

分离纯化质粒 DNA 方法的比较

齐 义 鹏

(武汉大学病毒学系)

质粒的研究在遗传工程上占有重要地位。其分离纯化是一项费工费时和得率甚微的工作。一般常用的方法有制备性电泳,平衡等密度超离心和速度区带超离心等,这些方法各有特点,作者对它们进行了比较。

质粒 DNA 从苏芸金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 变种 *israelensis* 4Q₂-22 和变种 X₉-6C₂ 以及 *E. coli* DEC 138^[1] 中提取,取液氮保存的菌种接种于含有 10ml Luria 肉汤 (LB)* 的试管中,37℃,摇床培养过夜。取 1ml 接种于含 500 ml LB 的 2000ml 带支管三角瓶中。同法培养约 6—7 小时,直到细菌生长到 OD₆₀₀ = 0.5 时,将培养液离心 (8 Krpm 4℃ 10 分) 收获细胞。加 TES (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 100mM NaCl, pH 8.0)——20% 细胞量,蔗糖溶液 20ml 和溶菌酶 200mg (*B. thuringiensis*) 或 *E. coli* 20 mg. 37℃,振荡反应 30—60 分后,缓慢地加 8% SDS (以 TES 溶解) 20ml,轻轻搅拌,再加 5M NaCl 10ml,在 65℃ 保温 5 分,贮存在 4℃ 过夜。

在预冷的转头中,加入上述过夜的混合物,离心 (25,000g, 5℃) 30 分钟,除去沉淀的蛋白质和染色体 DNA,吸取上清,加等体积的缓冲酚 (用等量 0.1M pH 7.2 的 Tris-HCl 溶液饱和酚直到酚的 pH 到 6.0),在冰上缓慢振荡 15 分,离心 (13000rpm, 4℃) 10 分钟。酚、水分离,中间层为蛋白质,小心取出水层,重复抽提,直到无间层蛋白质。再加等体积的氯仿-异戊醇 (24:1V/V),在冰浴上振荡 15 分,同法离心,重复一次。取出上层水相,加两体积 95% 冰乙醇,冰冻过夜,沉淀 DNA。离心 (15K rpm, 5℃) 20 分钟所得白色沉淀,冷冻真空干燥 15 分,溶于 1ml 的 1XTE 缓冲液中 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0),对 1XTE 缓冲液透析过夜。

加 RNA 酶到上述 DNA 溶液中,终浓度 100μg/ml。37℃,酶解 30 分,以除去 RNA。得到的 DNA 粗制品 (图 1 见封二) 可按下述任一种方法纯化。

一 制备性电泳纯化法

在一个装有宽齿电泳梳匣子中 (12 × 14 cm),加 0.7% 琼脂糖 100ml,中间的宽槽加样品 600μl (含 100μl 40% 的蔗糖),两边的窄槽加样品 40μl (含 20μl 蓝胶-蔗糖和溴酚蓝的混合液)。在 1XTEA 缓冲液中 (40mM Tris-醋酸盐, 2mM EDTA, pH 8.0) 电泳 6—8 小时 (50 mA),切下两边的窄槽凝胶带,用 E, B 染色 20 分,脱色 30 分。然后,与中间的宽幅未染色凝胶重合,在长波紫外灯下观察,标记所需要的带 (图 2 见封二)。

在确定带的位置后,横切未染色凝胶,装入透析袋中,加 1XTE 缓冲液 2ml。220V 电泳洗脱 30 分。然后反转电极,继续通电 30 秒,解离吸附在袋上的 DNA 分子。收集此洗脱液,离心,除去可能残存的琼脂糖颗粒。再用等体积的酚、氯仿、乙醚分别抽提 1—2 次。对 1XTE 缓冲液透析过夜 (4℃ 搅拌)。最后用两体积的 95% 冷乙醇沉淀,离心后,加 50μl 1XTE 缓冲液溶解,即得纯化的质粒 DNA (图 3 见封二)。

二 氯化钠速度区带超离心法

吸取 5% NaCl (轻液) 和 20% NaCl (重液) 各 13.5ml,分别装入梯度混合器的两个侧管中,小心的泵入两个塑料离心管。从管顶到管底的 NaCl 浓度为 5%—20% 的连续梯度。在管顶加

* LB: 蛋白胨 1%,酵母膏 0.5%, NaCl 0.5%,培养苏芸金杆菌时,加蔗糖 0.5M。

表 1 三种纯化质粒 DNA 的方法比较

	电 泳	NaCl 速度区带离心	CsCl 等密度超离心
$A_{260}:A_{280}$	1.9	1.9	2.2
得率 μg^*	75.0	261	2750
繁 易	繁 琐	一 般	简 易
特殊设备	电 泳 仪	超离心机、分部收集器	超离心机、折射仪
纯 度	单一质粒	单一质粒	质粒混合物
全程(小时)	50	50	60

* 从 2000ml 菌液得到的最终收率

样 300—500 μl , 在 38K rpm, (30 $^{\circ}\text{C}$, 用 Ti-75 型转头) 超速离心 3.5 小时。取出离心管, 固定在一个特殊架子上, 两端密闭, 在管底钻孔, 用蠕动泵压入蓝胶。梯度液从管顶压出, 分部收集, 每管 10 滴。

取每一分部组分的样品 5 μl 加蓝胶 2 μl , 在 0.7% 的小型琼脂糖凝胶上点样。以 1XTEA 为电泳缓冲液, 50V, 电泳约 1 小时, EB 染色, 紫外灯下观察。

染色体 DNA 和质粒 DNA 在 NaCl 梯度中能很好地分开。组分 4—9 为质粒 DNA, 组分 10—17 为染色体 DNA。前者分子量小, 处于梯度的上部; 而电泳时处于凝胶的下部。染色体 DNA 正好相反(图 4)。

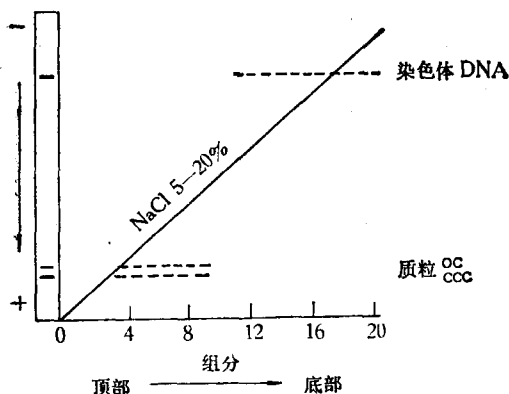


图 4 质粒 DNA 和染色体 DNA 在电泳和 NaCl 梯度中的位置

纵轴为电泳凝胶, 指示出了电泳方向; 横轴为梯度的组分, 指示出了各组分在管中的部位。

合并组分 4—9, 透析脱盐, 乙醇沉淀, 以 1XTE 缓冲液溶解, 得到含单一质粒的 DNA。(图 5 见封二)。

三 氯化铯平衡等密度超离心法

按特殊程序制备离心管 (Polylomer), 在一支试管中加入样品 2ml, 1XTES 缓冲液 6ml 和 CsCl 9.0 克。以薄膜 (Parafilm) 覆盖管口, 反复倒转, 直到 CsCl 溶解。以铝箔包裹试管, 加 E. B (10mg/ml) 100 μl , 测折射率为 1.3935—1.3945。将此样品加入已装配好的离心管中, 从管顶加入矿物油, 逐出气泡。精确平衡, 以螺丝钉密闭, 放入 Ti-75 型转头。在 40K rpm, 21 $^{\circ}\text{C}$ 离心 40 小时。

取出离心管, 在紫外灯下观察, 可见两条很清晰的 DNA 带。上带为染色体 DNA, 下带为质粒 DNA^[3,4] (图 6 见封二)。

讨 论

用 CsCl 梯度离心法纯化, 由于染色体 DNA 结合较多的 EB, 密度降低, 而质粒 DNA 呈共价, 闭合环状 DNA, 结合 EB 较少, 密度大于染色体 DNA, 因此可使两种 DNA 清楚地分开^[2]。但此法却不能将大小不同的质粒分开。因此, 有时梯度中的一条质粒带, 在电泳时, 却被分离成为几条带。从图 6 看出, 苏芸金杆菌变种 X₁-bC₂ 含有三个质粒^[1], 而在 CsCl 梯度离心中仅仅得到一条质粒带。

电泳, NaCl 梯度和 CsCl 梯度纯化质粒 DNA 的结果比较在表 1 中。

CsCl 梯度纯化法简便易行, 得率高, 能得到不含染色体 DNA 和蛋白质的高纯度质粒, 但却是几种质粒的混合物。因此只能纯化只含一个质粒的生物材料, 或用于制备克隆的“客体”

DNA。

制备性电泳纯化法设备简单,能得到单个质粒,但操作繁琐,特别是在用有机溶剂反复抽提时,每次都不可避免的要损失少许样品,得率很低,是其最大的弱点。

NaCl速度区带超离心法兼有上述二法的优点。其纯度、得率均较高,操作简便、试剂价廉。所以,在具有超速离心机的实验室,可选用此法。

本工作是在美国俄亥俄州立大学微生物系 Dr. Dean 的指导下作的。谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] Jose, M. Gonzalez et al., *Plasmid* **5**, 351, 1981.
- [2] Thomas, M. Roberts et al.; *Gene*, **12**, 123, 1980.
- [3] Thomas, C. Curries et al.; *Analytical Biochemistry*, **76**, 431, 1976.
- [4] Phyllis, A. Martin. et al., *J. Bacteriology*, **145** (2), 980, 1981.

[本文于1983年12月5日收到]

醇醚水混溶剂制备脂质体方法

初连瑞 孔祥英 谢绵光

(军事医学科学院微生物流行病学研究所)

脂质体有明显的免疫佐剂作用,同时还对其它佐剂起载体作用^[1]。有关它的制备,目前多采用 A. D. Bangham 等^[2] 1965 年建立的多层脂质体制备方法(又称经典法),以及在此基础上经超声波处理制成单层脂质体的方法^[3]。这两种方法对脂质体的研究尤其是生物膜理论和药物载体的研究起了重要作用。70 年代出现了其它改进技术,但对大批量制备仍有不足之处。我们在前人工作的启发下,设计并建立了醇醚水混溶制备脂质体的方法(醇醚水法)。同时,对某些影响脂质体载荷率的因素、脂质体的免疫佐剂作用等进行了研究。现将结果介绍如下。

材 料 和 方 法

试剂 卵磷脂,自制。胆固醇为北京化工厂产。硬脂胺,瑞典产。牛血清白蛋白(BSA)。卵白蛋白(OVA),均为电泳纯。

动物 小白鼠:上海种,重18—20克/个,雌性。家兔:日本大耳白种,重3.5—4市斤/个。

脂质体的制备

乙醇和乙醚以1.5:1(V/V)混溶后,溶解三

种膜脂:卵磷脂,胆固醇和硬脂胺(微克分子比为7:2:1)。按水相和脂相10:1(V/V)将脂溶液加入水溶液中。经连续振荡(搅拌或吹吸)1分钟左右,室温放置1—2小时,再移至4—6℃冰箱2小时,即成多层脂质体。在放置冰箱前,经超声波处理1.5分钟制成更小的脂质体。对比所用经典法参照 Bangham 法^[2]进行。

载荷量测定 为测定脂质体对水相大分子的载荷量,在水溶液中掺入碘¹²⁵标记的微量同种大分子。测量前脂质体经17000rpm 4℃离心1小时,共洗三次。按以下公式计算载荷率:载荷率(%)

$$= \frac{\text{洗后脂质体脉冲数} - \text{本底}}{\text{洗前脂质体悬液总脉冲数} - \text{本底}} \times 100\%$$

动物免疫与抗体水平评价 各家兔背部皮下注射0.5mg BSA 制剂一次,从耳缘静脉采血。小鼠皮下注入0.3ml BSA 制剂,⁹12天后从眼窝静脉丛取血。用间接血凝技术测定每只动物血清抗体滴度。抗体效价为最高稀释倍数的倒数。组抗体水平以几何平均值表示。

脂质体形态观察 磷钨酸阴性染色,经电镜拍照,放大后,以纵横直径的平均数求其直

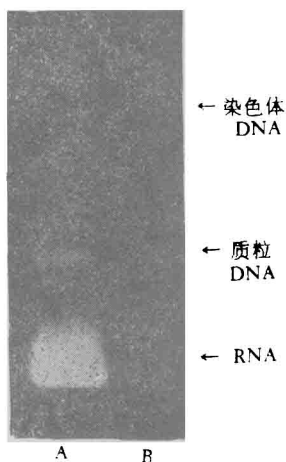


图1 质粒 DNA 粗制剂的琼脂糖凝胶电泳
A: 未用 RNA 酶消化; B: 用 RNA 酶消化

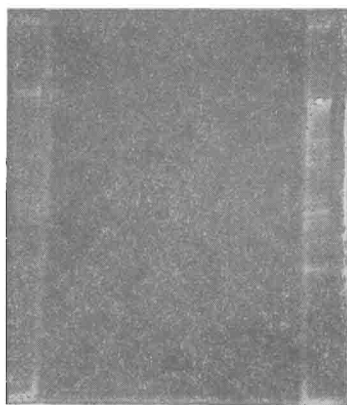


图2 制备性电泳纯化质粒 DNA 的电泳图谱
两侧的凝胶条用 EB 染色中间的宽幅凝胶未经染色

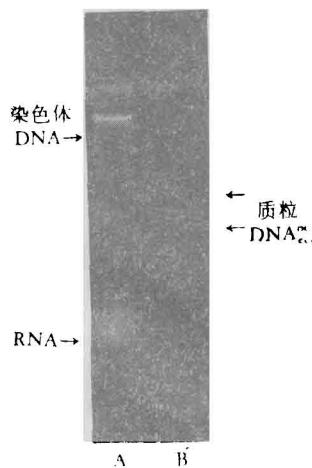


图3 用制备性电泳电泳洗脱和有机溶剂抽提得到的纯化质粒 DNA
A: 纯化前的粗制剂; B: 只含一个质粒的 DNA 纯化样品

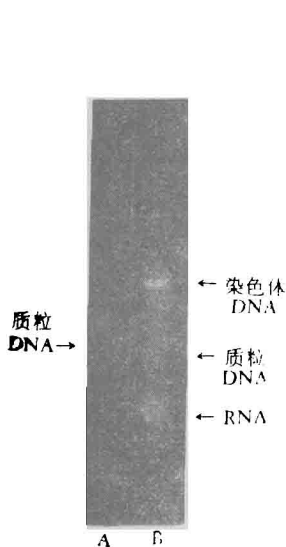


图5 用 NaCl 速度区带超离心法得到的纯化质粒 DNA
A: 纯化的质粒 DNA
B: 未纯化样品

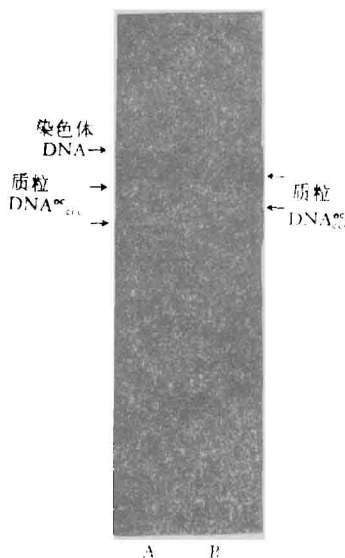


图6 用 CsCl 等密度超离心纯化得到的质粒 DNA
A: 从 *Bacillus thuringiensis* Var is-
vaeusis 4Q2-22 分离;
B: 从 *E. coli* DEC138 分离

马延高等“介绍一种回收 DNA 片段和浓缩核酸稀溶液的方法”一文的图

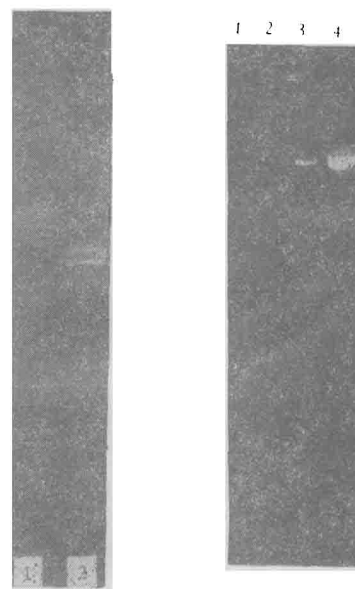


图5 回收片段的再酶切

1. 蓖麻蚕 NPV-DNA + Bgl II 的第一个片段 + EcoRI
2. 蓖麻蚕 NPV-DNA + Bgl II 的第二个片段 + EcoRI

图6 稀核酸溶液的浓缩效果

操作: 取 0.1 OD 260 的家蚕 NPN-DNA, 先对洗液缓冲液充分透析后, 取 5ml, 100V, 电泳 2 小时后, 于 1, 2, 3, 4, 四个部分中分别取 150, 150, 150, 50μl, 在 0.7% 的琼脂糖凝胶上电泳。

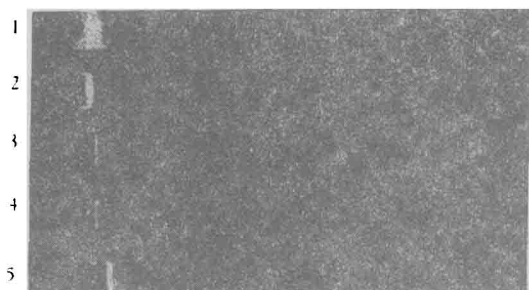


图4 回收片段的再电泳

1. 为蓖麻蚕 NPV-DNA (按文献 [2], [3] 方法制备 + Bgl II (上海东风厂或生物物理所生产), 2, 3, 4, 5 分别为回收后再电泳的蓖麻蚕 NPV-DNA + Bgl II 的四个片段