

经验交流

噬菌体 DNA 的快速抽提

覃文新 万大方 赵新泰 蒋惠秋 顾健人

(上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室, 上海 200032)

摘要 介绍一种噬菌体 DNA 的快速抽提方法. 用聚乙二醇沉淀噬菌体颗粒, 然后经 DEAE 纤维素纯化处理 and 酚抽提. 与传统的噬菌体 DNA 纯化方法相比, 改进后的方法方便、快速、经济, 可获得高纯度的噬菌体 DNA.

关键词 噬菌体 DNA, 抽提, 聚乙二醇, DEAE 纤维素

学科分类号 R373.9

在人类基因组研究实验过程中, 必须进行大量 cDNA 噬菌体克隆的筛选和扩增, 每一位操作者可能都要进行噬菌体 DNA 的分离纯化工作. 标准的噬菌体 DNA 纯化方法需要用 DNase 处理噬菌体裂解液以降菌体 DNA 和进行超离心纯化噬菌体^[1], 费时且不方便. 我们参照文献 [2] 提供的方法, 并对此进行了改进, 可以方便、快速地得到高质量的噬菌体 DNA, 用于酶切回收插入的目的 DNA 片段和进一步的基因克隆操作.

1 材料和方法

1.1 试剂

人胎盘 cDNA 文库, 载体为 λ gt11 (本实验室构建), 聚乙二醇 6 000 (K-Light 公司, 上海化学试剂分装厂分装), DEAE 纤维素-DE52 (Whatman 公司), 蛋白酶 K (GIBCO-BRL.).

DEAE 纤维素的配制方法: 100 g DEAE 纤维素用几倍体积的 0.05 mol/L 盐酸浸泡 (pH < 4.5), 然后缓慢加入 10 mol/L NaOH 调 pH 至 7, 倒掉上清, 用数倍体积的 LB 洗涤几次, 直至上清的 pH 值接近 LB 为止, 最后加入 1/3 体积的 LB, 配制成 DEAE 纤维素悬浮液, 加 0.1% 叠氮钠防腐, 贮存于 4℃.

1.2 噬菌体的液体扩增

人胎盘 cDNA 文库, 按常规方法^[1]挑取单克隆, 并进行噬菌体液体扩增 (略).

1.3 噬菌体 DNA 的纯化

对于每 4 ml 的噬菌体液扩裂解液, 加入等体积 20% 的聚乙二醇溶液 (含 2 mol/L NaCl, 用 λ 噬菌体缓冲液即 SM 配制), 混匀后, 冰上放置 1 h, 沉淀噬菌体颗粒. 8 000 r/min 离心 20 min, 去聚乙二醇上清, 并尽量将离心管管壁上的聚乙二醇擦拭干净, 得到噬菌体颗粒沉淀, 将沉淀用 750 μ l LB 溶液悬浮, 并转移至 Eppendorf 管中, 加入等体积的 DEAE 纤维素悬浮液, 缓慢颠倒 20 次左右, 12 000 r/min 离心 5 min, 将上清转移至另一 Eppendorf 管中, 重复离心一次, 取上清. 对每毫升上清, 加入 20 g/L 的蛋白酶 K 溶液 2 μ l 和 10% SDS 42.5 μ l, 混匀, 室温放置 5 min, 然后用酚、酚/氯仿、氯仿各抽提一次, 酒精沉淀, 即可得到纯净的噬菌体 DNA^[2].

2 结果和讨论

我们采用本方法, 对人胎盘 cDNA 文库 (λ gt11 载体) 的几个克隆进行了小规模液体扩

增和噬菌体 DNA 的分离纯化; 并用 *EcoR* I 限制性内切酶对所提取的噬菌体 DNA 进行了酶切、电泳, 可见到有 cDNA 插入片段释放 (图 1). 图 1 中酶切所用的噬菌体 DNA 的量系从约 1 ml 的 LB 液扩裂解液分离纯化而来. 结果表明, 用本方法分离纯化所得的噬菌体 DNA 不仅纯净, 用合适的限制性内切酶消化即可得到目的 DNA 片段, 用于下一步亚克隆操作或其他实验, 而且方法稳定, 得率较高. 对于 1 ml 有较高滴度 ($> 10^{11}$ pfu/ml) 的液扩裂解液, 可分离得到 2~3 μ g 的噬菌体 DNA (图 1).

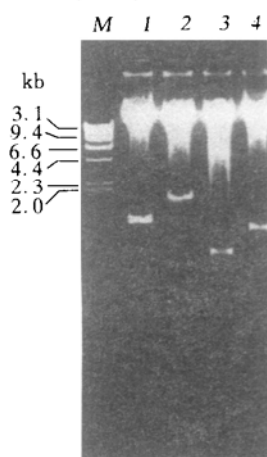


图 1 人胎盘 cDNA 文库 (λ gt11 载体) 噬菌体 DNA *EcoR* I 酶切后琼脂糖凝胶电泳图
M: λ DNA 分子质量标准 (*Hind* III 酶切); 1~4: 四个不同的 cDNA 克隆 (*EcoR* I 酶切).

本文介绍的噬菌体 DNA 的抽提方法, 不同于常用的噬菌体 DNA 纯化的标准方法^[1], 需要用 DNase 处理噬菌体裂解液和超离心; 也有别于文献 [2] 报道的方法, 省去了用醋酸钾冰浴去除 SDS 和 88 $^{\circ}$ C 温育灭活蛋白酶 K

这两步, 具有快速简便的特点, 从聚乙二醇沉淀噬菌体颗粒到分离得到纯净的噬菌体 DNA, 整个过程仅需约 3 h. 另外, 本方法的绝大部分操作都在 Eppendorf 管中进行, 实验操作还具有简便省力、效率高的特点. 所以该方法尤其适用于对多个 cDNA 克隆同时进行噬菌体 DNA 的纯化工作, 对于 cDNA 文库筛选, 特别是在基因组研究中具有一定的应用价值.

参 考 文 献

- 1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 2. 60~ 2. 67
- 2 Zagursky R J, Baumeister K, Lomax N *et al.* Rapid and easy sequencing of large linear double-stranded DNA and supercoiled plasmid DNA. *Gene Anal Tech*, 1985, 2 (1): 89~ 94

Rapid Extraction of Phage DNA. QIN Wen-xin, WAN Da-fang, ZHAO Xi-r-tai, JIANG Hu-r-qiu, GU Jian-ren (*National Laboratory for Oncogenes and Related Genes, Shanghai Cancer Institute, Shanghai 200032, China*).

Abstract A purification method for phage DNA is introduced. Phage particles are precipitated by polyethylene glycol (PEG), then purified by DEAE-cellulose DE52 and extracted by phenol. This modified method is more convenient, rapid and economical than the traditional method of phage DNA purification and can obtain phage DNA with high purity.

Key words phage DNA, extraction, polyethylene glycol (PEG), DEAE-cellulose DE52

(上接第 185 页, Continued from page 185)

Molecular Cloning and Sequencing of Neurotrophin-4 Gene from Chinese. WANG Ai-kun, LIU Zhe-wei, BAO Yi-hua (*Beijing Municipal High-tech Laboratory, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China*).

Abstract With the chromosomal DNA of human blood lymphocytes as template,

neurotrophin-4 coding genes were amplified by PCR and recombined into phage vector M13, which were sequenced by using Sanger's single-stranded DNA terminal termination method. The sequence of the cloned gene is completely the same as that reported in the literature.

Key words neurotrophin-4, gene cloning, DNA sequencing