

用透析膜从琼脂糖胶中回收 DNA 片段

冯博¹⁾ 李育阳

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

实验技术与方法

分离与回收 DNA 片段是基因操作的重要环节之一。本文介绍了一个用透析膜从琼脂糖胶中回收 DNA 片段的改进方法。利用本法回收 DNA 片段洗脱容易、节约时间、回收率在 80% 左右。回收的 DNA 片段可用于酶切反应、连接反应和用缺口位移反应制备³²P 标记 DNA 探针。

关键词: 透析膜, 琼脂糖胶, DNA 片段

分离与回收 DNA 片段是基因操作的重要环节之一, 目前已经发表的方法很多, 如: 低熔点琼脂糖法^[1]、冷冻榨出法^[2]、DEAE 纤维素纸法^[3]和滤纸片法^[4]等。这些方法都有一定缺点, 如操作过程繁琐、费时, 洗脱纯化步骤复杂, 且随着片段增大回收效率明显下降。1979 年 Yang 等人曾报道用透析膜回收 DNA 片段的方法, 可以获得理想的回收效率(90% 以上)^[5]。但是, 由于该法不易操作, 且洗脱体积大, 因而未得到广泛采用。我们吸取了该方法和 DEAE 纤维素法的优点, 采用将 DNA 片段电泳吸附到透析膜上, 然后直接取出洗脱的方法, 获得了较高的回收效率(80% 左右)。回收的 DNA 具有较好的纯度。具体操作如下:

1. DNA 片段的分离 采用 0.8—1.5% 浓度的琼脂糖胶(华美生物公司)及醋酸缓冲系统, 在水平电泳槽中进行电泳。EB 染料在制胶时直接加入胶中。电泳区带用长波紫外光观察。待 DNA 带分开后, 停止电泳。注意尽量减少紫外光照射量。

2. 将 DNA 片段电泳吸附到透析膜上 在要收集的区带前方用刀片切一约 2mm 宽的小槽, 清除槽内残胶, 将透析膜切成宽与胶厚和带长相对应的小条, 浸于蒸馏水中备用。用镊子将透析膜置入小槽中, 使其不要接触靠近 DNA 区带一侧的胶缘(见图 1), 继续电泳, DNA 便电泳到膜上并吸附在上面。待要收集的 DNA 区带全部电泳至膜上后, 用镊子将膜取出。因为 DNA 只是吸附在膜上, 故取出时动作要干脆, 要避免摇动或将膜碰到槽的边缘。操作不当, DNA 可能会脱落。若用双层透析膜, 亦不影响回收效果, 且容易操作。

3. DNA 片段的洗脱及纯化 将膜放入 200 微升 TE 缓冲液中, 用微量取样器反复吹打数次, DNA 即可从膜上洗下。弃去膜, 用 200 微升酚:氯仿:异戊醇(24:24:1)抽提一次, 以除去可能影响连接或转化的

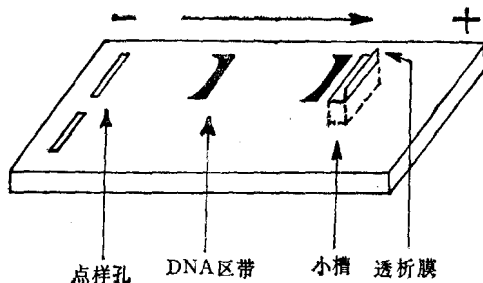


图 1 DNA 片段电泳吸附到透析膜示意图

杂质。然后加入 5N NaCl, 使最终浓度为 0.2M 左右。再用三倍体积的水饱和和正丁醇抽提一次, 去除 EB。取水相, 加二倍体积的乙醇沉淀 DNA。

为了精确测定 DNA 片段的回收率, 我们选用四种大小不同的 DNA 片段, 其中 23.1kb, 9.4kb 和 4.4 kb 片段来自 λ DNA Hind III 酶解产物; 1.2kb 片段由质粒 YFD26 Δ 5 经过 BamHI, HindIII 双酶解取得。DNA 经缺口位移使 α^{32} P-dATP 得以掺入。约 20 μ g 样品分为两等分, 其中一份按上述方法进行回收、洗脱和纯化, 另一份直接将相应的区带切下, 溶于 5M 碘化钾中, 作为回收前的 DNA 对照。样品用液体闪烁计数器测定放射性强度, 然后计算回收率。实验结果见表 1, 其中回收率为 3 次独立实验的均值。

从上述结果可以看出, 对于大小从 1.2kb 到 23.1 kb 的 DNA 片段均可获得较高的产率, 随着片段的增大, 回收率略有提高。因此, 本方法有利于大片段 DNA 的回收。

在以前的众多方法中, 主要采用特异性吸附 DNA

Feng Bo et al.; Recovery of DNA Fragments from Agarose Gel by Using Dialysis Membrane

1) 同济医科大学硕士研究生, 武汉。

本文于 1988 年 5 月 19 日收到。

表1 DNA 片段从琼脂糖胶中的回收率

片段	大小 (kb)	回收率% ($\bar{x} \pm a$)
1	23.1	82 \pm 17.7
2	9.4	89 \pm 9.5
3	4.4	78 \pm 8.8
4	1.2	76 \pm 8.7

的介质或从胶中直接分离 DNA 片段,前者洗脱过程复杂,对于大片段 DNA (>10kb) 洗脱相当困难;后者则很难避免胶中干扰连接或转化的杂质污染。我们的方法克服了两者的缺点。另外,本方法还有洗脱容易、节省时间、回收率高等优点。我们曾用回收的 DNA 片段进行了限制性内切酶酶解,缺口位移标记

DNA 探针,结果满意。还多次将回收片段克隆到 M13 噬菌体 DNA 及其他质粒 DNA 上,获得了理想的连接和转化效率。

参 考 文 献

- [1] Dretzen, G. et al.: 1981. *Anal. Biochem.* ,112: 295-298.
- [2] Girvitz, S. C. et al.: 1980. *ibid*, 106:492-496.
- [3] Thuring, R. W. J. et al.: 1975. *ibid*, 66:213-220.
- [4] Wieslander, L.: 1979. *ibid*, 98:305-309.
- [5] Yang, Robert C. -A. et al.: 1979. *In:Methods in Enzymology* (Wu, R. ed.), Academic Press, New York, Vol. 68, p.176-182.

体细胞和分子遗传学

复旦大学遗传学研究所薛京伦教授和邱信芳副教授共同编著的新书[体细胞和分子遗传学]已由陕西科技出版社于1989年3月出版。本书特点以体细胞遗传学为主体,通过细胞生物学、分子生物学、生物化学和基因工程等技术分析遗传学的研究结果。既包括基础理论,又有实验技术和方法,同时也介绍了该领域的最新研究进展,具有较高的可读性和参考价值。

本书各章目录如下:(1)体细胞遗传学的起源及其基本方法,(2)遗传的染色体和分子基础,(3)哺乳动物体细胞的突变分析,(4)离体细胞变异型...I。抗药性突变型,(5)离体细胞变异型...II。营养缺陷变异型,(6)细胞杂交和杂种细胞研究,(7)基因转移和基因治疗,(8)人类基因图,(9)体细胞遗传学的 DNA 水平分析,(10)单克隆抗体,(11)培养细胞的分化,(12)恶性的体细胞遗传分析,(13)培养细胞中基因表达的调节,(14)培养细胞中突变的诱发,(15)体细胞培养在遗传病和产前诊断中的应用,(16)衰老过程的细胞基础,(17)体细胞和分子遗传学实验技术,(18)展望。全书共58万字,图文并茂,条理清楚,可供遗传学、分子生物学、细胞生物学、医学、农业、畜牧业等方面的科研人员和大专院校的教师以及其他有关人员参阅,也可作综合性大学和医学院校的教材和参考书。

本书定价每册9.50元(含邮费),欲购者请直接汇款给作者。

通讯地址:上海复旦大学遗传学研究所邮政编码 200433