

测结果具有一定的参考价值,可以为实验提供指导,减少实验工作的盲目性。

参 考 文 献

- 1 Srinivasan N, Sowdhamini R, Ramakrishnan C *et al.* *J Peptide Protein Res*, 1990; **36**: 147
- 2 Pabo C O, Suchanek E G. *Biochemistry*, 1986; **25**: 5987
- 3 Hazes B, Dijkstra B W. *Protein Engineering*, 1988; **2**: 119
- 4 Sowdhamini R, Srinivasan N, Shoichet B *et al.* *Protein Engineering*, 1989, **3**: 95
- 5 Altman S L, Rotations. *Quaternions and double groups*. Oxford: Clarendon Press, 1986: 73
- 6 Wells J A, Powers D B. *J Biol Chem*, 1986; **261**: 6564
- 7 Katz B A, Kossiskoff A. *J Biol Chem*, 1986; **261**: 15480
- 8 Wetzel R, Perry L J, Baase W A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; **85**: 401
- 9 Villafranca J E, Howell E E, Oatley S J *et al.* *Biochemistry*, 1987; **26**: 2182
- 10 Villafranca J E, Howell E E, Voet D H *et al.* *Science*, 1983; **222**: 782
- 11 Nishikawa S, Adiwinata J, Morioka H *et al.* *Protein Engineering*, 1990; **3**: 443

7 种方法提取质粒 DNA 用于序列分析的比较

陈 劲 春

(中国科学院植物研究所,北京 100044)

提 要

对取自同一摇瓶内的菌体,采用 7 种不同提取质粒的方法分离 DNA,将分离的 DNA 做电泳观察、紫外吸收及序列分析,结果表明 CTAB 法具有快速、方便、可行的特点。

关键词 质粒 DNA, DNA 序列分析, CTAB 法

基因序列分析,是了解基因结构和进行 DNA 重组的必需手段之一。自从 Sanger 法和 Gilbert 法被发明并荣获诺贝尔奖以来,已有许多改进,并朝着精确、快速、方便并日趋自动化。目前用于序列分析的 DNA,可使用单链 DNA,亦可使用双链 DNA (质粒);前者可读性好,但是制备单链 DNA 比较麻烦,至少需 3 天时间;采用质粒测序,一般可读 250bp 左右,但制备时间短,对于插入片段不太大的质粒或者无需全部测序的质粒,提取质粒测序显然省时省事。提取质粒的方法已有多种,究竟哪一种方法比较实用,本文旨在这一目的进行实验。结果表明,CTAB 法^[1]具有快速、方便、可读性较好的特点。

1 材 料 和 方 法

1.1 质粒 pSbl 82, 自建^[2];载体为 pUC 119, 插入一段 2.1 kb Hind III 蓝藻 (*Anac-*

ystis nidulans 6301) 的染色体 DNA。

1.2 细菌培养 受体菌为 JM 109, 培养基为 2×YT; 挑选单一菌落接种于 2ml 培养液, 300r/min, 37℃ 过夜; 第二天扩增至 100ml, 氨苄青霉素浓度为 50μg/ml; 第三天上午停止培养, 分别依次从摇瓶里移出 5ml 培养液到已标明 2—7 号码的 eppendorf 管, 按方法 2—7 的具体步骤提取质粒。剩余的菌液按方法 1 进行分离质粒 DNA。

1.3 提取质粒方法 方法 1. 碱性粗提^[4], 再通过 Sephacryl S-1000 柱; 方法 2. CTAB 法; 方法 3. DEPC 法^[3]; 方法 4. QIAGEN tip 法 (简称 QT, 见 Instrument in Kit); 方法 5. 碱性粗提, 再用 QT 法; 方法 6. 碱性粗提, LiCl 沉淀 RNA 再过 QT; 方法 7. 碱性粗提, LiCl 沉淀 RNA 再过 DE-52 柱。

1.4 紫外吸收测定 使用 Du-65 分光光度计 Backman 产品, 总体积为 100 μ l.

1.5 核苷酸序列测定 使用美国 USB 产品 Sequenase version 2.0 Kit, 掺入同位素为 α -³²P-dCTP, Amersham 产品, 测序反应的程序均按 Kit 附带的说明进行, X 感光片采用 Kodar 和 Fuji 胶片, 电泳在同 4% 聚丙烯酰胺胶板上进行。

2 实验结果

2.1 电泳观察

电泳是在 1% 琼脂糖凝胶上进行, 电压 100V, 走 45min, 电泳缓冲液为 TAE.

从图 1 可以看出, 方法 1 即通过 Sephacryl S-1000 柱, 可将染色体 DNA、线性质粒 DNA、环状质粒 DNA 明显分开。方法 2 提取出的质粒 DNA 较多, 但仍含有 RNA。方法 3 提取

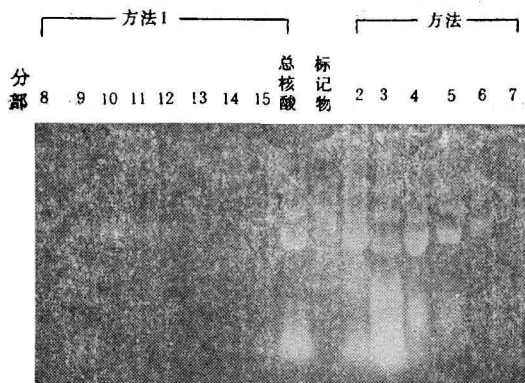


图 1 采用 7 种方法分离质粒 DNA. 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳的结果

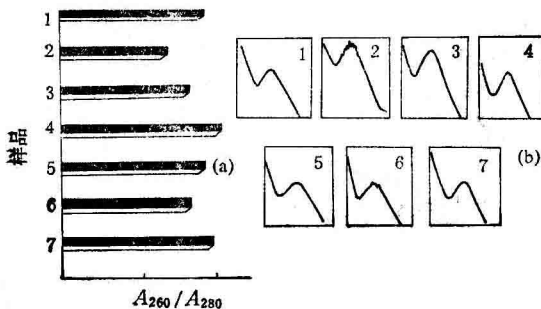


图 2 各个样品的紫外吸收特征
a: 紫外吸收 (260nm 比 280nm)
b: 紫外吸收曲线 (200—300nm)

方法 1 CTAB

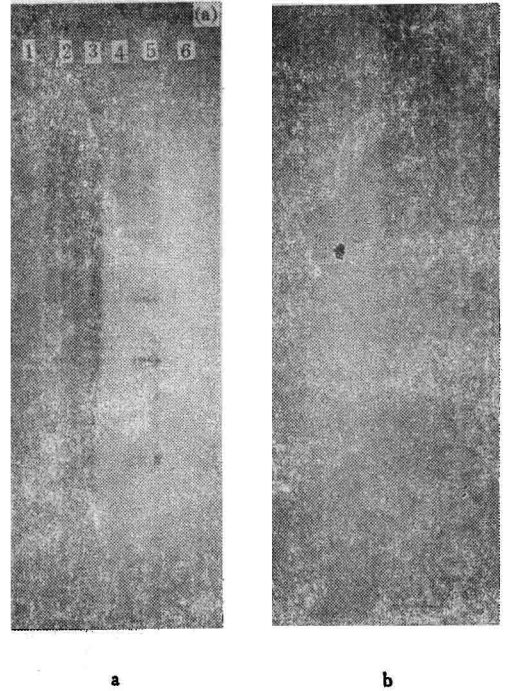


图 3

出样品含 RNA 最多。方法 6 样品中 RNA 最少。

2.2 紫外吸收测定 图 2b 是 7 个样品紫外吸收曲线图形(缩小), 虽然均呈核酸吸收峰特征, 但是方法 2 和方法 6 的吸收峰处呈锯齿状, 表明杂质较多; 图 2a 显示各样品 A_{260} 与 A_{280} 的比值, 很明显地看出经过柱的样品, 比值都比较大, 说明样品比较纯净。

2.3 测序结果 图 3a 中显示出上述各种方法制备的质粒在不利的反应条件下(酶贮存时间过长)所得到的结果, 显然方法 5 的可读性较好; 图 3b 显示出在正常的条件下采用 CTAB 法制备的 DNA 所得结果仅次于对照(方法 1)。图 4 中三个大小不同的质粒均采用 CTAB

69 82 81



图 4

法制备,读 250 bp 左右是易于做到的。

3 讨 论

3.1 CTAB 法具有快速、简便、可行的特点

用于制备 DNA 进行序列分析的方法,随着研究的深入已开发出几种。一般地说,单链 DNA 作模板,读序长度及二级结构带比双链 DNA 无疑好得多,而且退火反应之前不必经过变性拆链;但是制备单链 DNA 目前靠 *help phage* 感染上带有 F_1 因子的受体菌,才能释放出单链 DNA。尽管其间操作程序没有什么难点,可感染的机率并不太高;即使感染上去,有时释放出的 DNA 却是噬菌体 DNA,加上这个过程至少需要 3 天时间;所以除非需要测定几个 kb 的 DNA,一般不必花费这么长时间制备单链 DNA。相比之下,采用双链 DNA 进行序列分析,最明显的优点是省时。当然制备质粒 DNA 的方法,除了通常实验室使用的煮沸法、碱法、SDS 法之外,还有 CTA B 法,DEPC 法等;用于纯化质粒 DNA 的柱除了常见的 Sephadex 4B, NACS-52 等外,还有 Sephacryl s-400 或 s-1000 等,甚至还有专利产品 QIAGEN tip,各有各的特点。如果打算少花钱多办事,使用

CTAB 法是比较合适的。它具有快速、简便的特点。利用该法制备 DNA, 1.5—5ml 培养菌液均可,仅需台面小型高速离心机,一天至少可制备 50 个样品,从培养细菌开始到制备 DNA 完毕均可在 24 h 内完成;提取的 DNA 可供 2—3 次测序;既省时间又省试剂,尤其是仅需要读 1—200bp 的样品,该法更显得优越。

3.2 进一步改进 CTAB 法的效果

从图 3a 和图 3b 可以看出,利用 CTAB 法制备的质粒 DNA,读序背景比走柱样品的背景黑暗,这是样品中蛋白等杂质导致的结果。对此采用二种措施之一就可以加以改进。其一是样品用冷乙醇沉淀之前,加进等体积的氯仿:异戊醇(24:1)处理一次,可弃去大部分杂质;其二是用商品化 QIAGEN 吸嘴处理一次,其效果大为改观,如图 4 所示。

参 考 文 献

- 1 Giannino Del *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1988; 16 (20): 9878;
- 2 Jing Chun Chen *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1990; 18(13): 4017
- 3 Donald E. Gene, 1989; 75: 193
- 4 Sambrook J *et al.* *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1.33—1.35

一种改良的快速筛选重组 DNA 噬菌体噬斑的原位杂交技术*

陈书琨** 沈正达 胡永浩 王 蒲

(甘肃农业大学兽医系,兰州 730070)

提 要

报道了一种从表达型噬菌体载体—— λ gt11 构建的基因文库中筛选重组 DNA 噬菌体噬斑的改良蛋白质-蛋白质原位杂交技术。此法可使噬菌体在硝酸纤维素薄膜上增殖至原噬斑大小,经适当处理后,即可用特异性抗体探针进行原位筛选,以

* 国家自然科学基金资助项目 ** 现在通讯处: 中华人民共和国深圳动植物检疫所,深圳 518001
收稿日期: 1991-07-10 修回日期: 1991-10-21