《第一军医大学学报》2002年8期

应用十六烷基三甲基溴化铵纯化PCR产物

在分子生物学实验中，如PCR产物与载体连接、测序等，需要对PCR产物进行纯化。目前许多公司都开发出试剂盒，但其价格比较贵。作者根据十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)与核酸相结合的特性，利用它进行PCR产物纯化，所得的纯化产物可以用于与T载体连接，提高连接效率。

1　材料与方法

1.1　材料

CTAB为国产分析纯，Taq酶、连接酶等购自Takara公司，PCR产物纯化试剂盒购自Omega公司。

1.2　方法

1.2.1 引物合成　 引物由上海博亚公司合成。引物A：(5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'，)、引物B(5'-CAG GAAACAGCTATGAC-3')各10 μl。

1.2.2　PCR扩增　 挑选2个阳性克隆(转染有质粒，X1、X2克隆)，1.5 ml Eppendorff管中培养4 h后，取100 μl 菌液，沸水浴10 min，离心后取5 μl上清作为模板进行PCR扩增，3.2 μmol/L的引物A(5'-GTAA AACGACGGCCAGT-3'，)、引物B(5'-CAGGAAACA GCTATGAC-3')各10 μl，Taq酶5 U，10×buffer 10 μl，加水补足100 μl；94 ℃　5 min，94 ℃ 30 s，50 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，25次循环；72 ℃ 8 min。

1.2.3　应用Omega试剂盒纯化PCR产物，取上述PCR产物40 μl，按其说明书进行。最后用11 μl　H_2O溶解回收，用紫外分光光度计DU530测定$D_{260/280}$和琼脂糖电泳检测。

1.2.4　应用CTAB纯化PCR产物　 取1.2.2中PCR产物40 μl加入5 μl 3.5 mol/L NaCl，混匀后加入5 μl 10%的CTAB，混匀；室温高速离心10 min，弃上清，加入100 μl 1.2 mol/L NaCl重悬沉淀，加入270 μl的无水乙醇，室温离心10 min，弃上清，75%的乙醇洗涤沉淀，干燥后，11 μl H_2O溶解沉淀。检测同1.2.3。

2　结果

PCR产物和纯化的产物电泳如图1所示。小于100 bp的DNA带为引物二聚体。从图中可以看出PCR产物在纯化以前，明显有引物二聚体，在纯化之后，引物二聚体的带消失。表1列出了纯化后所得的浓度，所得产率约为试剂盒的80%。

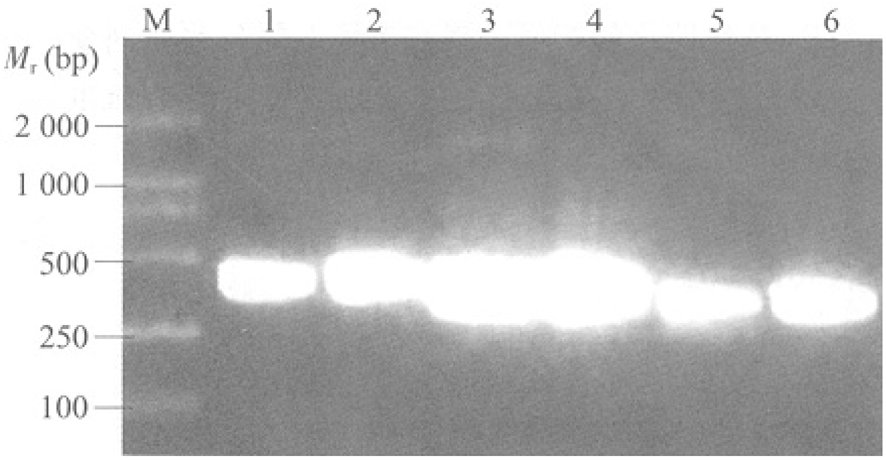

图1　PCR产物纯化前、后电泳

Fig. 1　Electrophoresis of　the PCR products

M: Marker; Lanes 1, 3, 5: PCR products of X1 clone　purified with kit of Omega, and purified with CTAB, respectively; Lanes 2, 4, 6 : PCR products of X2 clone corresponding to lane1, 3, 5 respectively

表 1 PCR 产物纯化后的浓度(μg/ml)

Tab.1 The concentration of the purified product (μg/ml)

	Purification with CTAB	Purification with kit
X1 clone	50.3	68.7
X2 clone	64.4	85.9

3　讨论

CTAB是一种界面活性剂，能裂解细胞并使蛋白质在溶液中成为可溶状态[1]，可以用于分离RNA和DNA。RNA与CTAB结合后，RNA不再是RNase的底物，因此它可作为核酸的保护剂。所分离的核酸可以用于RT-PCR或PCR反应，特别适合较难提取的组织，如植物、海葵[1]、细菌[2]、真菌[3]等。它能沉淀RNA和DNA，其作用机制可能是它与多阴离子的核酸形成电中性的复合物。这种复合物受盐浓度的影响，当NaCl的浓度大于1 mol/L时，不能形成复合体；当小于0.2 mol/L时，所有的核酸都将与CTAB结合；当NaCl浓度在0.3~0.4 mol/L时，CTAB与单链核酸如寡核苷酸引物的结合效率很低[5]。从实验结果中可以看出，采用CTAB的方法纯化PCR产物，能够有效地除去PCR产物中引物二聚体，与Omega试剂盒的作用具有相同的效果。但CTAB纯化的方法所得的产率为Omega试剂盒的80%，如果在加入10% CTAB后，延长离心时间，产率有所提高(结果未列出)。与试剂盒相比，CTAB法纯化PCR产物比较经济，其成本是试剂盒的1/8左右，而且试剂盒有一定时间限制。PCR产物中含有引物和dNTP，这些物质的存在将影响连接效率。本实验室用CTAB纯化后所得的产物，可以用于与pMD-18 T载体连接。

参考文献：

[1]　Macfarlane DE, Dahle CE. Isolating RNA from whole blood—the dawn of RNA-based diagnosis[J]? Nature, 1993, 362(6416):186-8.

[2]　Dellacorte C. Isolation of nucleic acids from the sea anemone Condy- lactis gigantea (Cridaria: Anthozoa)[J]. Tissue Cell, 1994, 26(4): 613-9.

[3]　Fiore MF, Moon DH, Tsai SM, et al. Miniprep DNA isolation from unicellular and

filamentous cyanobacteria[J]. J Microbiol Methods, 2000, 39(2): 159-69.

Velegraki A, Kambouris M, Kostourou A, et al. Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification[J]. Med Mycol, 1999, 37(1): 69-73.

[5] Belyavsky A, Vinogradova T, Rajewsky K. PCR-baseed cDNA library construction: general cDNA library at the level of a few cells[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(8): 2919-32.

参考文献：

[1] Macfarlane DE, Dahle CE. Isolating RNA from whole blood—the dawn of RNA-based diagnosis[J]? Nature, 1993, 362(6416):186-8.

[2] Dellacorte C. Isolation of nucleic acids from the sea anemone Condy- lactis gigantea (Cridaria: Anthozoa)[J]. Tissue Cell, 1994, 26(4): 613-9.

[3] Fiore MF, Moon DH, Tsai SM, et al. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria[J]. J Microbiol Methods, 2000, 39(2): 159-69.

Velegraki A, Kambouris M, Kostourou A, et al. Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification[J]. Med Mycol, 1999, 37(1): 69-73.

[5] Belyavsky A, Vinogradova T, Rajewsky K. PCR-baseed cDNA library construction: general cDNA library at the level of a few cells[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(8): 2919-32.

回结果列表