

一种改良质粒 DNA 提取方法在实验课中的应用

陈春艳, 张有福, 刘素云

(河南科技大学 农学院, 河南 洛阳 471003)

摘要:改良碱裂解质粒 DNA 提取方法, 将溶液 I、II、III 无水乙醇的反应时间分别缩短为 0、0、10、0 min; 用针式过滤器除去残余蛋白质, 替代了传统的酚/氯仿抽提方式, 缩短 DNA 提取时间, 使其在 1 h 内完成, 并减少有毒物质对人体造成的伤害。获得的质粒 DNA 质量好, 产率高, 能满足常规分子生物学实验的要求。

关键词:质粒 DNA; 提取方法; 改良

中图分类号:Q 783.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)04-0147-03

质粒是独立于染色体外的小型环状双链 DNA 分子, 具有分子量小和复制速度快的优点, 是分子生物学研究领域不可或缺的载体工具。质粒 DNA 的提取已成为分子生物学实验中的一种常规方法, 其中碱裂解法操作简便、重复性好, 纯度高被广泛应用^[1]。但在实验教学中, 该方法提取时间长, 通常需要 2 h 以上, 2 节课难以完成。其次, 酚、氯仿的抽提使用, 易残留于含有质粒 DNA 的上清液中, 导致后续酶切不能顺利进行, 质粒 DNA 还会受到过多地机械性剪切, 且酚、氯仿有很大毒性和挥发性气味, 会对人体造成一定的危害。试验在经典碱裂解法的基础上进行改良, 来缩短反应时间, 研究酚、氯仿的替代物, 建立一种简便、快速且纯度较高的 DNA 提取方法, 以期缩短上课等待、闲置的时间并节约试验经费, 又可减轻有毒物质对人体的直接伤害及对环境的污染。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 质粒及培养基 质粒为 pBI121, 接种于 LB+Kan (50 μg/mL) 液体培养基中, 37℃ 培养过夜以供提取质粒。

1.1.2 试剂 溶液 I: 50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris · Cl (pH 8.0), 10 mmol/L EDTA (pH 8.0); 溶液 II (用时现配): 0.2 mol/L NaOH, 1% SDS; 溶液 III: 5 mol/L 乙酸钾 60 mL, 冰乙酸 11.5 mL, 水 28.5 mL; RNase A: 10 mg/mL, TE 配制, 煮沸 15~30 min, -20℃ 分装贮存; 酚/氯仿 (1:1), 无水乙醇, 70% 乙醇。以上化学试剂均

为国产分析纯。

1.1.3 针式过滤器 直径 25 mm 可反复使用针式过滤器及 0.22 μm 滤膜购自鼎国生物公司, 5 mL 注射器为普通医用注射器。

1.2 方法

1.2.1 经典碱裂解法 参见分子克隆实验指南(第 3 版)^[4]。

1.2.2 改良方法 取 1.5 mL 菌液, 4℃, 12 000 rpm 条件下离心 1 min, 弃去上清液, 再转移菌液并离心 1 min, 尽可能将上清液倒尽; 加入 100 μL Solution I, 振荡涡旋将细胞沉淀物彻底重悬; 加入 200 μL Solution II, 轻轻颠倒离心管 3~4 次至溶液呈透明粘稠状; 加入 150 μL Solution III (冰浴), 颠倒数次至白色絮状沉淀呈均匀分散状, 冰上放置 10 min, 离心 5 min; 用注射器吸取上清, 尽量减少吸入蛋白质层, 上清经 0.22 μm 针式过滤器(图 1) 过滤至离心管中; 加入 1 mL 无水乙醇沉淀质粒 DNA, 颠倒离心管数次, 离心 5 min; 弃去上清, 用 1 mL 70% 乙醇洗涤沉淀; 用 20 μL 含 RNase A 的 TE 溶解 DNA。



图 1 质粒 DNA 提取中使用的针式过滤器

1.2.3 质粒 DNA 的定量及杂质检测 分别测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值, 若 OD₂₆₀/OD₂₈₀ > 2.0, 表明 DNA 中含有 RNA 杂质。若 OD₂₆₀/OD₂₈₀ < 1.6, 表明样品中含有酚或蛋白质。质粒 DNA 浓度计算公式: dsDNA = 50 × (OD₂₆₀) × 稀释倍数。

1.2.4 质粒 DNA 的电泳检测 采用琼脂糖凝胶电泳

第一作者简介: 陈春艳(1977-), 女, 硕士, 助理实验师, 现从事分子生物学应用研究与实验室管理工作。E-mail: ccy0713@126.com。
基金项目: 河南科技大学实验技术开发基金资助项目(SY0708016); 博士科研启动经费资助项目(09001275)。

收稿日期: 2009-11-20

法。制备 1% 琼脂糖凝胶, 取 5 μ L 样品进行琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 质粒 DNA 的定量及杂质检测

为了缩短 DNA 提取时间, 将经典碱裂解法中各种反应条件对 DNA 产率与纯度的影响进行了比较分析。

2.1.1 溶液 I 处理时间对产率与纯度的影响 按照经典碱裂解法提取质粒 DNA, 改变溶液 I 与菌液的反应时间, 试验结果见表 1。溶液 I 的处理时间对 DNA 纯度无影响, 对产率有一定影响, 随着处理时间的延长, 产率呈递增趋势, 最低与最高产率之间相差 35 μ g/mL, 差别较小。为了缩短提取时间, 溶液 I 处理时间定为 0 min。

表 1 溶液 I 处理时间对产率与纯度的影响

| 溶液 I 处理时间/min | DNA 浓度/ μ g \cdot mL $^{-1}$ | OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ |
|---------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 960 | 1.761 |
| 5 | 975 | 1.775 |
| 10 | 995 | 1.777 |

注: 溶液 I 加入后振荡重悬使细胞沉淀完全悬浮时, 计为 0 min; 然后在室温下分别静置 5.10 min。

2.1.2 溶液 II 处理时间对产率与纯度的影响 溶液 I 处理时间定为 0 min, 改变溶液 II 处理时间, 其余方法同 2.1.1, 结果见表 2。由表 2 可知, 溶液 II 的处理时间对 DNA 纯度影响较小, 但随着处理时间的延长, 产率却呈递减趋势, 处理时间为 0 min 时, 产率最高, 故溶液 II 处理时间定为 0 min。

表 2 溶液 II 处理时间对产率与纯度的影响

| 溶液 II 处理时间/min | DNA 浓度/ μ g \cdot mL $^{-1}$ | OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ |
|----------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 1 190 | 1.874 |
| 5 | 1 085 | 1.855 |
| 10 | 1 015 | 1.813 |

注: 溶液 II 加入后轻轻颠倒 4 次, 计为 0 min; 然后在室温下分别静置 5.10 min。

2.1.3 溶液 II 处理时间对产率与纯度的影响 溶液 I 处理时间定为 0 min, 溶液 II 处理时间定为 0 min, 改变溶液 II 处理时间, 其余方法同 2.1.1, 试验结果见表 3。溶液 II 的处理时间对 DNA 纯度与产率均有一定影响, 随着处理时间的延长, 纯度与产率均呈递增趋势, 处理时间为 10 min 时, 纯度与产率最高, 故溶液 II 处理时间定为 10 min。

表 3 溶液 II 处理时间对产率与纯度的影响

| 溶液 II 处理时间/min | DNA 浓度/ μ g \cdot mL $^{-1}$ | OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ |
|----------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 1 330 | 1.705 |
| 5 | 1 435 | 1.840 |
| 10 | 1 475 | 1.855 |

注: 溶液 II 加入后颠倒数次至白色絮状沉淀呈均匀分散状, 计为 0 min; 然后在冰上分别放置 5.10 min。

2.1.4 酚/氯仿与针式滤器处理对产率与纯度的影响 由酚/氯仿抽提蛋白质所得 DNA, 与针式滤器处理所得 DNA 纯度差异为 0.015, 产率差异为 55 μ g/mL, 酚/氯仿处理所得 DNA 纯度与产率较针式滤器处理高一些, 为了减少质粒的丢失, 避免酚/氯仿对人体的伤

害。故采用针式滤器除去残余蛋白质。

表 4 酚/氯仿与针式滤器处理对产率与纯度的影响

| 抽提蛋白方式 | DNA 浓度/ μ g \cdot mL $^{-1}$ | OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ |
|--------|------------------------------------|--------------------------------------|
| 酚/氯仿 | 1 090 | 1.863 |
| 针式滤器 | 1 035 | 1.848 |

2.1.5 无水乙醇处理时间对产率与纯度的影响 由表 5 可知, 无水乙醇处理时间对纯度无影响, 对产率有影响。随着处理时间的延长, 产率呈递增趋势。处理 10 min 时, 产率最高。最低与最高产率之间相差 60 μ g/mL, 考虑到实验课对时间的限制, 故无水乙醇处理时间定为 0 min。

表 5 无水乙醇处理时间对产率与纯度的影响

| 无水乙醇处理时间/min | DNA 浓度/ μ g \cdot mL $^{-1}$ | OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ |
|--------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 795 | 1.747 |
| 5 | 810 | 1.761 |
| 10 | 855 | 1.763 |

注: 无水乙醇加入后颠倒 2 s 计为 0 min; 然后在室温下分别静置 5.10 min。

2.2 质粒 DNA 的电泳检测

将改良方法与经典方法所得质粒 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 2。以经典碱裂解法提取的质粒 DNA 作对照, 改良方法所提 DNA 质量较好, 主要以超螺旋形式存在。

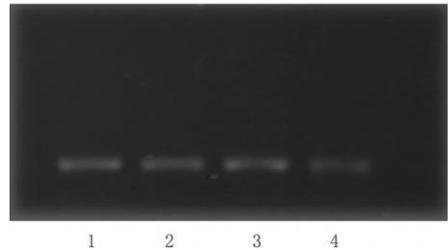


图 2 1% 琼脂糖凝胶电泳检测质粒 DNA 样品

注: 1: 经典方法提取的质粒 DNA; 2~4: 改良方法提取的质粒 DNA。

3 结论与讨论

经典提取方法, 加入溶液 I、II 后, 通常需要室温或冰上放置几分钟; 改良方法采取连续加入溶液 I、II 和 III 由于溶液 I 和溶液 II 可迅速破坏生物膜、裂解细菌、释放核酸和蛋白, 因而缩短了静置时间^[9]。改良后的方法与经典方法对 DNA 纯度影响无差异, 只是所得产率比经典方法略低些。

加入溶液 II 和 III 后, 质粒 DNA 已从细胞中游离出来, 此时混匀动作一定要轻柔, 这样既保证细菌沉淀在试剂中的充分混合又避免了机械性剪切已变性的质粒 DNA 和染色体基因组 DNA。在每一步转移上清液时, 不能贪多, 中间层不能取, 否则会使提取的质粒 DNA 中蛋白含量增加, 影响后续试验结果^[2, 9]。

酚/氯仿抽提虽然能除去残余蛋白质, 但易残留于

含有质粒 DNA 的上清液中, 导致后续步骤不能顺利酶切, 且会损失大量质粒 DNA, 直接影响产率。另一方面, 酚/氯仿具有很大毒性和挥发性气味, 给实验操作人员带来一定健康隐患。而采用针式滤器处理蛋白, 不需要再进行酚-氯仿抽提, 可以将吸入的少量蛋白质去除, 达到进一步纯化目的, 且大大减少了质粒的丢失, 减少了对人体的伤害²⁹。

试验通过改良碱裂解质粒 DNA 提取的反应条件, 建立了一种适合实验课快速制备质粒 DNA 的提取方法。改良方法缩短了 DNA 提取时间, 使实验控制在 1 h 内完成, 大大提高了试验效率, 适合基础课教学人数多的情况下采用, 且 DNA 纯度与经典方法所提相当, 可

以满足基本的分子生物学实验需要。

参考文献

- [1] 张学民, 王金生. 碱裂解法提取质粒 DNA 方法的改进[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2000(4): 75-78.
- [2] 杨献光, 齐志广, 赵宝存, 等. 碱裂解法提取质粒 DNA 的研究[J]. 生物技术通报, 2003(6): 24-26.
- [3] 赵素然, 祁忠占, 白艳玲, 等. 质粒 DNA 快速提取法在基础课实验中的应用[J]. 实验技术与管理, 2005, 22(9): 21-23.
- [4] Sambrook. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 金冬雁等译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [5] 郭晓丽. 小量提取质粒 DNA 的简易方法[J]. 衡水学院学报, 2007, 9(1): 16-17.
- [6] 张林琳, 李磊, 李翔, 等. 一种改良式质粒 DNA 提取方法的建立与应用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2007, 28(1): 106-108.

A Modified Method for Isolation of Plasmid DNA in Experimental Class

CHEN Chun-yan, ZHANG You-fu, LIU Si-yun

(College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003)

Abstract: Modifications were made on the preparation of plasmid DNA by alkaline lysis, the reaction time of solution I, solution II, solution III and Alcohol was 0 min, 0 min, 10 min, 0 min respectively; residual protein was wiped off by the filter, which instead of phenol and chloroform extraction. Thus the time of isolation of plasmid DNA was shortened within 1 hour, and reducing the injury of poisonous substance on the human body. The experiments demonstrated that the improved method generated good quality plasmid DNA with high yield, and it could meet the standards for many common molecular biology experiments.

Key words: plasmid DNA; extract method; modification

蔬菜病虫害把握关键期

蔬菜病害预防基本上都是抓住 2 个关键时期进行并且遵循“无病防病、有病治病”的原则, 其效果较为理想。

1 苗期 这是蔬菜病害最易发生的时期, 主要有真菌引起的立枯病、猝倒病和灰霉病, 还有低温和土壤湿度过大引起的沤根病。具体操作如下:
①种子要进行消毒处理, 保证种子不带病菌。②苗床要用无病新土, 并用药剂处理, 防止苗床带菌。③控制苗

床浇水, 防止苗床因湿度过大引发病害。④夏季育苗应注意苗床遮荫和降温。⑤加强苗床管理, 培育壮苗, 提高抗病能力。⑥发现病苗及时拔除, 立即用药防治。

2 开花结果期 此时病害极易大流行, 对产量影响很大, 是蔬菜病害防治最关键的时期。发病的主要原因是蔬菜由营养生长转入生殖生长, 造成叶子养分及抗性物质下降, 抗病性降低, 给各种病菌的感染创造了有利条

件。防治方法: ①培育健壮植株, 提高植株抗病性。②加强田间管理, 及时追肥及叶面施肥, 提高植株营养, 及时摘除病老叶, 加强田间通风透光。

无病防病、有病治病。在没有发病时, 可喷代森锰锌等保护剂进行预防, 如发现病害应立即喷施治疗剂进行控制。一般来说, 对于疫病、霜霉病等常发性病害, 在开花结果期应 7~10 d 喷 1 次药, 连喷 3~4 次即可控制。