

经验交流

提取质粒的一些经验

周锡璋 刘琳

(中国医学科学院, 抗菌素研究所, 北京)

在质粒 DNA 的提取过程中, 尤其是那些不能扩增的质粒, 常因拷贝数低而提取困难, 收率不高, 甚至发生质粒完全丢失的现象。而放线菌质粒的提取条件更是因菌而异, 难度较大, 现仅将我们试验中的一些经验介绍如下。

1. 培养基对质粒提取收率的影响

一般来说微生物的遗传性是稳定的, 有无质粒也是一种固有的属性, 除了诱变剂之外培养基的改变不会对此有何重大的影响。但是, 有的菌则不然, 如创新霉素产生菌 *Actinophanes jinanensis* R₄^[1], 斜面培养基中所用琼脂有较大的关系。当用青岛产海燕牌条状琼脂时, 培养的菌可以提取到质粒, 如用粉末状琼脂就不能提取出。这是因为粉末状琼脂比条状琼脂纯, 纯化所失去的成份中含有此放线菌质粒 DNA 合成的必要因素。

2. 乙醇沉淀 DNA 所遇到的两个问题

(1) 大量提取时乙醇的用量 国内外许多实验室在沉淀 DNA 时常用相当样品体积 2—2.5 倍的乙醇, 在大量提取时就用玻棒挑取乙醇沉淀物。我们在实验中进行了仔细的观察, 发现当慢慢摇动样品时加入乙醇, 沉淀形成的最佳条件是在所加乙醇量接近样品体积的时候, 如果搅动太快或乙醇量逐渐多于样品, 已形成的沉淀物将大部分消失。因此, 选择加乙醇的量接近样品量的时机, 及时捞取沉淀最适当。这样还可以节省大量的乙醇。

(2) 乙醇沉淀时造成质粒提取收率降低甚至完全丢失的现象 我们用清亮裂解法大量提取创新霉素产生菌质粒 DNA 时, 常常发生乙醇沉淀后再溶解检测不出质粒的现象, 样品如在乙醇沉淀之前用酚-氯仿抽提过也无济于事。分析其原因是当乙醇沉淀时, 形成大量蛋白质、染色体 DNA、质粒 DNA 以及 RNA 的沉淀物, 这些沉淀物互相缠绕在一起。尤其是蛋白质, 在变性后呈不溶状态, 放线菌的裂解液产生比细菌更多的蛋白质, 使沉淀物更难溶解, 因而电泳检测不出游离质粒 DNA。用相似的方法提取大肠杆菌及枯草杆菌时, 就没有发生这种现象。为了解决这种质粒丢失问

题, 用等体积的酚: 氯仿 (1:1) 抽提沉淀-缓冲液悬液, 就能使质粒从沉淀中释放出来。

3. EB 对质粒电泳的影响

不少实验室 (包括一些知名的实验室试验手册^[2]) 常在电泳时把 EB 预先加入琼脂糖胶中, 电泳后可直接在紫外灯下观察, 用不着再经一次染色程序。根据我们的经验, 对那些与染色体 DNA 分子量接近的质粒, 最好采取电泳后再用 EB 染色, 否则也许会造成电泳检测不出质粒带的后果。例如, 创新霉素产生菌质粒 DNA AJP₁ 的分子量是 9×10^6 道尔顿^[1], 粗提物电泳时如先加 EB 入胶中, 电泳后只能看到染色体及 RNA, 看不到质粒 DNA 区带, 这是由于 EB 起着联结两种分子量相近的 DNA 的作用, 从而造成样品中无质粒 DNA 的假象。

4. 金属离子在质粒提取过程中的应用

当培养大量菌液提质粒时, 由于体积大, 因此操作麻烦。我们试图用金属离子将核酸沉淀。经过研究, 发现 Cu⁺⁺、Zn⁺⁺、Mn⁺⁺ 等二价金属离子能够相当快而完全地沉淀核酸, 甚至用普通离心机就能收集沉淀。通过这种简易步骤能将大体积样品变为相当小的体积, 有利于进一步处理 (详文另载)。

5. 碱变性提取质粒方法的改进

自从 1979 年 H. C. Birnboim 和 J. Doly^[3] 共同发表碱变性法提质粒后已被广泛应用, 尤其在提细菌质粒中效果很好。但是对放线菌来说就不能完全照搬。放线菌是一类具有重要工业价值又与细菌很不同的微生物, 不同放线菌用碱变性提质粒时条件往往不同。Omura 等人^[4]在提大环类抗生素产生菌质粒时, 碱处理时间为 8—10 分钟。我们按细菌及 Omura 提质粒方法去提取创新霉素产生菌质粒 AJP₁ 就得不到质粒 DNA, 为了探求其原因, 我们将创新霉素产生菌在 37℃ 水浴中用溶菌酶裂解 30 分钟, 然后分别在 NaOH-SDS 溶液中 0℃ 裂解 3、5、10、15 及 20 分钟, 结果表明 5 分钟以上质粒就发生降解, 3 分钟基本上就能满足需要, 这也说明对放线菌而言, 碱变性对不同的菌株处理时, 时间的长短可能是一个决定性的因素。

