

经验交流

提取质粒的一些经验

周锡漳 刘琳

(中国医学科学院, 抗生素研究所, 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 itnaneensis* 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质粒。这是因为粉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璃棒挑取乙醇沉淀物。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。

另外，我们总结了对大肠杆菌质粒 pBR₃₂₂、枯草杆菌质粒 pUB110 及放线菌质粒 AJp₁，碱变性后电泳的结果，发现有一共同的现象：除质粒区带之外，在染色体部位都有一条很细的区带，其原因可能是(1)染色体 DNA 由于分子量太大，而且又有多级结构，有小部分因裂解不全，故仍呈双链状，电泳时仍留在染色体位置上；(2)不同种类的微生物 DNA 分子中，可能存在一段具有共同结构的区域，具有耐碱性而不为碱裂解为单链。由此推测，这段结构相似的片断可能有某种特殊的生物功能。

6. 提取过程中溶媒的选择

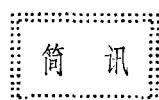
为了去掉样品中的大量蛋白质，常用缓冲液饱和过的酚，氯仿-异戊醇(24:1)或酚-氯仿(1:1)来抽提样品。我们用含蛋白质比细菌多的放线菌为对象详细比较了这三种用法，结果表明：(1)用饱和酚提取样品 4 次后上清液仍不很清。(2)氯仿-异戊醇抽提 5 次仍

很混浊。(3)酚提 2 次再用氯仿-异戊醇提 2 次基本上可以。(4)酚-氯仿仅抽提 2 次样品就较清。可见以酚-氯仿抽提去蛋白效果较好，速度也快。除放线菌外，这对大肠杆菌及枯草杆菌的质粒提取都表明有共同的效果。

参 考 文 献

- [1] 强伯勤、周锡漳等：《中国医学科学院学报》，1982 年 4 期，97 页
- [2] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, P. 159, 1982.
- [3] Birnboim, H. C. and J. Doly.: *Nucl. Acids. Res.*, 7(6): 1513, 1979.
- [4] S. Omura, et al.: *J. Antibiotics*, 34(4): 478, 1978.

[本文于1985年9月12日收到]



“重带电粒子在科研和医学中应用的学术讨论会”

重带电粒子在科研和医学中应用的学术讨论会 (Symposium on Heavy Charged Particles in Research and Medicine) 于 1985 年 5 月 1 日至 3 日在美国加州大学伯克利分校劳伦斯伯克利研究所召开。会议由该所的生物医学分部主持，美国陆军放射生物学研究所、国家航天局、北加州癌症研究协作组和加州大学等参与了会议的组织工作。来自美、英、加拿大、荷兰、西德、瑞典和日本等国家从事重离子辐射研究及临床应用的科学家 140 多人聚集一堂。我国正在美国进修的有关专业人员也出席了此次讨论会。

会上，各国科学家共 32 人作了发言。内容有重带电粒子束物理学、化学方面的研究结果；生物效应方面的研究成果较为集中，如不同线性能量转移 (LET) 的重带电粒子束对哺乳动物及人体细胞的致死损害、染色体诱变及诱发细胞癌变等现象的观察与作用机制的探讨；对辐射后 DNA 损伤及其修复的机理等也作了探讨。

会议听取了临床应用方面的报告，介绍了各国使用中子、质子、 π 介子及氦离子束治疗恶性肿瘤的情况。如美国劳伦斯伯克利研究所生物医学分部与加州大学旧金山分校医学院合作，用加速器产生氦离子束作放射治疗试验，跟踪治疗效果已达十年。结果表明，这种治疗对视觉神经通路及脊髓高位的小型恶性肿瘤特别有效；而对某些抗辐射的肿瘤，如胰腺癌、肾癌和食道癌等无特别明显的效果。会议还对重带电粒子在医学中的应用前景作了预测。

据悉，大会的主要发言将刊登在 1985 年年底出版的美国放射学杂志 (Radiation Research) 的增刊上。

[华南农业大学生物物理研究室 梅曼彤]