

# 一种快速简单的质粒 DNA 纯化方法

周天鸿 李月琴 刘飞鹏 温 晋

(暨南大学生物学系, 广州, 510632)

**摘要** 本文介绍一种快速获取高纯度质粒 DNA 的方法。本法对煮沸提取法进行改良后, 快速获取质粒 DNA 粗制品, 然后用国产滤纸从琼脂糖凝胶中回收纯化质粒 DNA。同时对本法所提取的质粒 DNA 的回收率、浓度、纯度及可能的用途进行验证和讨论, 证明此法简易, 所得样品纯度高, 可直接用于转化、酶切和基因克隆。

**关键词** 质粒 DNA; 溴代十六烷基三甲胺; 滤纸回收纯化

质粒 DNA 提取和纯化的方法已有很多报道<sup>[1]</sup>, 这些方法有各自的优缺点。但快速获取高纯度的产品, 仍是人们关注的问题。我们在煮沸抽提法和 Errington 法<sup>[2]</sup>基础上进行改良, 利用简单材料, 在短时间内可得到高纯度质粒 DNA。现将结果报道如下。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌株和质粒

大肠杆菌 C600 (*Escherichia coli* C600)

4 株, 分别携带质粒 pUC18、pBC11、pTZ22 和 pXC50。枯草杆菌 BR151 (*Bacillus subtilis* BR151), 含有 pUB110 质粒。以上菌株均为本系保存。

### (二) 试剂和滤纸

TSET 溶液 (0.5% Triton X-100, 8% 蔗糖, 50mmol/L EDTA, 10mmol/L Tris·Cl, pH8.0); 电泳缓冲液 (0.03mol/L Tris-乙酸, 0.001mol/L EDTA, pH8.0)。以上试剂均需  $9.8 \times 10^4$  Pa 灭菌。加样缓冲液 (0.25% 溴

酚蓝, 40% 蔗糖, 0.25% Xylene cyanol); 溴代十六烷基三甲胺溶液 (30m mol/L)。定性滤纸为杭州新华造纸厂出品。

### (三) 质粒 DNA 快速提纯法

1. 质粒 DNA 粗制品制备: 取实验菌株的过夜培养液 1.5ml 于离心管中, 用台式高速离心机 10000r/min 离心 1 分钟, 弃上清, 把沉淀菌体悬浮于 350 $\mu$ l 的 TSET 溶液中。加入 20  $\mu$ l 溶菌酶液 (10 mg/ml 溶于 10mmol/L Tris · Cl pH7.5), 反应液在漩涡混合器上混合 3 秒, 转入沸水中 60-90 秒, 取出离心管, 15000 r/min 离心 10 分钟。用牙签挑去管底沉淀物, 在上清液中加入 35 $\mu$ l 的溴代十六烷基三甲胺溶液和 400 $\mu$ l 异丙醇, 置室温 20 分钟。然后以 15000r/min 离心 10 分钟, 倒去上清, 沉淀物用 75% 乙醇洗涤 1 次, 然后溶于 30 $\mu$ l TE 溶液 (10m mol/L Tris · Cl, 1m mol/L EDTA, pH8.0)。此溶解液即为质粒 DNA 粗制品。

2. 质粒 DNA 的滤纸回收纯化: 粗制品在 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳<sup>[3]</sup>, 将 30  $\mu$ l DNA 粗制品和 3 $\mu$ l 的加样缓冲液混合均匀加样, 以 80V 电压电泳 1 小时左右。置电泳凝胶于手提紫外灯下, 观察到质粒 DNA、染色体片段和 RNA 已经分开后, 用一解剖刀在紧靠超螺旋质粒 DNA 前划一裂缝, 剪裁一小块灭过菌的定性滤纸, 插入 DNA 带前的裂缝中, 继续电泳 1 分钟。待 DNA 带进入滤纸后, 取出滤纸, 剪去未插入凝胶的部分, 将带有 DNA 的滤纸片放进一个 0.5ml 的塑料离心管(管底已刺穿一个小孔), 然后将 0.5ml 的管子置于另一个 1.5ml 离心管内。两个套管在 15000r/min 转速下离心 25 秒, 将含有 DNA 的电泳液甩入 1.5ml 离心管内。

### (四) 酶反应和转化

质粒 DNA 的限制性核酸内切酶酶切, T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接和转化反应按 Sumbrook 法<sup>[4]</sup>进行。

## 结果和讨论

### (一) 质粒 DNA 的分离

我们以改良的煮沸抽提法来获取质粒 DNA 粗制品。抽提过程主要改变的地方有两点: 一是煮沸时间适当延长为 60-90 秒, 有助于提高产物纯度; 二是改用溴代十六烷基三甲胺替代乙酸钠, 可增加回收率, 缩短沉淀时间, 并可利用室温条件沉淀。用不加异丙醇的溴代十六烷基三甲胺也可沉淀质粒 DNA, 所得样品纯度虽然高, 但得率低。为了满足纯化步骤所需, 故仍和异丙醇共沉淀。采用上述方法抽提了 5 株不同质粒的大肠杆菌和枯草杆菌, 各得到 0.3-1.2 $\mu$ g 的质粒 DNA 粗制品。其中 pBC11 质粒 DNA 的电泳见图版 1。

### (二) 质粒 DNA 的滤纸回收纯化

质粒 DNA 的粗制品纯度较差, 会影响酶反应, 为满足基因克隆的要求, 需要进一步纯化。利用琼脂糖凝胶回收法可以解决纯度问题, 但常规回收方法, 如低熔点琼脂糖法, DEAE 纤维纸法等, 都存在成本高, 来源少, 费时等缺点。而本法采用国产定性滤纸回收质粒 DNA, 成本低, 且所得样品纯度与氯化铯梯度离心所得的样品相近。经滤纸回收纯化的 pBC11 质粒 DNA 电泳见图版 1, 图中纯化的质粒 DNA 样品只有一种超螺旋构象, 其他构象及杂质均已消除。

经滤纸回收纯化的质粒 DNA 的得率和浓度与滤纸数量有关。若粗制品体积为 30 $\mu$ l, 量为 500ng, 用 1 张滤纸分离, 质粒 DNA 得率为 100ng, 浓度为 10ng/ $\mu$ l, 此得率已可满足常规克隆所需。若需要量较大时, 可叠上数张相应大小的滤纸来回收。用 3 张滤纸叠起分离点样量为 500ng 的质粒 DNA 时, 可得到 250ng 的回收量。亦可用单张滤纸多次回收, 在同样条件下, 5 次单滤纸纯化 500ng 点样量的质粒 DNA 超螺旋带, 共得到 400ng 的纯化样品。利用此法我们成功地纯化了分子量为 2.7kb-1.3kb 的上述 5 种质粒 DNA。这种在短时间内获得的高纯度质粒 DNA, 直接用于鉴定、转化、酶切分析和连接等, 效果良好。

我们用本法制备的 10ng pBR322 质粒

(下转第 63 页)

DNA 以氯化钙处理法转化大肠杆菌 C600, 转化率为  $1.4 \times 10^7$  转化子/ $\mu\text{g}$  DNA, 而用相同量商品 pBR322 质粒 DNA, 在相同条件下转化同一菌株, 转化率为  $9.8 \times 10^6$  转化子/ $\mu\text{g}$  DNA。可见本法制备的质粒 DNA 转化率高于商品质粒 DNA。

本法制备的质粒 DNA, 其溶剂是低浓度的电泳缓冲液, 对 DNA 重组中的一些常用酶影响不大。我们利用 HindIII、EcoRI 和 BamHI 等限制性内切酶对所制备的质粒 DNA 进行酶切, 证实了本法制备的质粒 DNA 能被完全酶切。同时, 把酶切后的线状质粒 DNA 用 T<sub>4</sub> 连接酶进行自连实验, 自连质粒用于转化大肠杆菌 C600 菌株, 结果很成功。可见本法纯化的质粒 DNA 中遗留下的缓冲液中的化

学成分不会干扰 T<sub>4</sub> 连接酶反应。而不经纯化的常见的快速抽提法<sup>[1,4,5]</sup>制备的质粒 DNA, 有些虽可进行酶切分析, 但在我们所进行的比较实验中, 几乎不能进行酶切-自连转化实验。另外, 据报道<sup>[2]</sup>电泳缓冲液中的化学成分对 T<sub>4</sub> 激酶干扰较小, 所以利用本法纯化的 DNA 片段也可直接用于激酶反应。

## 参 考 文 献

1. Sambrook J et al: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, P. 121—152, 1989.
2. Errington J et al: *Nucleic Acids Research*, 18(1): 5324, 1990.
3. 彭秀玲等: 基因工程实验技术, 第 36—47 页, 湖南科学技术出版社, 长沙, 1987 年。
4. 徐建国等: 微生物学通报, 16(1): 44—45, 1989。
5. 李宏超: 遗传, 13(2): 25—26, 1991。

(1991-12-2 收稿)