

# 用琼脂糖凝胶制备电泳——冻融法纯化质粒 DNA<sup>1,2)</sup>

杨志兴 王革伏 曲宝兰 刘伟民 李文贤 陈虹 张云湖 杨学成

(黑龙江省科学院应用微生物研究所, 哈尔滨)

随着基因工程研究的不断发展, DNA 作为一种实验材料要求纯化方法更加简便, 质量更高。目前关于质粒 DNA 的纯化方法已有许多报道<sup>[1-3]</sup>。国外多采用氯化铯密度梯度离心法, 国内则限于条件, 很少应用此法。我们建立了琼脂糖制备电泳——冻融法, 以纯化质粒 DNA 及 DNA 的酶切片段。方法简便易行, 而且效果良好。

## 材料和方法

### (一) 材料

1. 菌种 *E. coli* 71-18 (南开大学蒋如璋赠)。

2. 质粒 pUC4K (氨基苄青霉素抗性质粒, 用 Ap<sup>r</sup> 表示, 下同); pUC7 (Ap<sup>r</sup>, Lac<sup>+</sup>); pVT15 (Ap<sup>r</sup>, 带有免疫球蛋白重链可变区基因 V<sub>H</sub>); pAYCY184 · J<sub>K</sub> · SupE · V<sub>K</sub> (氯霉素抗性质粒, 用 Cm<sup>r</sup> 表示。此质粒带有免疫球蛋白轻链 J<sub>K</sub> 和 V<sub>K</sub> 基因, 由日本京都大学 T. Honjo 教授赠)。

3. 试剂 琼脂糖, Serva 生产, 进口分装。限制性核酸内切酶 BamHI (5U/μl), EcoRI (2U/μl), 均由中国科学院生物物理所生化试剂厂生产; 溶菌酶由上海市禽类蛋品公司禽蛋二厂生产; 电泳缓冲液为醋酸缓冲体系 (0.04M Tris-acetate, 0.002M EDTA); ST 缓冲液, 25% 蔗糖, 0.1M NaCl, 0.05M Tris-OH (pH7.5); TE 缓冲液, 10mM Tris-OH, 1mMEDTA, pH8.0; LB 培养基, 1% 蛋白胨, 1% 牛肉膏, 0.5% NaCl, 培养菌体时, 加入适量抗菌素, 加入 Ap 时, 浓度为 25μg/ml, 加入 Cm 时, 浓度为 10μg/ml; 其它试

剂均为分析纯。

### (二) 方法

1. 菌体制备 前培养液以 1% 接种量接于 500ml LB 培养基中, 37°C 振荡培养 4 小时, 使其 OD<sub>600</sub> ≈ 0.6, 加入氯霉素 (含有氯霉素抗性质粒的菌株除外), 使其终浓度为 170μg/ml。振荡培养 12—16 小时。4000rpm 离心 20 分钟收集菌体后用 ST 缓冲液洗涤。最后菌体悬浮于 1/10 原体积的 ST 缓冲液中。

2. 质粒 DNA 粗提取液的制备 将上述菌悬液加入溶菌酶, 使其终浓度为 0.5mg/ml, 37°C 水浴保温 15 分钟, 取出后, 依次加入 5M NaCl、0.5MEDTA (pH8.5)、20% SDS, 使其终浓度分别为 1.2M、30mM、1%。每加入一种溶液后轻轻混匀。将此裂解液放 4°C 过夜。次日 20,000rpm 离心 1 小时, 即获得含有质粒 DNA 的上清液。此上清液用等体积的氯仿-异戊醇 (24:1) 反复抽提至两相界面无乳白色膜。取水相加入 1/10 体积 3M NaAc (pH5.2) 和二倍体积冷无水乙醇, -20°C 过夜。第二天 15,000 rpm 离心 30 分钟, 沉淀物溶于适当体积的 TE 缓冲液中, 即得质粒粗制品。

3. 质粒 DNA 的制备电泳分离与冻融法纯化 琼脂糖凝胶制备电泳采用水平式电泳槽 (120mm × 140mm × 3mm), 三个加样槽 (每槽为 35mm × 3mm × 3mm), 共可加样 1.5ml。琼

Yang Zhixing et al.: Purifying Plasmids DNA by Agrose Gel Preparative Electrophoresis-Frozen and Thawed Method

1) 本项目为中国科学院基金资助课题。

2) 本所齐云祥同志协助高速冷冻离心, 特此致谢。

脂糖浓度为 0.7%。在电压为 40 伏, 电流强度为 10 毫安条件下电泳 16 小时。电泳完毕纵向切下宽 5mm 凝胶带, 放入 EB(溴化乙锭)中染色。在紫外灯(波长 260 Å)下观察, 确定质粒 DNA 的位置, 再将该凝胶带放回原位置, 横向切下与此质粒 DNA 位置相应的全部凝胶带, 装入小管, 放入液氮速冻 30 秒后室温融化, 6,000rpm 离心 20 分钟, 收集上清液, 照文献[4]方法将该上清液用水饱和酚抽提两次, 酚-氯仿(1:1)、氯仿各抽提一次, 加二倍冷无水乙醇 -20°C 过夜保存。第二天 20,000rpm 离心 30 分钟, 弃去上清液, 沉淀经真空干燥后溶于 100—200 μl TE 缓冲液中, 即得到了纯化的质粒 DNA, 如图 1 所示。图 1 中表示的是纯化前后的情况。并且显示了纯化后的样品经限制性核酸内切酶作用情况。其中 pUC4K 含有两个 *Bam*HI 切点, pUC7 含有一个 *Bam*HI 切点。

## 结果与讨论

1. 回收率, 我们分别纯化了 pUC4K、pUC7、pVT15 和 pAYCY184·*J<sub>K</sub>*·*SupE*·*V<sub>K</sub>* 等 4 种质粒(图 1 中显示其中 3 种)。由图 1 可比较出纯化前后的情况。我们从 166.87 μg 的质粒 DNA 粗提取物中获得了纯化质粒 110.41 μg, 几次测定证明回收率在 60—70%。

2. 用此法制备的质粒 DNA, 纯度高, 适用于 DNA 重组载体。我们用纯化过的 pUC7 做载体, 亚克隆 pVT 15 中的免疫球蛋白重链基因, 获得成功。

3. 此纯化后的质粒可用限制性核酸内切酶作用, 结果良好(见图 1 所示)。同时我们用 pVT 15 质粒做探针, 也获得了很好的标记结果。

4. 本法省去了 RNase 和蛋白酶处理, 同时减少了酚等试剂的用量, 操作方便, 且污染少。

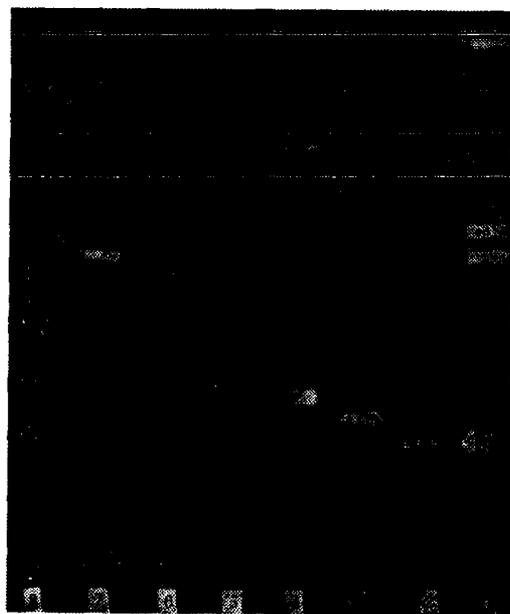


图 1 质粒 DNA 纯化结果

电泳条件: 醋酸缓冲体系, 1.0% 琼脂糖凝胶板, 50V, 14 小时, EB 染色。

1. pUC4K 质粒粗提取物; 2. pUC4K 质粒经冻融法纯化的样品; 3. 上述纯化样品经 *Bam* HI 酶切; 4. pUC7 质粒粗提取物; 5. pUC7 质粒纯化物; 6. pUC7 质粒纯化后用 *Bam* HI 酶切; 7. pVT15 质粒粗提取物; 8. pVT15 质粒纯化物。

5. 此法在不同实验室可普遍采用。国内氯化铯昂贵, 同时难以获得<sup>[4]</sup>; 而用酸酚法提取收率低, 而且有时还会使质粒 DNA 丢失<sup>[4,5]</sup>; 用颗粒琼脂糖或 Sephacryl S-1000 柱分离, 都需解决进口分离介质<sup>[2]</sup>。这对某些实验室也是困难的。

## 参 考 文 献

- [1] 杨建清, 曲宝兰: 1980. 遗传, 2(6): 37—38.
- [2] 王年, 何永山, 蔡良苑: 1984. 生物化学与生物物理进展, 4: 64—67.
- [3] Kahn, M. et al.: 1979. *Methods in Enzymology*, Academic Press, 68: 268.
- [4] Maniatis, T. et al.: 1982. *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory.
- [5] Michael Zasloff et al.: 1978. *Nucleic Acid Research*. 5(4): 1139.