

一种简单实用的适于大、小质粒的 DNA 提取方法

徐建国 刘志奇 刘汉明

(中国预防医学科学院流行病学和微生物学研究所,北京)

摘要 以 Birnboim 和 Doly 的质粒提取方法为基础,用醋酸铵取代醋酸钠,沉淀染色体 DNA 和 RNA,用异丙醇取代乙醇沉淀质粒 DNA,降低了质粒 DNA 标本中蛋白质和 RNA 的含量,减少了标本体积。并发现在质粒 DNA 标本中加入冷异丙醇或冷乙醇后,在 -70°C 、 -20°C 、 -10°C 、 4°C 和室温下作用,对质粒 DNA 的回收量无明显影响,在质粒 DNA 标本中加入冷异丙醇后,在 4°C 作用 0、10、20 和 30 分钟,对质粒 DNA 的回收量无明显影响。用该方法提取的质粒 DNA 可直接用于限制性内切酶消化。用该方法提取大肠埃希氏菌、志贺氏菌、耶尔森氏菌的质粒 DNA 均获成功,适用于提取分子量为 140 Md 的大质粒和分子量为 3.23 Md 的小质粒。

关键词 质粒 DNA 提取法;醋酸铵;异丙醇

关于质粒 DNA 提取方法已有很多报道,现将结果报道如下:

但都存在着一些缺点。目前大多数实验室采用的是 Birnboim 和 Doly 的方法,或以此为基础的改良方法。Birnboim 和 Doly 的提取方法对小质粒效果很好,不太适用于大质粒 DNA 的提取^[1]。我们曾用该方法提取鼠疫耶氏菌的质粒 DNA,效果不好。而且该方法使用醋酸钠沉淀蛋白质、染色体 DNA 和 RNA,造成质粒 DNA 标本纯度不高,对限制性内切酶消化有干扰作用^[1,2]。使用冷乙醇沉淀质粒 DNA,标本体积较大,不易操作^[1]。而且需要在 -70°C 或 -20°C 下作用 30 分钟,需要低温冰箱,耗时较多。本文将质粒 DNA 提取方法作了改进,

材 料 和 方 法

(一) 质粒和菌株

pBR 328 [HB 101], pHC 79 [HB 101], *Shigella flexneri* 2a 301, *Shigella sonnei* 209, *Escherichia coli* 0157:H7 88-2364 均为本室保存菌株。其中 *Escherichia coli* 0157:H7 88-2364 从江苏省徐州市出血性肠炎患者中分离,含有一个分子量为 60 Md 的大质粒和两个小质粒。*Shigella flexneri* 2a 301 和 *Shigella*

国家自然科学基金资助项目。

sonneri 209 分别含有一个分子量为 120 Md 和 140 Md 的大质粒。

(二) 试剂

质粒 DNA 提取方法采用三种溶液。

溶液 I: 20% 葡萄糖 0.222 ml, 1 mol/L Tris pH8.0 0.125 ml, 0.5 mol/L EDTA 0.1 ml, 重蒸水 4.5 ml, 溶菌酶 10 mg。其中 20% 葡萄糖溶液需要 0.5 kg/cm² 灭菌 15 分钟, 冰箱保存待用。1 mol/L Tris 和 0.5 mol/L EDTA 在溶液配制后高压灭菌, 室温保存待用。溶液 I 要求新鲜配制, 使用期最多不超过三天。

溶液 II: 10N NaOH 0.2ml, 20% SDS 0.5 ml, 重蒸水 9.3 ml, 其中 20% SDS 和重蒸水需高压灭菌, 室温保存, 10 N NaOH 的量要求必须精确。SDS 要求化学纯, 溶液配制后不能发生沉淀。若室温过低(如冬天)发生沉淀时, 应微加热直至清亮。溶液 II 的配制应首先将 NaOH 加入重蒸水, 轻轻混和后再加 SDS。溶液 II 应新鲜配制, 室温保存, 不要隔日使用。

溶液 III: 5mol/L NH₄OAc, 溶液 III 在配制好后应高压灭菌, 室温保存待用。不需测量 pH 值。

(三) 改良的质粒 DNA 提取法

1. 将试验菌株首先在 LB 琼脂上活化一代, 转种入 5 ml LB 肉汤中 37℃ 过夜振荡培养。取细菌 LB 肉汤培养物 1—1.5ml 转至离心管中, 用 Eppendorf 离心机 15000 r/min 离心 1—3 分钟, 弃上清。将菌体悬浮在 100 μl 溶液 I 中, 置冰上 30 分钟。再沿管壁缓慢加入 200 μl 溶液 II, 轻轻混和, 置冰上 10—20 分钟。此步骤切忌剧烈混和, 否则会将质粒 DNA 破坏。再迅速加入 200 μl 溶液 III, 加入后立即混和, 置冰上 30—45 分钟。最少不低于 30 分钟, 也可置冰上过夜。用 Eppendorf 离心机 15000 r/min 离心 5 分钟, 取上清与 0.5 或 1 ml 冷异丙醇混和, 置冰上或 -10℃ 10 分钟。然后用 Eppendorf 离心机 15000 r/min 离心 5—10 分钟, 弃上清。加入 1—1.5 ml 冷无水乙醇, 12000 r/min 离心 3 分钟, 弃上清, 用微量加样器吸净残余液体, 真空干燥后, 将质粒 DNA 沉淀物溶

入 20 或 40 μl TE 缓冲液中。此时, 质粒 DNA 溶液可直接用于限制性内切酶消化、琼脂糖凝胶电泳或质粒 DNA 转化试验。在质粒 DNA 提取过程中所用的离心管、吸管等所有器材必需高压灭菌, 操作时应戴一次性手套, 切勿用手处理或触摸离心管等, 防止 DNA 酶污染。一旦污染, DNA 酶会将质粒 DNA 消化, 导致提取失败。提取的 DNA 标本, 应在 4℃ 冰箱保存。

2. 琼脂糖凝胶电泳: 使用稳压稳流电泳仪, 水平电泳槽。琼脂糖浓度一般为 0.7%, 电压为 120 V。

结 果

(一) 醋酸铵、醋酸钠和氯化钠对质粒 DNA 回收量的影响

使用氯化钠或醋酸钠沉淀蛋白质、RNA 和染色体 DNA 片段的作用尚好, 但所提取的质粒 DNA 标本中的蛋白质和 RNA 含量过大, 常常不易溶解于 TE 缓冲液中。在本试验条件下, 用氯化钠或醋酸钠沉淀后提取的小量质粒 DNA 标本 (1.5 ml) 菌液, 用限制性内切酶消化时作用不稳定, 有时发生部分消化现象, 有时甚至不能被消化, 肉眼可见到体积较大的质粒 DNA 沉淀物。用醋酸铵取代氯化钠和醋酸钠沉淀蛋白质、RNA 后, 再用冷异丙醇沉淀质粒 DNA, 质粒 DNA 标本中蛋白质和 RNA 的含量大大减少。用肉眼观察, 质粒 DNA 沉淀物体积显著减少, 但对质粒 DNA 标本中的蛋白质和 RNA 含量未作定量分析。用 pBR 328 (HB101) 为试验菌株, 在琼脂糖凝胶电泳上, 使用醋酸钠、醋酸铵沉淀蛋白质和 RNA, 对质粒 DNA 回收量无明显影响(图版 I-1)。

(二) 作用温度对质粒 DNA 回收量的影响

按常规提取方法, 需要加 2—3 倍体积的冷乙醇 (95%) 或 60% 体积的冷异丙醇, 然后在 -70℃ 或 -20℃ 作用 30 分钟左右^[1]。鉴于在含有质粒 DNA 的溶液中加入冷异丙醇后在室温下作用一段时间也可沉淀质粒 DNA^[2], 我们用醋酸铵取代氯化钠或醋酸钠沉淀蛋白质、

RNA 或染色体 DNA, 然后在含质粒 DNA 的溶液中加入等量或 2 倍体积的冷异丙醇(小量提取法), 将标本置于 -70°C 、 -20°C 和 4°C 及室温下作用 30 分钟后, 15000 r/min 离心 10 分钟。结果表明, 在 -70°C 、 -20°C 和 4°C 及室温下作用 30 分钟, 对质粒 DNA 的回收量在琼脂糖凝胶电泳上没有表现出差别(图版 1-2)。

(三) 作用时间对质粒 DNA 回收量的影响

为了缩短提取时间, 我们将 $1\text{ }\mu\text{g}$ 经氯化铯密度梯度离心的纯化 pHC 79 DNA 和小量提取的 pBR328 粗提品, 加入冷异丙醇后, 在 4°C 下作用 0、10、20 分钟后, 15000 r/min 离心 10 分钟, 提取质粒 DNA。结果表明, 加入冷异丙醇后, 不同的作用时间, 对提纯的 pHC79 和粗提的 pBR328 质粒 DNA 的回收量, 在琼脂糖凝胶电泳上没有差别(图版 1-3)。

(四) 对不同细菌的不同分子量的质粒 DNA 的提取

使用本方法对含有 140 Md 大质粒的福氏 2a 志贺氏菌、含 120 Md 大质粒的宋内氏志贺氏菌和含有 60 Md 大质粒的肠出血性大肠埃希氏菌的质粒 DNA 进行了提取, 均表现出很好的效果。对 110 株痢疾 I 型志贺氏菌和 99 株从腹泻病人粪便分离的大肠埃希氏菌的质粒 DNA 提取, 也表现出很好的重复性和稳定性。我们曾用 Birnboim 和 Doly 的方法对提取鼠疫耶尔森氏菌的质粒 DNA, 未获成功, 而使用改良的方法后, 质粒 DNA 的含量和重复性均好, 说明本方法适用于不同细菌的不同分子量的质粒 DNA 的提取。

(五) 质粒 DNA 的大量制备

在细菌遗传学的研究中常需要制备大量质粒 DNA。其制备方法即将小量质粒 DNA 的提取方法稍加改良。改良处有: 1. 大量制备以取 100—200 ml 的细菌的 LB 肉汤过夜培养物为宜; 2. 将 100 或 200 ml 细菌的 LB 肉汤培养物离心后, 取菌体分别悬浮在 5 ml 溶液 I, 10 ml 溶液 II 和 10 ml 溶液 III 中, 操作顺序同小量质粒 DNA 提取法; 3. 在菌体加入溶液 II 后, 置冰上作用 20 分钟, 以肉眼观察到清亮裂解物

为宜; 4. 在含质粒 DNA 的溶液中加入 60% 体积的冷异丙醇, 以减少标本体积; 5. 使用高速冷冻离心机, 12000 r/min 离心 10—15 分钟即可。经大量提取的质粒 DNA 标本, 可直接用于质粒 DNA 转化、限制性内切酶分析或基因克隆。

讨 论

Birnboim 和 Doly 以及许多质粒 DNA 提取方法多用醋酸钠、醋酸钾、氯化钠等沉淀蛋白质、RNA 和染色体 DNA 片段, 用冷乙醇或冷异丙醇沉淀质粒 DNA^[1]。我们用醋酸铵代替醋酸钠和氯化钠沉淀蛋白质和 RNA 等, 然后再用冷异丙醇沉淀质粒 DNA, 使质粒 DNA 标本中的蛋白质、RNA 等的含量大大降低, 肉眼可见质粒 DNA 沉淀物明显减少, 而不影响质粒 DNA 的含量^[3]。同时, 由于该方法采用冷异丙醇沉淀质粒 DNA, 只需标本溶液 60% 体积的冷异丙醇, 使处理标本体积大大减少。这是因为, 若用冷乙醇沉淀质粒 DNA, 则需要标本溶液的 2—3 倍体积的冷乙醇^[3,4]。

试验还表明, 在加入冷异丙醇后, 在 -70°C 、 -20°C 、 -10°C 和 4°C 及室温下作用, 对质粒 DNA 的提取量无明显影响。说明, 提取质粒 DNA 并非必须在 -70°C 或 -20°C 的低温冰箱。同时还发现, 在 4°C 或 -10°C 下作用 0、10 及 20 分钟对质粒 DNA 的提取量也无明显影响, 说明可以明显缩短操作时间。但是, 作为一种常规技术, 我们在加入冷异丙醇后, 一般在 -10°C 或冰上作用 10 分钟, 试验的重复性最好。

在本试验中对 140 Md、120 Md、60 Md、3.23 Md 的大小质粒提取均取得满意效果。对大肠埃希氏菌、志贺氏菌、鼠疫耶尔森氏菌的质粒提取也很有效, 特别是对鼠疫耶尔森氏菌的质粒提取效果最明显。上述结果均说明, 本方法对大小质粒及对其它一些革兰氏阴性菌的质粒提取均比较适用。

参 考 文 献

1. Birnboim H C and J Doly: Nucleic Acid Res, 1513,

- 1979.
2. Grouse J and D Amorese: Focus. 9(2): 3, 1987.
 3. Maxam A M and W Gilbert: Method Enzymol, 65: 499, 1980.
 4. Maniatis T, E F Fritsch, and J Sambrook: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

图 版 说 明

图 1 用醋酸钠、醋酸铵沉淀提取的 pBR322 质粒 DNA

1、2、3、4: 用醋酸铵 5、6、7: 用醋酸钠

图 2 不同温度下作用 30 分钟提取的 pBR322 质粒 DNA

1. -70°C 2. -20°C 3. 4°C 4. 室温

图 3 在异丙醇条件下 4°C 不同作用时间对质粒 DNA 回收量的影响

1,3: 作用 0 分钟; 2, 4: 作用 10 分钟为小量提取的 pBR322 质粒 DNA; 5, 8: 作用 20 分钟; 6. 作用 10 分钟为提纯的 pHc79 质粒 DNA; 7. 为对照提纯的 pHc79 DNA