

用普通琼脂糖代替低熔点胶回收 DNA 片段

顾其华¹, 李玲芝¹, 舒畅², 杨志毅¹, 叶爱慧¹

(1. 湖南省怀化市第一人民医院遗传研究室, 怀化 418000; 2. 湖南医科大学附属湘雅医院, 长沙 410078)

摘要:为了建立一种直接从普通琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段的简便实用的方法, 采用聚合酶链式反应扩增人 P53 基因外显子 7、8 和其间的内含子 7 序列, 用普通琼脂糖凝胶电泳, 直接从凝胶中切下产物带, 用加热融化法回收 DNA, 紫外比色法测定回收率, 用测序法鉴定回收产物质量。并用 QIAquick Spin 纯化柱对照。结果表明, 本法回收的产物质量明显优于用 QIAquick Spin 柱回收, 本法回收的产物用于测序效果极佳, 回收率达 80%, 用 QIAquick Spin 柱回收率不到 20%, 差异非常显著 ($P < 0.01$)。证明这种方法回收 PCR 产物质量可靠, 能代替低熔点胶回收 DNA, 有较大的实用价值。

关键词:聚合酶链式反应; 热融化; 苯酚-氯仿; DNA 分离

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2000)02-0103-03

Replacing Low Melting-Temperature Agarose by General Agarose to Recollect DNA Fragment

GU Qi-hua¹, LI Ling-zhi¹, SHU Chang², YANG Zhi-yi, YE Ai-hui¹

(1. Laboratory of Molecular Genetics of The First People's Hospital Huaihua, Huaihua, 418000; 2. Xiangya Affiliated Hospital of Hunan Medical University, Changsha 410078, China)

Abstract: In order to find a simple and efficient method to isolate single or double-strand DNA fragment amplified by polymerase chain reaction (PCR), we used PCR method to amplify exon 7, exon 8 and intron 7 of human P53 gene, electrophoresis to identify products, fusion and phenol-chloroform extraction (FPC) to isolate specific DNA from agarose gel, ultraviolet colorimetry to determine collected rate, and direct sequencing to identify the quality of recollected DNA. A control test was also made by using QIAquick Spin Column. The results showed that the quality of PCR products recollected by using FPC method was very good. When the recollected DNA was used in sequencing, no matter what was single or double-strand DNA, the sequence data was clear and even, with low noise. The recollected rate of using FPC, which was over 80 per cent, was higher than that of using column (less than 20 per cent), there were statistical significances ($P < 0.01$). In the control test, it had a little non-specific DNA in the collected products, and the sequencing experiment of using double-strand products was failure. All above mentioned suggested that general agarose gels efficient in place of low melting-temperature for isolating DNA fragment.

Key words: polymerase chain reaction; agarose; DNA isolation; fusion phenol-chloroform

在 DNA 直接测序等多种实验中, 需要鉴定通过聚合酶链式反应(PCR)扩增的产物质量, 以及纯化、回收特异性产物。琼脂糖凝胶电泳是鉴定 DNA 质量常用的方法, 对凝胶电泳分离的 DNA 片段进行回收有多种方法, 常用的有 DEAE-纤维素膜电泳法、透析袋电洗脱法^[1]、低熔点琼脂糖胶中回收等^[2]。这些

方法所用材料昂贵, 亦较复杂。为了寻求一种简便实用的回收方法, 作者采用国产普通琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 双、单链产物, 紫外光下切下产物条带, 加热使凝胶融化, 再用苯酚-氯仿抽提回收, 回收的 DNA 质量可靠。

收稿日期: 1999-04-20; 修回日期: 1999-06-07

基金项目: 本课题受湖南省卫生厅基金(9888)、湖南省科委社会发展计划基金(98-ssy-2098)资助

作者简介: 顾其华, 男, 33岁, 湖南医科大学 89 届毕业, 主治医师, 遗传研究室副主任, 专业方向: 分子生物学。

1 材料和方法

1.1 材料

2400 型 PCR 仪、310 型 DNA 测序仪由美国 PE 公司产,紫外仪由上海天能科技有限公司产,电泳仪由北京六一仪器厂产;台式高速离心机由湖南仪表厂产。QIAquick Spin 纯化柱由德国进口。测序试剂盒、序列胶、模板抑制剂、分析缓冲液等由美国 PE 公司产;Taq DNA 聚合酶、扩增缓冲液由加拿大 Sangon 公司产;电泳级普通琼脂糖由中科院上海药物研究所产,引物由上海生物工程公司合成,其他试剂采用国产分析纯试剂配制而成。

1.2 方法

引物序列为:引物 1:5'TGTGTCTCTCTAGGTTG-GCTCTGACTG3',引物 2:5'GTCCTGCTTGCTTAC-CTCGCTTACTG3'。引物 1 位于外显子 7 上游,引物 2 位于外显子 8 下游。抽肘静脉血、抗凝、溶血,收集白细胞核,蛋白酶 K 消化,用苯酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA。扩增方法与作者以往采用的方法相同^[3]。扩增产物采用普通琼脂糖凝胶电泳,紫外光鉴定扩增效果,在紫外光下切下产物条带,置入离心管中,加入 5 倍体积的 TE 缓冲液,加热至 95℃ 2 分钟使凝胶溶化,然后再用苯酚-氯仿抽提法收集 DNA 片段。单链产物的回收系先以双链产物为模板用不对称 PCR 方法制备单链 DNA 片段,再用前法进行电泳回收。对回收所得的 DNA 片段进行紫外比色测定 DNA 量,然后对已定量的 DNA 片段进行琼脂糖凝胶电泳、切下 DNA 带等依前法再回收,再次紫外比色测定回收量(双链产物回收后先经 50℃ 复性,再测 OD 值),计算回收率。QIAquick Spin 柱对照回收则按试剂盒要求进行。对两种方法回收所得的单、双链 DNA 进行测序,鉴定回收的 DNA 质量。

2 结果

用热融化-苯酚-氯仿抽提法回收的双、单链产物再用琼脂糖凝胶电泳检测显示条带清楚,特异性好,反应物中的引物和非特异性产物均已去除干

净。用这种方法回收得到双链、单链产物作为模板直接测序结果均佳,图谱清晰,本底极低,见图 1、图 2。所测定的 P53 基因外显子 7、8 及其间的内含子 7 序列片段长共 585 个 bp,与国外测定的标准序列比较,在内含子 7 上第 73 个 bp 处有一个 C/T 多态位点,第 93 个 bp 处有一个 T/G 多态位点,尚未见报道,其余碱基均与国外报道相同。用单链产物和双链产物作为模板测定序列完全相同。但双链测序更简便。序列为:

```

ggctctgact  gtaccacat  ccaactaac  tacatgtga  acagttcctg  catgggcggc
atgaaccgga  ggcccacatc  caccatcacc  acactggaag  actccaggtc  aggagccaat
tgccaccctg  cacactggcc  tgcctgccc  cagcctctgc  ttgcccctga  cccctggccc
cacccttac  cgattttc  catacacta  cccatccacc  tctcaccaca  ttccggcggg
gaatctcct  actgtccca  ctcaattcc  tttctctgg  cttggggacc  tcttaacctg
tggcttccc  tcccactcc  tggagctgga  gcttaggctc  cagaaggacc  aagggtggtt
gggagtagal  ggagcctggt  ttttaaatg  ggacaggtag  gacctgattt  ccttactgcc
tcttcttet  ctctctcat  cctgaagtgt  ggtaactaac  tgggacggaa  cagcttgag
gtcctgttt  gtccctgct  tgggagagac  cggcgcacag  aggaagagaa  tctccgcaag
aaaggggagc  ctaccacga  gtgcccacca  gggagcacta  agcga

```

用 QIAquick Spin 纯化柱回收的单链产物作为模板测序图谱亦较好,但纯化柱回收的双链作为模板测序则本底过高、测序基本失败。取已定量的纯单、双链的 DNA 片段,用这两种方法进行回收,单、双链产物回收各重复 30 次实验,经紫外比色测量显示:热融化-苯酚-氯仿抽提法回收的回收率明显高于纯化柱法($P < 0.01$)结果详见表 1。

3 讨论

在一些分子生物学实验中,常需要通过琼脂糖凝胶电泳鉴定 DNA 质量,对凝胶中的 DNA 片段进行回收利用,是实验中要解决的难点问题,回收的方法有透析袋电洗脱法、DEAE-纤维素膜电泳回收法等方法^[1],这些方法所需材料较昂贵、方法较复杂,且这些方法本身具有一定的缺陷,以至于少于 500ng 的条带根本不值得去回收^[4]。国外有利用低熔点胶直接回收^[2],但低熔点胶需进口、且较昂贵,国内不常用。近年来,国内利用德国进口的 QIAquick Spin 柱回收 PCR 产物,简便、快速,可用于一般实验。这种

表 1 两种方法回收 DNA 片段回收量(OD 值)的比较

回收方法	双链产物			χ^2	P	单链产物			χ^2	P
	回收前	回收后	回收率%			回收前	回收后	回收率%		
热融化法	0.0251 ± 0.0032	0.0210 ± 0.0047	83.67	26.55	< 0.01	0.0249 ± 0.0035	0.0203 ± 0.0043	81.53	25.80	< 0.01
纯化柱法	0.0250 ± 0.0028	0.0043 ± 0.0015	17.20			0.0250 ± 0.0033	0.0040 ± 0.0013	16.00		

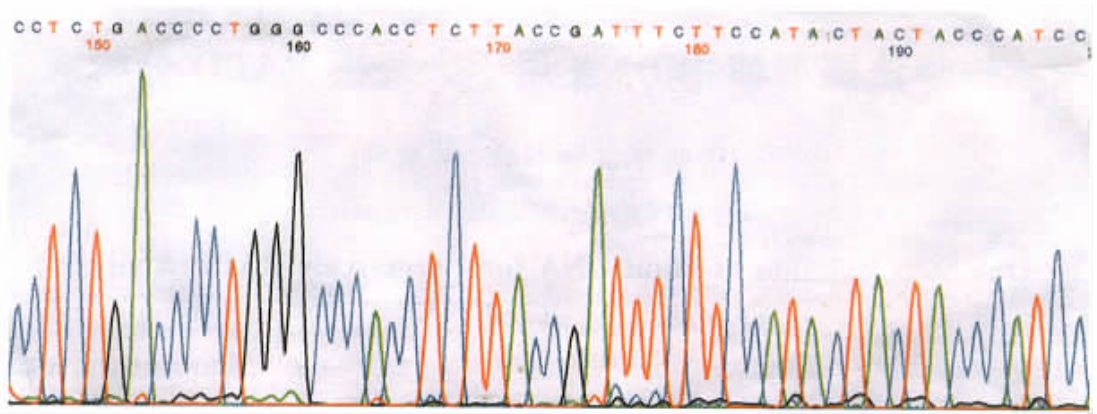


图 1 人 *P53* 基因序列图,单链模板用热熔化-苯酚-氯仿抽提法回收

Fig 1 A sequence data of human *P53* oncogene. The single-strand template was isolated from agarose gel by using FPC method

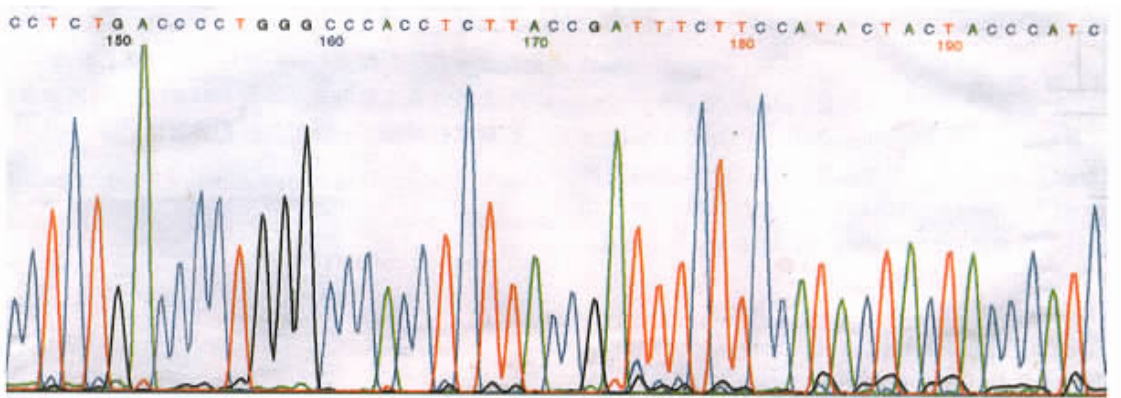


图 2 人 *P53* 基因序列图,双链模板用热熔化-苯酚-氯仿抽提法回收

Fig 2 A sequence data of human *P53* oncogene. The double-strand template was isolated from agarose gel by using FPC method

纯化方法是利用不同长度的 DNA 片段在不同的酒精-盐溶液的溶解度不同,通过离心过滤收集 100~1000bp 的 DNA 片段,这种方法的缺点有:不能完全去除非特异性产物,不能同时回收几个不同长度的 DNA 片段,且回收量较低,在一般的 DNA 直接测序中,常因模板量和质的问题导致失败,用这种方法回收的双链产物则因模板质量问题不能直接用于测序。

作者考虑采用普通琼脂糖凝胶电泳,在紫外光下切下 DNA 带,加热使凝胶融化,使 DNA 从凝胶中释放出来,再用苯酚-氯仿抽提法收集 DNA 片段是可行的。因为加热 95℃ 不会破坏 DNA 的一级结构,变性的 DNA 可以复性,苯酚-氯仿抽提法可以去除琼脂糖及溴化乙锭等。且因不同长度的 DNA 片段在电泳胶中迁移速率的不同,可以同时回收几个不同长度的 DNA 片段。作者用这种方法回收 PCR 双链、单链产物,结果显示:用这种方法可以较好的去除反

应物中残余引物及非特异性产物,效果优于用纯化柱回收,用这种方法回收得到的双链、单链产物测序结果均佳,说明回收的 DNA 质量可靠,且回收率明显高于用纯化柱回收 ($P < 0.01$)。说明这种方法回收的 PCR 产物用于 DNA 测序等实验效果可靠。热熔化法回收 DNA 的实验的关键是要掌握好加入苯酚的时机,另外须注意切下的琼脂糖尽可能少。

参考文献:

- [1] Dretzen GM, Bellard P, Sassone Corsi, *et al.* A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels [J]. *Anal Biochem*, 1981, 112: 295 ~ 298.
- [2] Parker RC, Seed B. Two dimensional agarose gel electrophoresis "Sea Plaque" agarose dimension [J]. *Meth Enzy*, 1980, 65: 358 ~ 362.
- [3] 顾其华,李玲芝,张贻秋,等. 中国人 *K-ras* 原癌基因外显子 1 序列分析 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 1998, 15(2): 98 ~ 100.
- [4] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯(金冬雁,黎孟枫译). *分子克隆(M)*. (第 2 版) 北京: 科学出版社, 1995, 318 ~ 325.