

质粒 DNA 小量提取法的改进*

姚伟^{1**} 周会² 徐景升² 余爱丽² 张木清² 陈如凯^{2**}

(¹三峡大学生物技术研究中心 湖北宜昌 443002)

(²福建农林大学农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点开放实验室 福州 350002)

摘要 介绍了一种改进的小量提取质粒 DNA 的方法,该方法用 NH_4Ac 和 LiCl 代替常规方法中苯酚和氯仿的抽提,有效去除了样品中 RNA 和蛋白质;用 95% 乙醇代替无水乙醇沉淀质粒 DNA,降低了终产物中盐和多糖等杂质的含量,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,如 PCR、酶切、转化大肠杆菌以及植物遗传转化。图 4 表 1 参 7

关键词 质粒 DNA; 碱裂解法; 提取方法

CLC Q781

AN IMPROVED METHOD FOR MINIPREP OF PLASMID DNA*

YAO Wei^{1**}, ZHOU Hui², XU Jingsheng², YU Aili², ZHANG Muqing² & CHEN Rukai^{2**}

(¹Biotechnology Research Center, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China)

(²Key Lab of Eco-physiology & Genetic Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract An improved protocol for isolation of plasmid DNA from *E. coli* was described. The improved method used NH_4Ac and LiCl instead of phenol and chloroform extraction, and used 95% alcohol instead of absolute alcohol, which could wipe off large amounts of RNA, protein, salt, amylase and other undesired materials. 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, such as PCR, restriction enzyme digestion, *E. coli* transformation and plant genetic transformation. Fig 4, Tab 1, Ref 7

Keywords plasmid extraction; alkaline lyses; method for extraction

CLC Q781

质粒是基因工程研究中的一种常用载体,质粒 DNA 提取是分子克隆操作中一项最基本的技术^[1]。本实验室承担的国家“863”计划项目和国家自然科学基金项目中有大量的工作涉及到质粒 DNA 的提取,按照常规方法提取质粒 DNA 所需时间长,产量小,纯度低,经常出现酶切不动^[2],转化植物效率低。目前,市场上也有很多可以直接利用的质粒 DNA 提取试剂盒,虽然使用比较方便,但价格昂贵,不适合大量使用。本研究在前人研究的基础上^[1~4],对质粒 DNA 的提取方法作了进一步的改进,该改进方法操作简单,不需要低温离心,重复性好,提取的质粒 DNA 产率高,质量好,能满足常规分子生物学实验的要求,如 PCR、酶切、连接、转化大肠杆菌等,也可以用于植物遗传转化^[5]。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试菌株为本实验室保存,重组质粒 DNA 编号为 pNUS-CP 和 pBCRP,由张木清研究员提供。宿主菌为 *E. coli* DH5 α ,接种于 LB 液体培养基中(含 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kam),37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。

收稿日期: 2004-10-18 接受日期: 2005-02-02

* 国家“863”计划项目(2002AA241031)和国家自然科学基金(No. 30170590)资助 Supported by the State “863” Project and the National Natural Science Foundation of China

** 通讯作者 Corresponding author (E-mail: yaoweimail@163.com)

1.2 试剂和溶液

溶液 I: 50 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L EDTA, 25 mmol/L Tris - Cl, pH 8.0; 溶液 II (现用现配): 0.2 mol/L NaOH, 1.0% SDS; 溶液 III: 5 mol/L KAc 60 mL, 冰醋酸 11.5 mL, 水 28.5 mL; 溶液 IV: 6 mol/L NH_4Ac (pH 8.0); 溶液 V: 6 mol/L LiCl ; 95% 乙醇; TE 缓冲液(10 mmol/L Tris - HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0); 70% 乙醇; 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ RNA 酶。以上所需试剂药品除 SDS、 LiCl 、RNA 酶购自上海生物工程有限公司外,其它均为国产普通生化试剂。

1.3 质粒 DNA 提取方法

(1) 将 1.5 mL 菌液以 13 000 g 离心 30 s (所有离心均在室温下进行), 尽去上清; (2) 加入 100 μL 溶液 I, 振荡使菌体充分分散, 室温放置 2 min; (3) 加入 200 μL 新配制的溶液 II, 轻轻将离心管颠倒数次, 混匀内容物, 室温放置 2 min; (4) 加 150 μL 冰预冷的溶液 III, 轻轻将离心管颠倒数次, 直至白色沉淀充分形成, 冰浴 3 min 后, 以 13 000 g 离心 3 min; (5) 小心转移上清, 并加入两倍体积 95% 乙醇, 室温放置 5 min 后, 以 13 000 g 离心 4 min, 尽弃上清; (6) 用 200 μL TE 或无菌双蒸水溶解沉淀物后, 加入 150 μL 溶液 IV 和 150 μL 溶液 V, 充分混合均匀后冰浴 3 min, 然后以 13 000 g 离心 3 min; (7) 小心转移上清, 并加入 2 倍体积 95% 乙醇, 室温放置 3 min 后以 13 000 g 离心 5 min; (8) 弃尽上清, 沉淀用 70% 无水乙醇洗涤

两次后,倒尽乙醇,用真空浓缩仪抽干 3 min 或自然凉干;(9)用 15 μL TE 溶解 DNA 沉淀,同时入 2 μL Rnase (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用.

1.4 质粒 DNA 含量及质量分析

1.4.1 分光光度法 采用 Pharmacia Biotech 公司的 Ultrospec 2100 分光光度计,以灭菌无离子水为对照,测定质粒 DNA 样品的吸光值 $A_{230\text{ nm}}$ 、 $A_{260\text{ nm}}$ 和 $A_{280\text{ nm}}$ 和 DNA 浓度. 从 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 、 $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 比值分析质粒 DNA 质量.

1.4.2 琼脂糖电泳 取 1 μL 质粒 DNA,以 Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III 为 Marker,在 0.8% 琼脂糖凝胶上以 5 V cm^{-1} 的电压电泳 20 min. 然后在法国 VL 公司的 BIO - PROFIL 凝胶成像系统上紫外照相,根据条带亮度粗略判定 DNA 的浓度,同时判别 RNA 和蛋白质是否除尽.

1.4.3 质粒 DNA 酶切鉴定 为验证质粒 DNA 正确性,对质粒 DNA 进行限制性内切酶分析,其反应体系为:10 $\times$ 缓冲液 2 μL ,乙酰化 BSA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 0.2 μL ,3 μL 质粒 DNA,*EcoR* I (*Pst* I 或 *Bgl* II,10 U/ μL) 0.5 μL ,ddH₂O 将体积调整为 20 μL . 混合均匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 4 h. 然后取 10 μL 酶切产物电

泳,紫外成像.

1.4.4 质粒 DNA 遗传转化甘蔗愈伤组织 按照优化的轰击参数,利用 BIORAD 公司的 PDS - 1000 型基因枪将质粒 DNA 导入到甘蔗愈伤组织. 目前已经获得一批抗性转基因甘蔗植株,经 PCR 和 Southern 杂交检测,部分抗性植株为阳性.

2 结果与分析

用该改进方法提取的质粒 DNA 质量及含量结果见表 1. 在 DNA 提取过程中,主要的污染物质为 RNA、蛋白质和盐等, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 和 $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 比值可以反映出所提取的质粒 DNA 样品的纯度,样品中如果含有蛋白质等其他成分,使得 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 和 $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 比值下降. 从表 1 的分析结果来看,该方法提取的质粒 DNA $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 比值介于 1.7 ~ 1.9 之间, $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 比值介于 1.9 ~ 2.2 之间,表明 DNA 的纯度和产量都比较高. DNA 电泳分析结果也表明,该方法提取的 DNA 超螺旋结构完整, RNA、盐类等污染物质少,而常规方法提取的质粒 DNA 则常有较多的开环或者超螺旋结构破坏 (图 1).

表 1 不同方法所制备的质粒 DNA 质量及含量
Table 1 Quality and quantity of plasmid DNA extracted by different methods

方法 Method	$A_{230\text{ nm}}$	$A_{260\text{ nm}}$	$A_{280\text{ nm}}$	$A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$	$A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$	浓度 $\rho(\text{DNA})/\mu\text{g mL}^{-1}$	产量 $\rho(\text{DNA})/\mu\text{g mL}^{-1}$
改进法 Improved	0.094	0.182	0.102	1.94	1.78	0.87	8.7
改进法 Improved	0.074	0.165	0.090	2.21	1.83	0.79	7.9
常规法 Common	0.057	0.103	0.061	1.81	1.68	0.46	4.6

经限制性酶切后产生了清晰的酶切片段 (图 2),表明质粒 DNA 已被完全酶切,样品较纯净. 在常规的质粒 DNA 提取方法中用苯酚和氯仿抽提,经常会发生质粒 DNA 酶切不动的情况,并且还会造成 DNA 的损失,该改进方法提取的 DNA,纯度和产量都比较高,易于酶切,且酶切过夜质粒 DNA 也不会降解.

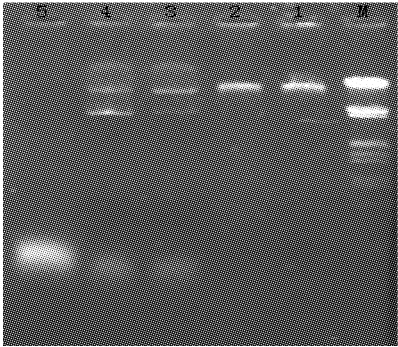


图 1 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测质粒 DNA 样品
Fig. 1 0.8% agarose electrophoresis of DNA samples

M: Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III; 1, 2: 改进方法提取的质粒 DNA; 3, 4: 常规方法提取的质粒 DNA; 5: LiCl 和 NH_4Ac 处理后的沉淀物 1, 2: Plasmid DNA extracted by improved method; 3, 4: Plasmid DNA extracted by common method; 5: Precipitate after treated with LiCl and NH_4Ac

该方法提取的质粒 DNA 可以用于植物的遗传转化研究,通过基因枪将其导入到甘蔗愈伤组织中,图 3 和图 4 是抗性转化甘蔗幼苗进行 PCR 和 Southern 杂交的结果. 表明改进方法提取的质粒 DNA 达到遗传转化的要求,可以用于植物遗传转化研究.

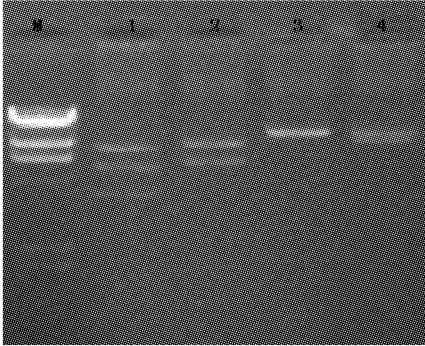


图 2 质粒 DNA 酶切结果
Fig. 2 Result of DNA digested with restriction enzyme
M: Lambda DNA/*Hind* III; 1: 质粒 DNA/ *Pst* I; 2: 质粒 DNA/ *Bgl* II; 3: 质粒 DNA/ *EcoR* I; 4: 质粒 DNA (pBCRP) 1: Plasmid DNA digested with *Pst* I; 2: Plasmid DNA digested with *Bgl* II; 3: Plasmid DNA digested with *EcoR* I; 4: Plasmid DNA (pBCRP)

3 讨论

该改进的小量质粒 DNA 提取方法实际上是一种碱裂解法. 溶液 I 主要是破坏细菌膜,加入后一定要充分混匀,使细菌沉淀完全分散,才能得到更高产率的质粒 DNA;溶液 II 主要是使蛋白质和少量质粒发生变性,加入后混匀动作要轻柔,以免机械剪切质粒 DNA^[6]. 许多方法都强调加溶液 II 时应放在冰上^[7],但因为溶液 II 中的 SDS 主要作用是溶菌,冰浴使得 SDS 变成结晶状,失去溶菌功能. 试验结果表明,加入溶液 II 后,置于室温 (20 ~ 30 $^{\circ}\text{C}$),可以同时使菌体裂解和 DNA 变性,超螺

旋 DNA 不会受到破坏;溶液Ⅲ是使质粒 DNA 复性并与染色体 DNA 分离,加入后置冰上 3 min 可以提高质粒 DNA 的质量和产量。

本改进方法采用 NH_4Ac 和 LiCl 同步沉淀蛋白质和 RNA,显示出良好的效果,由于未用酚和氯仿抽提,超螺旋结构破坏降低;用 95% 乙醇 2 次沉淀质粒 DNA,大大降低质粒 DNA 中盐和糖等污染物的含量,不影响质粒 DNA 的产量。从 1 mL 细

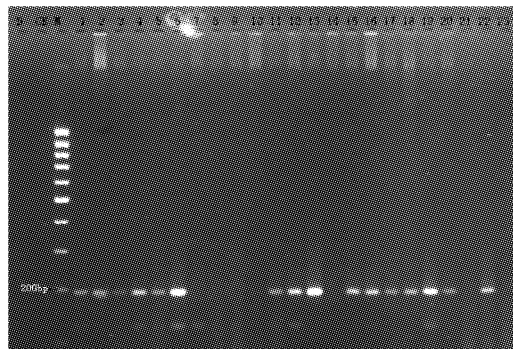


图3 *nptII* 基因的 PCR 产物(部分图片)

Fig. 3 PCR products of *nptII*

M: Generuler™ 100 bp DNA Lander; B: 空白对照; CK: 阴性对照; 1: 阳性对照(质粒 DNA); 2~23: 转化甘蔗植株 B: Blank control; CK: Negative control; 1: Positive control (plasmid DNA); 2~23: Transforms

References

- 1 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. 16~23
- 2 Chen YK (陈贻镨), Zheng L (郑铃), Zhan LQ (詹丽钦). Lithium chloride used for plasmid DNA isolation and purification. *J Fujian Med Univ* (福建医科大学学报), 2001, **35** (3): 297~299
- 3 Itoh M, Carminci P, Nagaoka S. Simple and rapid preparation of plasmid template by a filtration method using microtiter filters plates. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (6): 1315~1317
- 4 Ng WL, Schummer M, Cirisano FD. High-throughput plasmid mini preparations facilitated by micro-mixing. *Nucleic Acid Res*, 1996, **24** (24): 5045~5047

菌培养物可以提取到 7.5 μg 以上的质粒 DNA,足够多次实验的需要,可代替繁耗时的大量提取。我们采用该方法提取的质粒 DNA 产率和质量都很理想,可直接用于酶切、连接、PCR、转化大肠杆菌、农杆菌和遗传转化甘蔗^[5]等实验,其结果和重复性都令人满意。该方法不需使用特殊试剂,很大程度上节约了实验经费,不仅适用于从大肠杆菌,也适用于从农杆菌中提取质粒 DNA。

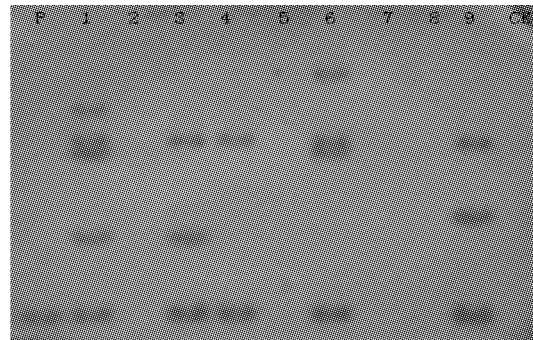


图4 转基因甘蔗 Southern 杂交检测

Fig. 4 Southern blotting detection of transgenic sugarcane

P: 质粒酶切片段; CK: 未转基因甘蔗; 1~9: 转基因甘蔗(其中 2、5、7、8 没有杂交信号) P: Fragment of plasmid; CK: Untransformed sugarcane; 1~9: Transformed sugarcane (2, 5, 7, 8 with no hybridization signal)

- 5 Yao W (姚伟), Yu AL (余爱丽), Xu JS (徐景升), Zhang MQ (张木清), Chen RK (陈如凯). Analysis and identification for transgenic sugarcane of *ScMV-CP* gene. *Mol Plant Breeding* (分子植物育种), 2004, **1** (2): 13~18
- 6 Lv ZB (吕正兵), Zhang F (张方), Xia Y (夏颖), Zhu GP (朱国萍). An improved alkaline lysis adaptive to extracting plasmid DNA of *Bacillus*. *J Anhui Norm Univ* (安徽师范大学学报), 2002, **25** (1): 54~55
- 7 Ma XY (马先勇), Yao KT (姚开泰). Novel highly efficient and rapid method for small scale preparation of plasmid DNA. *China J Modern Med* (中国现代医学杂志), 1996, **6** (6): 8~10