德意志联邦共和国浮兹堡大学微生物遗传学研究所带回。

### (二) 培养基

1. 液体培养基(g/l): 蛋白胨 10, 酵母膏 5, 氯化钠 0.5, pH 7.5, 15 磅 30 分钟灭菌, 接种前分别加入已预先灭过菌的 1MMgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 10ml, 0.1M MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 1ml 和硫胺素 5mg。

2. 测定噬菌体效价用培养基: 底层用上述培养基加 1.5—2% 琼脂, 上层用上述培养基加 1% 琼脂。

### (三) 试剂

Sephrose 2B 为瑞典 Pharmacia 产, EcoRI 参照 Greene 等<sup>[6]</sup>方法加以改进后制备, BamHI 参照 Wilson 等<sup>[7]</sup>方法加以改进后制备, Pst 生物物理所生化试剂厂产, λ-DNA 参照叶盛钰等<sup>[3]</sup>方法制备, 质粒 DNA pBR322, pBR325 由张其玖同志惠赠。

### (四) SPP1-DNA 的分离纯化

1. 菌体的培养和噬菌体 SPP1 的增殖、分离: 将枯草杆菌(MCB)在 Bpy 斜面上活化二

代, 然后接入 100ml 液体培养基中, 在 30~37℃ 振荡培养过夜作为种液, 接入内装 3000ml 液体培养基的 6l 玻璃发酵罐, 温度控制在 37℃, 通气量为 8l/min, 搅拌转速为 800rpm, 培养至对数生长期, 接入噬菌体 SPP1 悬液(噬菌体与枯草杆菌之比为 3:1), 于 37℃ 条件下继续培养至发酵液 A<sub>580nm</sub> ≤ 0, 在发酵液中加入 5~10 滴氯仿, 继续搅拌 30 分钟, 然后离心除去菌体和菌体碎片(5000rpm 30 分钟), 参照叶盛钰等<sup>[3]</sup>方法将上清液加氯化钠至 3%, 聚乙二醇-6000 至 8%, 置于 4℃ 冰箱过夜, 4000 rpm 离心 20 分钟, 收集沉淀, 将沉淀悬浮于 50 ml TBT 缓冲液(0.1 M Tris-HCl pH7.5, 0.1 M NaCl, 0.01 M MgCl<sub>2</sub>), 再于 4000rpm 离心 10 分钟, 取上层悬浮液定溶, 加蔗糖至 20%, 装预先用 TBT 缓冲液平衡过的 Sepharose 2B 柱(5cm × 100cm), 用相同的缓冲液洗脱, 分部收集, 第一个紫外吸收峰为噬菌体 SPP1。

2. SPP1-DNA 的提取: 将所收集的 SPP1 噬菌体样品加等体积饱和水的酚(用 Tris 调 pH 至 8.0)抽提二次, 弃去酚层。氯仿:异戊醇(24:1)抽提一次, 乙醚抽提二次除酚, 水相对 0.1M Tris-HCl pH7.5, 0.01 M Na<sub>2</sub>-EDTA 缓冲液透析, 即得噬菌体 SPP1-DNA, 其浓度参照北京大学生物化学教研室<sup>[4]</sup>方法测定。

### (五) SPP1-DNA 及 λDNA 等的酶切图谱

于每一反应体积中加相应的酶解反应液 30μl, 分别加 λ SPP1-DNA、质粒 DNA 和 λ DNA 1μg, 再分别加入相应的 EcoRI、BamHI 及 Pst10 个酶活单位, 于 37℃ 恒温水浴中保持二

董可宁同志提供菌种和噬菌体, 张其玖同志惠赠质粒 DNA; 贾盘兴同志对本文提出宝贵意见, 在此一并致谢。

小时后,加 10 $\mu$ l 含有 20mM Na<sub>2</sub>-EDTA 的溴酚蓝终止液,于 1% 琼脂糖凝胶上电泳过夜。琼脂糖凝胶用 EB 染色后于荧光灯下观察结果。

结果与讨论

1. 本试验中,枯草杆菌在接种后 1.5 小时即进入对数生长期,接入噬菌体 SPP1 后 3 小时 A<sub>590nm</sub> 数值明显下降,6 小时后已降至 0.05。说明菌体已全部被噬菌体 SPP1 所裂解。

2. 噬菌体 SPP1 之悬浮液经 Sepharose 2B 柱层析后,出现二个紫外吸收峰,第一个峰即噬菌体 SPP1,第二个峰主要是枯草杆菌的 RNA (图 1),从图 1 中可以看出噬菌体 SPP1 同枯草杆菌的 RNA 被严格区分开,经酚抽提后的收获率为每升发酵液 28.6mg DNA。

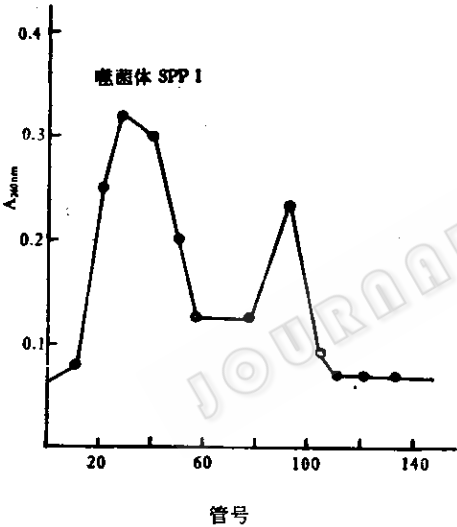


图 1 Sepharose 2B 洗脱紫外吸收分布曲线

3. 用上述方法提纯的 SPP1-DNA, 经过 EcoRI 酶切后进行琼脂糖凝胶电泳分析, 证明被纯化的 SPP1-DNA 不含有任何杂质 (染色体 DNA 和 RNA)。在琼脂糖凝胶电泳图谱上 SPP1-DNA 只有清晰的一条带, 经过 EcoRI 酶解之后, 所呈现出来的区带与 Ratcliff 等<sup>[5]</sup> 的结果是完全一致的 (图 2)。

从图 2 可以看到质粒 DNA pBR 322 的 EcoRI 和 BamHI 之酶解图谱, 其区带在 2.23 Md 和 2.97Md 之间, 分子量是 2.88Md。质粒

pBR325 的 BamHI 酶解区带在 3.35Md 与 3.87 Md 之间, 分子量是 3.56d。通过以上两种已知分子量的质粒 DNA 同 SPP1 DNA 的 EcoRI 酶切图谱以及  $\lambda$ DNA 的 PstI 酶切图谱的比较, 可以证明 SPP1 DNA 的 EcoRI 酶切片段作为标准分子量测定其他未知分子量的 DNA 是准确可靠的。

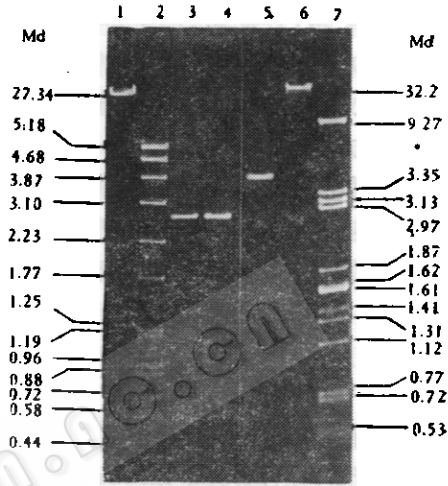


图 2 SPP1-DNA、 $\lambda$ DNA 的限制性内切酶酶解图谱  
1. SPP1 DNA 2. SPP1 DNA + EcoRI 3. pBR 322 + EcoRI 4. pBR322 + BamHI 5. pBR325 + BamHI 6.  $\lambda$ DNA 7.  $\lambda$ DNA + PstI

从表 1 我们可以看出 T<sub>5</sub>、SPP1、Fd、M13 和  $\lambda$  等五种 DNA 中, 用限制性内切酶酶解片段作为标准分子量时各有其特点和优越性, 但都有一定的局限性。T<sub>5</sub> DNA 之 Hind III 和  $\lambda$ DNA 之 PstI 酶解片段其分子量由小到大比较广泛, 但 T<sub>5</sub> DNA 0.92 Md 以下之分子量只有二个片段, 而  $\lambda$ DNA 之 PstI 酶解片段, 第一与第二片段之间间隙太大, 空缺较多。 $\lambda$ DNA 之 EcoRI 酶解片段只有六条带, 对 2.30 Md 以下的分子量是无法测定的。Fd DNA 和 M13 DNA 对测定一些较小分子量的片段是适用的, 而大于 1.66Md 以上的则无法测定。另外 Hind III 和 HaeIII 等内切酶一般都是依赖国外进口, 国内生产目前还不能满足需要。SPP1 DNA 其 EcoRI 酶解片段分子量虽然偏低, 但对一般质粒 DNA 来说是比较适宜的, 其所用 EcoRI 是

表 1 标准 DNA 片段分子量一览表

片段 No	$\lambda$ DNA + PstI Mdal	T <sub>3</sub> DNA + HindIII Mdal	SPP1DNA + EcoRI Mdal	FdDNA + HaeIII Mdal	M13DNA + HaeIII Mdal	$\lambda$ DNA + EcoRI Mdal
1	9.27	11.20	5.18	1.650	1.66	14.32
2	3.35	10.30	4.60	1.023	0.92	4.96
3	3.13	9.28	3.87	0.547	0.56	3.85
4	2.97	8.70	3.10	0.237	0.20	3.72
5	1.87	7.90	2.23	0.191	0.20	3.20
6	1.62	7.16	1.77	0.108	0.10	2.30
7	1.61	4.70	1.25	0.068	0.094	
8	1.41	4.53	1.19	0.066	0.068	
9	1.31	3.38	0.96	0.042	0.045	
10	1.12	3.25	0.88			
11	0.77	2.70	0.72			
12	0.72	2.60	0.58			
13	0.53	1.66	0.44			
14	0.34	1.54	0.32			
15	0.31	1.37	0.25			
16	0.30	0.92				
17	0.22	0.56				
18	0.18	0.20				
19	0.16					
20	0.14					

目前国内、外使用最广泛,价格最便宜,最易得到的限制性内切酶。尤其是在目前国内限制性内切酶和标准 DNA 品种为数不多的情况下,使用 SPP1 DNA 的 EcoRI 酶切片段作为标准分子量来使用有一定的优越性。在测定一个未知的 DNA 时,如果能够同时使用二种以上标准分子量的 DNA 进行比较,使用相等或比较相近的片段做为分子量的测量依据是最为理想的。

## 参 考 文 献

- 1968.
- [2] Morelli G. et al.: *Molec. Gen. Genet.*, **164**: 93—97, 1978.
- [3] 叶盛钰等: 生物化学与生物物理进展, 1980 年, 第四期, 第61—62页。
- [4] 北京大学生物系生物化学教研室: 生物化学实验指导, 人民教育出版社, 1982年, 第133—135页。
- [5] Ratcliff, S. W. et al.: *Molec. Gen. Genet.*, **168**: 165—172, 1979.
- [6] Greene, P. J. et al.: *Methods Mol. Biol.*, **7**: 87—111, 1974.
- [7] Wolson, G. A. et al.: *J. Mol. Biol.*, **97**: 123—125, 1975.