

一种改良的纯化质粒 DNA 方法^{*}

吴斌华^{1,2}, 李祥勇¹, 周克元¹ (广东医学院: 1. 生物化学和分子生物学研究所; 2. 检验学院, 湛江 524023)

【摘要】 目的 介绍一种改良的纯化细菌质粒 DNA 的方法。**方法** 针对传统的 PEG 纯化方法, 取消 PEG8000 的纯化步骤, 增加溶菌酶的浓度及酚-氯仿处理次数。**结果** 新的纯化方法提取的质粒量比传统方法要多, 而且纯度足以用于细胞研究。**结论** 尽管目前已有质粒纯化试剂盒出售, 但经改良的传统质粒纯化法仍然具有经济、实用的价值。

【关键词】 质粒; 纯化; PEG
DIO:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.17.007
中图分类号: R342 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2010)17-1806-02

An improved method of purification of plasmid DNA^{*} WU Bin-hua^{1,2}, LI Xiang-yong¹, ZHOU Ke-yuan¹. 1. *Institute of Medical Biochemistry and Molecular Biology*; 2. *Institute of Laboratory Medicine, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China*

【Abstract】 Objective To introduce an improved method of purification of bacterial plasmid DNA. **Methods** Based on the traditional method of PEG purification, the PEG8000 purification step was cancelled. However, the concentration of lysozyme and phenol-chloroform processing were increased. **Results** The content of extracting plasmid using the new purification method was more than the traditional method, and the purity was sufficient for cell research. **Conclusion** Although there are plasmid purification kits for sale, the improved method of purification of plasmid DNA also has a economic and practical value.

【Key words】 plasmid; purification; PEG

在分子生物学中, 质粒(plasmid)是非常实用的工具。它是细菌内存在于细胞染色体之外的具有自行复制子的双链闭环的 DNA 分子, 是基因工程和基因治疗的主要载体, 因此质粒的抽提和纯化是非常重要的^[1]。其纯化方法有多种, 如层析法及阴离子交换色谱法等, 但仍以传统的聚乙二醇(PEG)纯化方法较为常用^[2-3]。作者发现该种传统方法提取的质粒量较低。为此, 作者参照相关操作方法, 加以改良。现介绍如下。

1 材料与方法

1.1 试剂 质粒载体 pmu6 及菌株 DH5a 由本室冻存; 1 kb 和 10 kb Marker、Bbs I 内切酶、PEG8000 和 RNase A 购自上海生工生物工程技术有限公司; 蛋白胨和酵母提取物为 Oxoid 公司产品; 琼脂糖购自 Sigma 公司。

1.2 质粒提取纯化 试剂的配制和使用参照文献^[4]。PEG 纯化法操作依据文献^[5]。另以改良纯化法纯化质粒, 具体操作步骤为: 取碱裂法提取的质粒 1.5 mL, 加 1.5 mL 冰预冷的 5 mol/L 氯化锂, 充分混匀, 12 000 g 4 ℃ 离心 10 min, 将上清液移入另一离心管。加等量异丙醇充分混匀, 12 000 g 室温离心 10 min, 弃上清液, 于室温用 70% 乙醇(V/V)洗涤沉淀及管壁。用 250 μL 含无 DNA 酶的 Rnase A(50 μg/mL)的 TE 溶解沉淀, 37 ℃ 消化 30 min 以上。加入 100 μL 平衡酚, 4 ℃, 12 000 g 离心 5 min。加入 100 μL 氯仿, 4 ℃, 12 000 g 离心 5 min。将上层水相转入另一 1.5 mL 离心管中。重复 2 次。加 100 μL 10 mol/L 乙酸铵混匀, 加 2 倍体积无水乙醇, 置于-20 ℃ 20 min 以上; 4 ℃, 12 000 g 离心 5 min。吸去上清液, 加

200 μL 预冷的 70%(V/V)的乙醇洗涤沉淀, 4 ℃, 12 000 g 离心 5 min。弃上清液真空干燥, 加 100 μL 消毒三蒸水溶解质粒 DNA 沉淀。以内切酶 BpiI 按操作说明书进行酶切, 并作 1% 琼脂糖电泳鉴定质粒酶切情况, 显示剂为 goldenview。紫外定量测定 260 nm 和 280 nm 吸光度。

2 结 果

2.1 质粒酶切结果 pmU6 的长度为 4.9 kb, Bbs I 的酶切片段长度为 313 bp。其中第 1、2、3、4 泳道分别为改良的纯化法得到的质粒 DNA、传统 PEG 纯化法所得到的质粒 DNA、改良的纯化法所得质粒 DNA 的内切酶 Bpi I 酶切效果、传统 PEG 纯化法所得质粒 DNA 的 Bbs I 酶切效果。琼脂糖电泳结果显示用新方法所得的质粒 DNA 的条带亮度高, 和用传统的碱裂解法获得的质粒 DNA 无明显差别。

2.2 质粒纯化结果 采用 752 型紫外分光分析计测定质粒 DNA 溶液的 A260、A280、A260/A280 及浓度见表 1。两种方法的 A260/A280 值均在 1.8 以上, 统计分析表明它们之间差异无统计学意义($P>0.05$), 改良纯化法提取质粒的量要远高于 PEG 纯化法($P<0.05$)。

表 1 质粒 pmU6 DNA 纯度及浓度的测定

纯化方法	A260	A280	A260/A280	Nuc Acid (μg/mL)
PEG 纯化法	0.097±0.051	0.053±0.038	1.83	4.85±2.55
改良纯化法	0.211±0.093	0.113±0.073	1.87	10.55±4.65*

注: 与 PEG 纯化法比较, * $P<0.05$ 。

* 基金项目: 湛江市科技攻关计划项目(2009C3104001); 广东医学院科研基金项目(XK0802)。

注: M: Marker; 1: pmU6(PEG 法); 2: pmU6(改良提纯法); 3: 酶切质粒(PEG 法); 4: 酶切质粒(改良提纯法)。

图 1 质粒 pmU6 及其 Bbs I 酶切结果电泳图

3 讨 论

质粒 DNA 纯化的传统方法是 PEG 纯化法。通过该方法纯化的质粒 DNA 的纯度很高, 可直接应用于细胞研究中。但该方法仍存在操作步骤繁琐, 所得质粒产量偏低等问题。

质粒 DNA 的纯化过程中比较大的干扰因素是 RNA。为此, 作者增大了 RNA 酶和浓度, 并延长作用时间, 这些改良均可显著降低 RNA 杂质含量。

PEG8000 原来是 PEG 纯化法中的一个步骤, 它的作用是沉淀大的质粒 DNA。但作者经过实验比较发现, 一般质粒经过 PEG8000 纯化步骤后大部分会损耗掉。而且经此前的氯化锂溶液和 RNA 酶处理后质粒纯度已相当高。与未经该步骤操作的纯化结果比较, 两者间的纯度并没无太大差别。作者的实验结果也确认这点, 两种方法的 A260/A280 差异无统计学意义($P>0.05$)。

PEG 纯化法中的苯酚/氯仿抽提的主要功能是去除蛋白^[6]。作者使用平衡酚抽提时平衡酚层往往会消失, 这是因为水饱和酚的比重仅略比水重, 离心后酚相可能会在高盐条件下跑到上层, 不利于含质粒的水相的回收; 此外, 酚与水有很大的互溶性, 用酚抽提后会有大量的酚溶解到水相中。因此作者直接加入氯仿抽提。另以氯仿多次抽提, 主要是进一步纯化质粒,

以便于直接应用于细胞研究中。

判定 DNA 纯度的方法可依据 A260/A280 大小判定, A260/A280 在 1.8 左右时表明质粒 DNA 纯度较好; 如大于 1.9, 表明有 RNA 污染; 如小于 1.6, 表明有蛋白质、酚等污染^[7]。作者的结果显示, 经改良方法纯化的质粒, A260/A280 测定值稍大于 1.8, 提示其纯度较好, 在随后的转染细胞实验中也未见影响细胞的生长。

作者的实验结果显示, 改良的纯化方法提取的质粒量比传统方法多($P<0.05$), 而且纯度足以用于细胞研究。尽管目前已有质粒纯化试剂盒出售, 但经改良的传统质粒纯化法仍然具有经济、实用的价值^[8-9]。它具有成本较低, 配制试剂时间不受限制, 剂量掌握比较方便等优势。

参考文献

- [1] 谢海涛, 陈文贵, 柳永和. 一种制备质粒 DNA 的改良碱裂解法[J]. 中国医学工程, 2006, 14(2): 199-201.
- [2] 王贻杰, 刘勇, 程海, 等. 提高内毒素去除效果的质粒 DNA 层析纯化工艺的优化[J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(1): 81-84.
- [3] 皮文辉, 孙从建, 宋志强, 等. 质粒 DNA 的阴离子交换色谱法纯化及内毒素去除[J]. 色谱, 2007, 125(6): 809-813.
- [4] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南(上)[M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 48-50.
- [5] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993: 114.
- [6] 滕云. 两种质粒 DNA 纯化方法的比较[J]. 牡丹江师范学院学报(自然科学版), 2009, 66(1): 28-29.
- [7] 温建新, 李俊, 周顺, 等. 大肠杆菌质粒 DNA 提取方法的优选[J]. 西南农业学报, 2007, 20(4): 825-828.
- [8] 孙晓东, 韩立敏, 王转, 等. 质粒 DNA 提取方法的比较[J]. 陕西教育学院学报, 2009, 25(2): 86-88.
- [9] 王海燕, 王启会, 李玉清, 等. 重组质粒 pRSET DNA 纯化方法的比较[J]. 襄樊学院学报, 2008, 29(8): 24-26.

(收稿日期: 2010-03-05)

(上接第 1805 页)

染组的血浆葡聚糖水平明显高于对照组, 提示其对侵袭性真菌感染的诊断有一定的可行性。加之其标本采取方法较严格的传统培养或病理标本采取方法更为方便, 在临床中有很大的开发和研究价值。

参考文献

- [1] 李世荣, 王红, 文艳. 血浆(1,3)- β -D-葡聚糖与抗深部白色念珠菌感染药物疗效关系的实验研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2007, 6(6): 20-22.
- [2] Prentice HG, Kibbler CC, Prentice AG. Towards a targeted, risk, based, antifungal strategy in neutropenic patients[J]. Br J Haematol, 2000, 110(2): 273-284.
- [3] Yoshida K. Recent advances of serodiagnosis for systemic fungal infections [J]. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi, 2006, 47(3): 35-42.

- [4] Groll A, Shah P, Mentzel C, et al. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital[J]. J Infect, 1996, 33(1): 23.
- [5] Tamura H, Arimoto Y, Tanaka S, et al. Automated kinetic assay for endotoxin and beta-D-glucan in human blood [J]. Clin Chim Acta, 1994, 226(1): 109-112.
- [6] Edman JC, Kovacs JA, Masur H, et al. Ribosomal RNA sequence shows Pneumocystis carinii to be a member of the fungi[J]. Nature, 1988, 334(6182): 519-522.
- [7] Obayashi T, Yoshida M, Mori T, et al. Plasma-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes[J]. Lancet, 1995, 345(8941): 17-20.

(收稿日期: 2010-07-27)