

细菌 DNA 的一种大量提取方法

黄 锐 之

(浙江省农科院农产品产后技术开发研究中心)

摘要 本文介绍了一种大量提取细菌 DNA 的方法。该法是用 60℃ 裂解菌体,以氯仿-苯酚去除蛋白,用 RNase 去除 RNA,用 1 倍体积 95% 乙醇沉淀 DNA,省略了异丙醇沉淀步骤。而且该方法操作方便,对仪器要求不高。该法改进结果是:可稳定地得到 50—60% 的 DNA 回收率。可用于革兰氏阴性和阳性细菌的 DNA 提取。有些菌株用 Marmur 法和 Zaslloff 法提取, DNA 回收率在 10% 以下,采用本法仍能得到 50% 的回收率。每次提取的 DNA 量在毫克数量级。特别适合用于 T_m 法测定 DNA G + C mol% 含量所需 DNA 样品的制备。

关键词 DNA; 提取

随着分子生物学的不断发展,核酸技术已在生物学各领域得到广泛应用,细菌 DNA 的提取日益成为一种常规的实验手段。本文介绍的一种提取细菌 DNA 的方法,是在 Marmur 法和 Zaslloff 法基础上加以改进而成,操作简便,无需精密仪器设备,而有较高的 DNA 回收率。

材 料 和 方 法

(一) 供试菌株

共 13 株。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 1 株 (K12), 菊欧氏杆菌 (*Erwinia chrysanthi*

mi) 9 株 (Ech 5703, Ech5704, SRZ5, EchS 1, EchZ9, EchOB3, EchOG4, EchOS81, R8), 软腐欧氏杆菌 (*E. carotovora*) 1 株 (Ecc-12), 水稻白叶枯菌 (*Xanthomonas campestris*) 1 株 (X.O 1), 枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 1 株 (Bs1)。

(二) 细菌培养

各供试菌株在 3 ml 酵母-蛋白胨培养液 (YB)* 中 28℃ 生长 24 小时,再转入装有 500 ml YB 的 1000 ml 平底烧瓶中,28℃ 振荡培

* YB: 酵母抽提物 5g, 水解蛋白胨 10 g, NaCl 5g, 蔗糖 1g, 加水至 1000 ml, 1kg/cm² 20 分钟灭菌

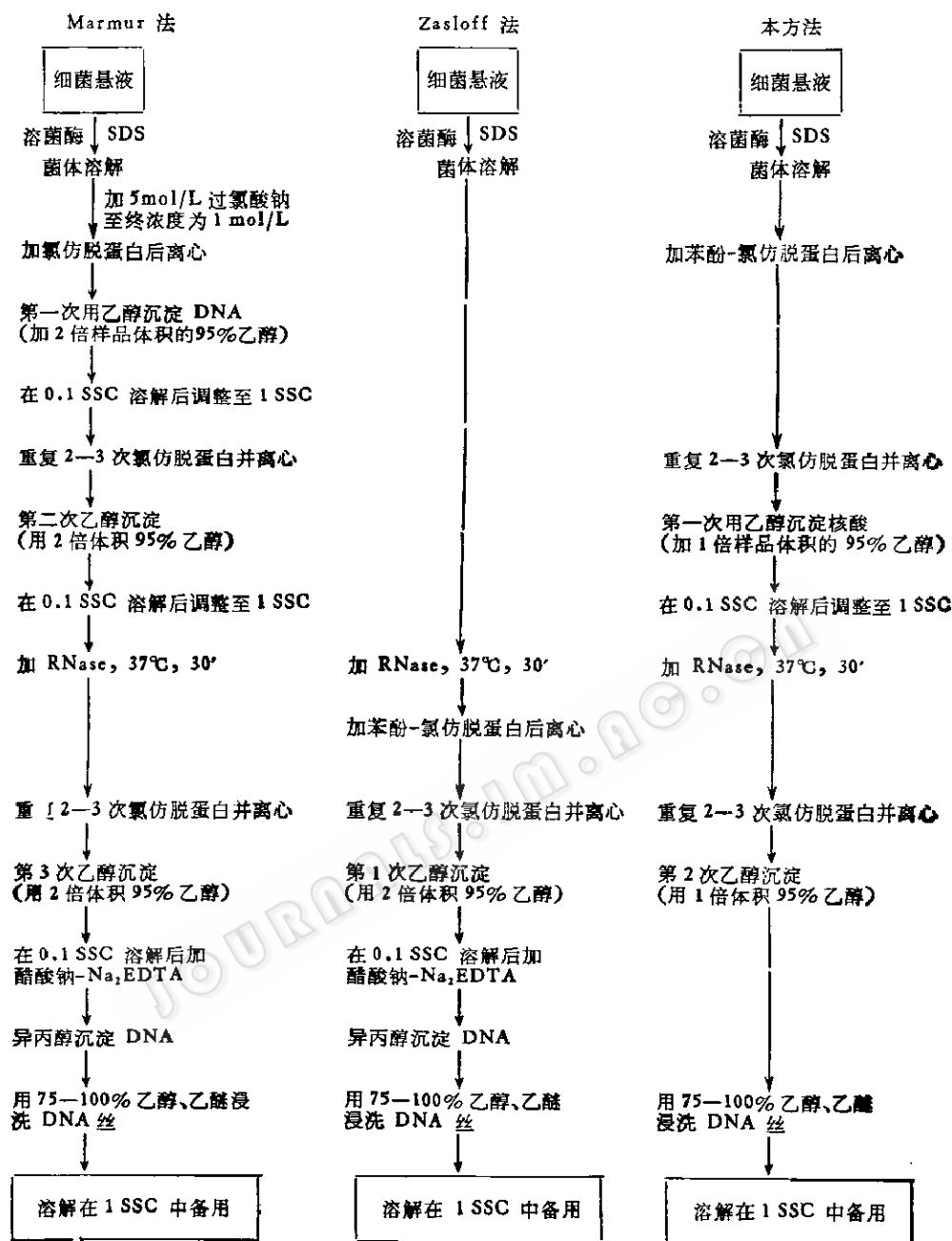


图 1 细菌 DNA 三种提取方法的比较

养 24 小时。

(三) DNA 提取方法(见图 1)

本方法基本按照 Zasloff^[1] 法进行,但在溶菌和 RNase 消化 RNA 步骤之间,参考 Marmur^[2] 法加入了一次脱蛋白、乙醇沉淀步骤。本方法用 1 倍样品体积的 95% 乙醇沉淀 DNA,并省略异丙醇沉淀步骤。除在 60℃ 溶菌,37℃ 进行酶处理外,其余步骤均可在室温

下进行。去蛋白步骤用 6000 r/min 离心 15 分钟。

(四) DNA 样品的定量测定

根据纯的天然 DNA 在 260 nm 处 10 D 相当 50 μg/ml,用紫外分光光度计测定 DNA 样品含量^[3]。

(五) DNA 样品的纯度测定

测定按林万明方法^[3]进行。

(六) T_m 值测定

测定按林万明方法^[5]进行,测定仪器由 752 型分光光度计改装,采用电加热,测定样品溶于 0.1 SSC。

结果和讨论

(一) 本法与 Marmur 法、Zasloff 法的比较(图 1)

从图 1 看,本法从细菌收集到菌体溶解,基本上按照 Zasloff^[1] 法进行。溶菌后, Zasloff 法是直接加 RNase 消化 RNA,再用苯酚-氯仿脱蛋白。而本法参照了 Marmur^[2] 法,在进行脱蛋白,乙醇沉淀,重溶于 1 SSC 后再用 RNase 处理 RNA,这主要是为了减小样品体积,便于操作,也可大大减少 RNase 的用量。

除溶菌和酶处理以外的操作均可在室温下进行,无需用冰浴,因此操作较为便利。离心速度采用 6000 r/min,对仪器要求不高,一般生化实验室都具备条件。

本法与以往 DNA 提取方法相比,具有以下特点: 1. 沉淀 DNA 时,用 1 倍样品体积的 95% 乙醇。2. 省略了异丙醇沉淀步骤。

(二) 用与样品等体积的 95% 乙醇能使 DNA 沉淀完全

国内外许多实验室在沉淀 DNA 时,常用 2 倍于样品体积的 95% 乙醇^{[1][2][4][5]}。本法只加入与样品等体积的 95% 乙醇,结果发现 DNA 沉淀完全,继续加入乙醇,也不会再增加 DNA 沉淀。如果在加入 2 倍样品体积的 95% 乙醇后再绕取 DNA 反而会有其他杂质沉淀下来,在 DNA 重溶于 1 SSC 时,会造成溶液混浊。而用 1 倍体积乙醇沉淀,得到的 DNA 在重溶后,溶液清亮。测定制备的 DNA 样品溶液的紫外吸收值,双链 DNA 纯制品的 $A_{260}:A_{280}$ 的比率应介于 1.65 和 1.85 之间^[6],用 1 倍样品体积 95% 乙醇沉淀制备的样品溶液 $A_{260}:A_{280}$ 比率在此范围内,而用 2 倍体积乙醇沉淀制备的样品该比值有时偏低,可能是有蛋白质或酚一类杂质存在^[6]。分析其原因,是加入 2 倍体积 95% 乙醇后,得到的 DNA 沉淀脱水程度较

大,绕出的 DNA 较致密,溶液中残存的蛋白质和苯酚被包夹在 DNA 沉淀中不易离开,而在随后用高浓度乙醇洗 DNA 沉淀时,其中部分蛋白质发生了变性,因而造成了重溶液 $A_{260}:A_{280}$ 比值偏低,并出现混浊。

(三) 省略异丙醇沉淀步骤,保证了较高的 DNA 回收率

一般在细菌 DNA 大量提取时,需要用异丙醇沉淀 DNA^{[3][7][8]}。但实验中发现,异丙醇沉淀容易造成 DNA 的大量损失,有时甚至得不到 DNA。本方法省略了异丙醇沉淀步骤,结果证明,不仅简化了操作,而且能稳定地获得 50—60% 的 DNA 回收率(按 4 mg DNA/1 g 湿菌计算)。用 Marmur 和 Zasloff 法,除 K12 的回收率可达 50%, Bsl 达 40% 外,其余供试菌株的 DNA 回收率都较低, X.O 1、Ecc-12 回收率在 20—30%, 9 个 *Erwinia chrysanthemi* 菌株的 DNA 回收率均小于 10%, 有时几乎回收不到 DNA。

(四) 本方法可制备纯的天然 DNA

根据 DNA 的最大吸收峰接近 260 nm, 蛋白质的吸收峰在 230 nm 和 280 nm, 本法用分

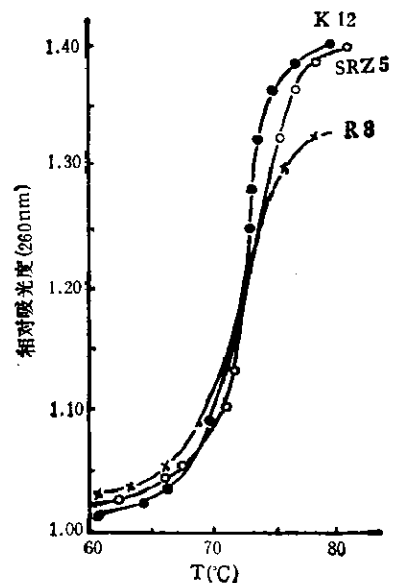


图 2 几个菌株用本方法提取的 DNA 在 0.1 SSC 中的热变性曲线

表 1 9 个菌株进行和不进行异丙醇沉淀制备的 DNA 的 T_m 值比较

菌 株	T_m 值*	
	进行异丙醇沉淀	不进行异丙醇沉淀
K ₁₂	72.3	72.5
Ech5703	72.4	72.3
Ech5704	72.7	72.8
EchZ9	73.4	73.3
EchOG4	73.2	73.2
EchOS81	72.9	72.6
Ecc-12	72.1	72.2
X.O1	77.0	76.9
Bs 1	69.5	69.7

* 测定 2—4 次的平均值

光光度计测定吸光度来估计 DNA 样品的纯度^[3]。纯的天然 DNA 的吸光度比例是:

$$A_{260}:A_{230}:A_{280} = 1:0.450:0.515^{[3]}$$

用本方法提取的 4 个属 13 个菌株的 DNA 的样品紫外吸收值符合上述比例关系。

热变性曲线显示, 用本方法提取的 DNA 样品中以天然的双链 DNA 为主(图 2)。

同一菌株用本法几次制备的 DNA 样品

T_m 值误差不超过 0.3℃, 同一菌株进行或不进行异丙醇沉淀制备的 DNA 样品 T_m 值也是一致的(见表 1)。

本方法一次提取的 DNA 量在毫克数量级, 很适合用于制备用 T_m 法测定 DNA G+C mol% 的 DNA 样品。

参 考 文 献

1. Zasloff, M et al.: *Nucleic Acid Research* 5(4): 1139, 1978.
2. Marmur, J: *J. Mol. Biol.* 3:208, 1961.
3. 程光胜等: 分析微生物学专辑。科学出版社, 北京, 第 38—98 页, 1988 年。
4. Saito, H et al.: *Biochim. Biophys. Acta.* 72:619—629, 1963.
5. P 康德拉等: 分子生物学方法。李申德译。科学出版社, 北京, 第 48 页, 1977。
6. R F 施莱夫等: 分子生物学实用方法。章静波等译。人民卫生出版社, 北京, 第 99 页, 1985 年。
7. Owen, R J et al.: *J. Gen. Microbio.* 93: 89—102, 1976.
8. Owen, R J et al.: *Identification Methods for Microbiologists*, 2nd Ed. P. 277—280, eds. Skinner, F A & Lovelock, S M, Academic Press, London & New York, 1979.