

一种快速提取大质粒的方法

金松谟 颜望明

(山东大学微生物研究所, 济南)

摘要 本文介绍一种快速提取大质粒的方法。应用该方法,对含有 pTA1, R68.45, RP₁:Tn501, pUB307, RP₄, pJRD215 和 pTt30 质粒的多能硫杆菌 (*Thiobacillus versutus*)、氧化硫硫杆菌 (*Thiobacillus thiooxidans*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 进行了质粒提取。结果表明,该方法提取的质粒条带清晰,分辨率高,而且重复性好。

关键词 大质粒;快速提取

在遗传工程研究中,常用快速提取质粒的方法对大量的样品进行检测。但是,目前已建立的几种快速提取质粒的方法^[1-4],比较适合于提取多拷贝的小质粒,用于提取大质粒比较困难,而且也不易重复。本文介绍在实验的基础上,对前人的方法进行了修改,用于快速提取大质粒,取得了较为满意的效果。

材料和方法

1. 菌株和质粒: *E. coli* C600 (R68.45), *E. coli* C600 (RP₁::Tn501), *E. coli* C600 (pUB307), *E. coli* C600 (RP₄), *T. versutus* SM-1 (pTA1), *T. versutus* SM-1 (pTA1, pJRD215), *T. thiooxidans* Tt-3 (pTt30), *T. thiooxidans* Tt-3 (pTt30, RP₁)。

2. 试剂和药品: 琼脂糖为上海东海制药厂产品。十二烷基硫酸钠(SDS)重结晶,为浙江黄岩东门化工厂产品。

溶液 I: 50mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L EDTA, 25mmol/L Tris·Cl(pH8.0)。

溶液 II: 0.2mol/L NaOH, 1% SDS。

溶液 III: 5mol/L KAc(pH4.8)。

TE 缓冲液: 10mmol/L Tris·Cl (pH8.0), 1mmol/L EDTA。

3. 质粒提取方法: 用接种环挑取少量的大肠杆菌或多能硫杆菌体接种于 5 ml/100ml 三角瓶的 LB 液体培养基中, 37℃ 温箱培养过夜。取 1ml 菌液盛于 1.5ml 的 Eppendorf 管中离心 1 分钟, 弃去上清液, 空干后, 将菌体悬浮于 100 μ l 溶液 I 中, 加入 200 μ l 溶液 II, 混匀后, 置 0℃ 冰浴中 5 分钟, 再加 150 μ l 溶液 III, 混匀, 0℃ 冰浴 15 分钟, 离心 5 分钟, 将上清液小心移到另一个干净的 Eppendorf 管中(不要吸上沉淀物), 加 2 倍体积预冷的 95% 乙醇, -20℃ 放置 20 分钟, 离心弃去上清液, 真空干燥, 用 10 μ l TE 缓冲液溶解, 备用。

氧化硫硫杆菌按 5% 的接种量接种 20ml/100ml 三角瓶的硫磺培养基^[5], 30℃ 温箱培养 5 天。取 3ml 菌液离心收集菌体, 菌体去除硫磺后, 再用 0.5ml 溶液 I 洗涤一次, 将菌体悬浮

于 100 μ l 溶液 I 中。然后按上述方法提取质粒。

4. 琼脂糖凝胶电泳: 电泳条件见文献[5]。

结果与讨论

用上述方法,我们对含有 R68.45(62.1kb), RP₁::Tn501 (68.2kb), pUB307 (55kb) 的 *E. coli* 和含有 pTA1(100kb) 及同时含有 pTA1 和 RP₁::Tn501 的 *T. versutus* SM-1 菌株进行了质粒提取, 结果见图 1。从图 1 中可以看出, 不仅大质粒条带很清晰, 而且图 1(c) 的两个大质粒 pTA1 和 RP₁::Tn501 也分离得很好, 清晰可见。

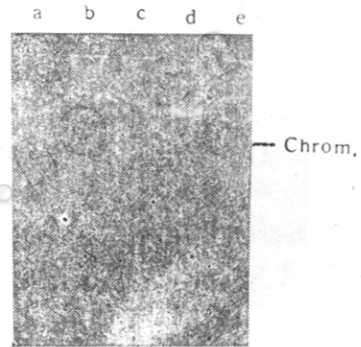


图 1 质粒快速提取电泳图谱

- a. *E. coli* C600 (R68.45);
 b. *T. versutus* SM-1 (pTA1);
 c. *T. versutus* SM-1 (pTA1, RP₁::Tn501);
 d. *E. coli* C600 (RP₁::Tn501);
 e. *E. coli* C600 (pUB307)

为了验证该方法在提取大质粒的同时对小质粒的提取效果, 我们对同时含大质粒 pTA1 (100kb) 和小质粒 pJRD215 (10.2kb) 的 *T. versutus* SM-1 菌株进行了质粒检测, 结果表明, 用该方法同时提取大质粒和小质粒效果均很好(图 2)。此外, 该方法不仅适用于大肠杆菌和多能硫杆菌, 而且也适用于质粒提取比较困难的氧化硫硫杆菌(图 3), 这一方法与文献[5]相比, 极大地简化了氧化硫硫杆菌的质粒提取。

在快速提取过程中, 我们发现菌体量与溶液 II 的比例非常重要。尤其是提取大质粒, 菌

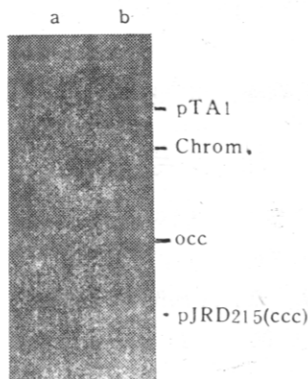


图2 质粒快速提取电泳图谱

- a. *T. versutus* SM-1 (pTA1);
b. *T. versutus* SM-1 (pTA1, pJRD215)

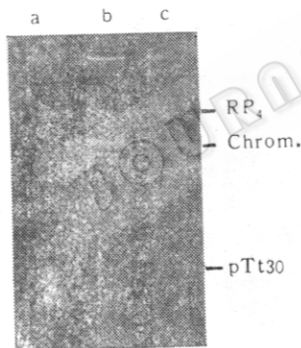


图3 质粒快速提取电泳图谱

- a. *E. coli* C600(RP₄);
b. *T. thiooxidans* Tt-3 (pTt30);
c. *T. thiooxidans* Tt-3 (pTt30, RP₄)

体量过大或过小都得不到满意的结果。菌体量的大小又与菌种的生长快慢及生长状态密切相

关,因此又必须根据不同菌种及其生长情况加以调整。只有这样才能取得比较满意的效果。还应该指出的是溶液 II 最好现配现用,否则 pH 下降,影响提取效果。

在提取氧化硫硫杆菌质粒时,应注意掌握菌体的生长时期及状态,一般在对数中后期收集菌体最好,在我们的实验中,培养 5 天为宜。培养时间过长,细胞壁不易破碎,影响提取。

在提取过程中,将溶液 III 的处理时间调整到 15 分钟。同时还省略了苯酚和氯仿的抽提过程,以减少抽提过程对大质粒的损伤。实验结果表明,只要严格操作,在质粒沉淀物中蛋白质很少,也比较容易溶解。

经过上述几个方面的修改,得到了一种快速提取大质粒的方法。该方法具有快速,简便,同时可以操作多个不同的样品等优点,而且重复性好,质粒带清晰,分辨率高,是一种比较理想的快速提取大质粒的方法。

参 考 文 献

1. Birnboim and Doly: *Nucleic Acids Res.*, **7(6)**:1513-1523, 1979.
2. Ish-Horowitz and Burke: *Nucleic Acids Res.*, **9(13)**: 2989-2998, 1981.
3. Holmes and Quigley: *Anal. Biochem.*, **114**: 193-197, 1981.
4. Maniatis T et al.: *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. p. 368-369, 1982.
5. 金松谟, 颜望明: *微生物学通报*, **15(1)**: 20-21, 1988.