

一种改进的快速高效 DNA 回收法

王振东* 刘玉乐 田波

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 本文介绍了一种简易、高效、快速的 DNA 回收法。该法回收 DNA 效率可达 90% 以上, 且省时经济、适用范围广。回收的 DNA 片段稍加纯化处理即可用于酶切、连接等多种分子操作。

关键词 DNA 回收, 简易高效快速

关于 DNA 的回收方法很多^[1-3], 但这些方法各有不同缺点。或费时费力, 或用药品及设备昂贵, 或适用范围窄。以前曾有人尝试用于凝胶上挖孔的办法回收 DNA。即 DNA 电泳后, 在回收带前方挖一小孔, 然后孔中注满电泳缓冲液继续电泳。吸出含 DNA 的电泳缓冲液后加以沉淀纯化回收。但由于 DNA 在电泳缓冲液中扩散极快, 且需往反电泳, 故此法费时, 回收率也很低。我们这里介绍了该法的改进法, 从而达到了快速、简便、回收率高,

费用低, 质量也高的目的。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pGEM-7Zf (+) —Sma I 片段、pRoKII-XbaI 片段及核酸酶 BN 基因片段。

1.2 挡板的制备

现在工作单位: 沈阳农业大学植保系; 沈阳 110161
1993-07-01 收稿

取一块薄铝片(易拉罐皮即可),做成秃宝盖字(“一”型),宽度稍宽于加样孔,外包一层 Parafilm 膜,此即挡板。

1.3 DNA 的回收

取 pGEM-7Zf (+)-Sma I 片段 500ng,在含溴化乙锭(EB)的琼脂糖胶上电泳^[5]。待 DNA 带离开加样孔一定距离时停止电泳。用解剖刀在欲回收 DNA 带前紧靠 DNA 带处挖一小槽。吸走部分电泳槽中的电泳缓冲液,使液面稍低于凝胶板面。用镊子将挡板插入槽孔的正极侧,并孔中注满新的电泳缓冲液。通电继续电泳,待 DNA 完全泳入槽孔中的液体时停止电泳。吸出槽孔中含 DNA 的液体装入 eppendorf 管中,等体积酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提一次。上清加 1/10 体积 3mol/L NaAc (pH5.2) 及两体积无水乙醇,混匀后置 eppendorf 管于液 N₂ 中 10 分钟。12K_r/min 离心 10 分钟。沉淀物用 70%、100% 酒精洗涤,抽干后将 DNA 溶解在 10 μ l TE 缓冲液中,此即回收纯化的 DNA 液。同样方法回收 11kb 的 pRoKII-XbaI 片段及 0.33kb 的核酸酶 BN 基因片段。

1.4 回收 DNA 的定量

用 TE 缓冲液适当稀释回收 DNA 液,以紫外吸收法(OD₂₆₀)进行定量测定^[4]。另取 5 μ l 回收 DNA 液进行 1% 的琼脂糖-EB-1 \times TAE 电泳^[5],检测回收情况。

2. 结果与讨论

经测定计算,回收后 pGEM-7Z 的总量为 457ng,故回收率为 95%;回收 11kb 的 pRoKII-XbaI 片段及 0.33kb 的核酸酶 BN 基因片段的回收率分别为 92% 和 92.5%。即回收 0.33—11kb 的 DNA 均有较高的回收率。图 1 显示了回收 pGEM-7Zf (+)-Sma I 片段的电泳情况。

DNA 片段的回收是分子克隆操作中的一重要技术。多年来曾提出过多种从凝胶中回收 DNA 的方法,但没有一种尽如人意^[4]。存在的主要问题是:(1) 酶促反应抑制剂的存在:多数级别的琼脂糖中含硫酸多糖

类物质,这些物质易和 DNA 一起从凝胶中抽提出来,但难能从 DNA 中将它除去。且这类物质是随后克隆操作中许多酶反应的强烈抑制剂,故使限制酶及连接酶反应等效率大幅度降低。甚至有时回收的 DNA 无法用于酶促

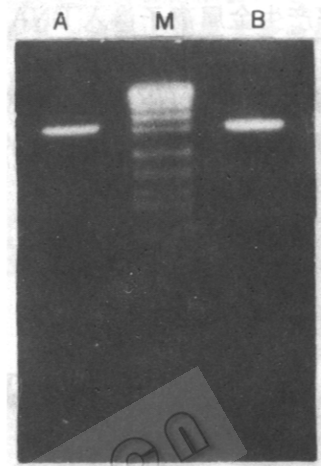


图 1 pGEM-7Zf (+)-Sma I 片段回收后的 1% 琼脂糖凝胶电泳图谱

- A. 低熔点琼脂糖凝胶法回收的样品
B. 改进法回收的样品
M. Spp I-EcoR I Marker

反应。(2) 不能有效地回收大片段 DNA: 从凝胶中回收 DNA 的效率是其分子量的函数。尽管多数方法能以大于 50% 的产量回收长度小于 5kb 的 DNA 片段,但这些方法都不能令人满意地回收更大的片段。随 DNA 片段长度的增加,回收产量递减。尤其是结合在固相基质如 DEAE-Sephacel 或 DEAE-纤维素膜的方法纯化 DNA 时则更为严重,片断越大,与基质结合的越牢固,故难能将 DNA 洗脱下来。(3) 不能有效地回收少量 DNA: 一些方法由于样品中 DNA 含量少,回收过程中又损失很大,以至于少于 500ng 的 DNA 带根本就不值得去回收。

而我们这里所报道的改进 DNA 回收法,克服了上述缺点。用该方法回收的 DNA 片段可以用于各种分子克隆的操作,且可高效地回收各种不同长度的 DNA 片段(0.33—

11kb), 且不受 DNA 量的限制, 是一种理想的, 简单易行的 DNA 回收方法。目前此回收方法在本实验室已成常规技术而被应用。

但需注意, 本法回收 DNA 有两个操作要点。一是挡板务必包严 Parafilm 膜, 否则电泳时将电解产生金属离子渗入 DNA 液中影响以后的酶促反应; 二是挡板的下边(插入凝胶的一边)务必剪齐, 以使挡板和凝胶支承板面封合, 否则 DNA 将从二者结合处的缝隙中遗漏而达不到应有的回收效率。

参 考 文 献

- [1] Southern E J. *Molecular Biol.* 1975, 98: 503.
- [2] Wu R. *Methods in Cancer Researchs.* 1976, 12: 87.
- [3] Smith H O. *Methods in Enzymol.* 1980, 65: 371.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning—A Laboratory Manual.* 2nd ed. New York: CSH lab press, 1989, 6, 22.
- [5] 彭秀玲. 《基因工程实验技术》, 长沙: 湖南科技出版社, 1987. 36.