

从凝胶中回收 DNA——基因研究中的一个重要方法

刘敬忠

(中国医学科学院基础医学研究所北京)

在基因的结构与功能的研究中,如研究基因的物理图谱,测定 DNA 序列, DNA 杂交, DNA 重组等,都必须首先得到高纯度的足量 DNA 片段。凝胶电泳是按照分子大小分离 DNA 的好方法,既简便,又分辨率高。但电泳分离以后,如何从凝胶中回收 DNA 组份则是一个比较困难而又关键的问题。从已发表的文獻^[9,10,12-14]来看,目前尚没有一种公认为满意的方法。每种方法有各自的优点及局限性,实验者必须根据具体情况选用。本文根据作者所见到的及本实验室几年来的实践体会,对常用的方法加以介绍与比较。

评价方法的标准是:简便,快速,产率及纯度。

1. 冻挤法 将含有 DNA 的凝胶小块(经 EB 染色后,在紫外灯下显示荧光)切下,冰冻后,夹在两层胶膜之间,用手指撮着,融化并挤压之。滴出的液滴中含大部分 DNA。此法简便^[1],但回收率仅 50—65%,只适用于回收少量样品。

2. 机械破碎法 用小匀浆器或使凝胶块通过注射器针头将凝胶破碎,离心后的上清液通过 1.2 μm 微孔滤膜过滤,即得含 DNA 的溶液。Wheeler^[2] 认为此法最为简单、快速,回收率高(90—95%);但对分子量大的 DNA 不适用,因其可能遭到断裂。

3. SDS 溶液浸出法 将凝胶块置于含 0.1% (W/V) SDS 及 0.5 M NH_4Ac , 10 mM $\text{Mg}(\text{Ac})_2$, 1mM EDTA 的溶液中, 37℃ 过夜,离心后的上清液经微孔滤膜过滤或乙醇沉淀即得 DNA。此法对从聚丙烯酰胺凝胶中回收小片段 DNA 效果最好。如果是琼脂糖凝胶,则应预先压碎。Maxam 和 Gilbert^[3] 已用此法制备 DNA 片段并成功地用于化学法测序。

4. 羟基磷灰石 (HPA) 吸附法^[2] 用 4 倍体积 6M NaClO_4 或 KI 溶液,在 45℃ 下将凝胶块溶解,加到预先平衡好的 HPA 小柱上。先用饱和的 NaClO_4 或 KI 溶液洗净柱中琼脂糖,再用 0.08M 磷酸钾缓冲液洗,最后用 1M 磷酸钾缓冲液洗脱 DNA。此法回收的 DNA 纯度高,无杂质;但回收率不高(50—75%),且不稳定。

5. 玻璃纤维或玻璃粉吸附法 Wu 等^[4] 用 NaClO_4 溶液把凝胶块溶解后,通过玻璃纤维滤膜过滤, DNA 被吸附在玻璃纤维上。依次用 0.5ml NaClO_4 -Tris 液, 0.5ml 异丙醇, 0.5ml 乙醇洗。干后,滤膜用 25 μl 5mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5mM EDTA 浸泡 1 分钟。离心收集浸泡液。这样得到的含 DNA 的低盐溶液纯度好,回收率较高(70—90%)可直接用于各种酶反应。

Vogelstein 等^[5] 用 NaI 液溶解凝胶块,用玻璃粉吸附 DNA,也取得成功。

6. KI 梯度法 用 KI 溶液溶解凝胶块后,在 KI 梯度中进行平衡离心纯化 DNA。此法最早是 Blin 等人创用^[6],后 Wheeler 采用^[2],认为非常可靠有效,回收率几近 100%。

7. 电泳洗脱法 Smith 等^[7] 把凝胶块装入一透析袋中,并加入适量新鲜电泳缓冲液,平放在两电极之间的浅层缓冲液中,通电 30 分钟,使 DNA 全部走出凝胶。再反向通电 10 秒钟,使膜上 DNA 释放出来。吸出含 DNA 的缓冲液,酚抽提,乙醇沉淀。此法主要缺点是在透析袋上损失 DNA 较多。

Wu 等^[4] 直接在 DNA 区带前方(指靠近正极一方;下同)切出适当大小的沟槽,充入新鲜缓冲液,使凝胶中 DNA 电泳进入其中。吸出,同上法沉淀 DNA。此法最大优点是简便快速;

但回收率不高。

Wu 等同时在 DNA 区带前方挖一 U 形槽, 铺上一片适当大小的透析膜。将新鲜缓冲液加在衬有透析膜的 U 形槽内, DNA 通过电泳全部进入缓冲液中, 同上法回收 DNA, 提高了回收率(可达 90%), 操作也较简便。

8. 低熔点 agarose 法 在 DNA 区带前方挖适当大小沟槽, 充以低熔点 agarose, 凝固后, 通电, 使 DNA 进入其中。切出含 DNA 的凝胶块, 61.5℃ 融化之, 经酚抽提, 乙醇沉淀, 即得纯 DNA。具备条件者采用此法颇方便可靠。

9. HPA 吸附法 Ledebor 等^[8]用 blotting 技术或电泳法将凝胶中 DNA 转移到 HPA 中, 把后者装成小层析柱, 洗脱得到 DNA 溶液, 浓缩后可用。此法所得样品纯度高; 但当 DNA 量少时, 洗脱体积相对较大, 样品稀, 乙醇沉淀时损失多, 回收率低。

10. 电洗脱杯法 如图 1 所示, 由于 A, B, C, D, E 五个被半透膜相互隔开的小室中离子强度不同, 使置于样品室中凝胶块中的 DNA 能快速电泳到收集室。在高盐屏障作用下, DNA 在收集室中泳动速度陡降而被浓缩。此法操作时间短(1—2 小时), 对大至 49Kbp 小至 47bp 的 DNA 片段以及双链闭环 DNA 都有较高回收率(78—90% 以上)。由于整个装置可用二乙基焦碳酸盐处理使核酸酶失活, 所以也可用来回收完整的 RNA。本设备有商品出售, 自制也不难。

11. 夹心式滤纸电洗脱法 在 DNA 区带前方凝胶中, 插入适当大小 Whatman 3MM 滤纸,

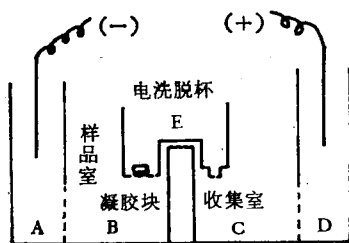


图 1 电洗脱杯法装置示意图

虚线表示半透膜相通处。A, C, D 三室充以极高离子强度缓冲液, B 室充以中等离子强度缓冲液, E 室充以极低离子强度缓冲液。详见 Peter HZ. 等^[9]。

滤纸背面包以半透膜。待 DNA 全部电泳到滤纸上后, 再从滤纸上洗下来, 用乙醇沉淀。

12. 夹心式 DE-81 纸电洗脱法 最初 Winberg 等^[11]用 blotting 技术把凝胶中 DNA 转移到 DE-81 纸上, 再从 DE-81 纸上回收 DNA。Dretzen 等^[12]则将适当大小的 DE-81 纸片插入到 DNA 区带前方(见图 2), 使 DNA 电泳到纸上, 这样大大节省了时间。从纸上洗脱 DNA 时采用自制微型滤器, 有利于提高纯度, 方便操作。此法对各种浓度的 agarose 凝胶及聚丙烯

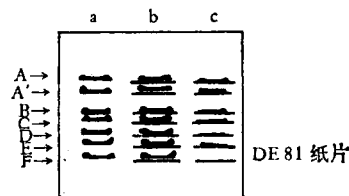


图 2 将凝胶中 DNA 电泳转移到 DE-81 纸片上的示意图

- (a) 腺病毒-2 DNA 用 EcoRI 降解, 1% agarose 凝胶电泳分离。
- (b) 在每条 DNA 区带前方插入 DE-81 纸片。
- (c) DNA 电泳到纸上。分子小者, 转移较快。详见 Dretzen G. 等^[12]。

酰胺凝胶都可应用。回收率在 60—80%。样品纯度好。只是对闭环 DNA 回收率低, 仅 20% 左右^[12]。

13. 潜水艇式 DE-81 纸电洗脱法^[13] 此系在前两法基础上发展来的。把 DE-81 纸条覆盖在凝胶上面, 使电泳在与凝胶表面垂直的方向上进行。待 DNA 全部进入纸条, 再从纸上回收 DNA。它省去了把 DE-81 纸条插入胶中的操作(纸湿后极易破碎, 不好操作)。如果两条 DNA 区带距离很近, 用此法可避免交叉污染。当有多条 DNA 区带都要从同块凝胶板上回收时, 此法更显方便。

此外, 尚有一些需要复杂设备的回收 DNA 的方法^[14]以及回收单链 DNA 的甲酰胺抽提法等^[15], 不一一详述。

凝胶中极易混杂进 DNA 样品中的硫酸化多糖, 这是许多酶的强抑制剂, 必须尽可能彻底地除去。常用的纯化方法可参考 Southern^[14]。但纯化步骤越多, DNA 损失越大。故应选用最

简便最可靠的方法,避免过多纯化步骤。

几年来,我们实验室曾先后采用过电洗脱法,HPA 吸附法,玻璃粉及玻璃纤维吸附法等,但效果都不甚满意。近年来采用夹心式 DE-81 纸电洗脱法,取得相当满意的效果。我们认为此法兼有简便、快速、回收率高,样品纯度好等优点。我们用此法回收的 DNA 进行多种限制性内切酶酶解、缺口翻译标记³²P 以及重组 DNA 的连接反应等,都取得好的结果。DE-81 是容易购到的一种离子交换型纤维素纸,另外不需任何特殊设备与材料。因此作者认为这是一种值得推广的切实可行方法。

参 考 文 献

- [1] Thuring, R. W. J. et al.: *Anal. Biochem.*, **66**, 213, 1975.
- [2] Wheeler, F. C. et al.: *Anal. Biochem.*, **78**, 260, 1977.
- [3] Maxam, A. M. et al.: *Methods in Enzymology* (Grossman L. and Moldave K., eds.), Vol. 65, Part 1, 499—560, 1980. Academic Press, New

York.

- [4] Wu Ray et al.: *Methods in Enzymology* (Wu R. ed.), vol. 68, 176—182, 1979, Academic Press, New York.
- [5] Vogelstein, B. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **76**, 615, 1979.
- [6] Blin, N. et al.: *FEBS Letter*, **53**, 84, 1975.
- [7] Smith, N. O. *Methods in Enzymology* (Grossman L. and Moldave K. eds.), vol. 65, 371, 1980, Academic Press, New York.
- [8] Ledebroer, A. M. et al.: *B. B. A.*, **520**, 498, 1978.
- [9] Zassenhaus, H. P. et al.: *Anal. Biochem.*, **125**, 125, 1982.
- [10] Girvitz, S. C. et al.: *Anal. Biochem.*, **106**, 492, 1982.
- [11] Winberg, G. et al.: *Nucleic Acid Res.*, **8**, 253, 1980.
- [12] Dretzen, G. et al.: *Anal. Biochem.*, **112**, 295, 1981.
- [13] David, B. Danner.: *Anal. Biochem.*, **125**, 139, 1982.
- [14] Southern, E.: *Methods in Enzymology* (Wu R. ed.), vol. 68, 152, 1979. Academic Press, New York.
- [15] Hayward, G. S. et al.: *J. Molecular Biol.*, **63**, 397, 1972.

[本文于1983年10月17日收到]

几种生物大分子的激光拉曼光谱

孙永泰 朱克莉

(中国科学院生物物理所,北京)

第一个生物大分子——溶菌酶的激光拉曼光谱发表于1968年。两年后 R. C. Lord 等用浓溶菌酶水溶液实验,对其大部分拉曼谱带作了指认。1970年 Rimai 等人发表了胡萝卜素、番茄红素、番茄组织和视网膜中视蛋白的共振拉曼光谱。随后十年,拉曼光谱在生物学领域中应用发展极其迅速,对各种生命物质进行了广泛研究。

激光拉曼光谱用于生物学研究最突出的优点是水对谱图的干扰甚少,而大部分生命现象却发生在水溶液中;拉曼光谱的谱带丰富,可获得较多信息;此外还有样品用量少,可测量各种物理状态下的样品。它可以补充和扩展其它技

术(如X射线衍射、核磁共振、荧光、圆二色性)的信息,目前它已成为分子生物学的有用工具。

本文介绍我们获得的五种拉曼光谱,其中溶菌酶、胰岛素、二棕榈酰磷脂酰胆碱的拉曼光谱,国外已发表^[1-3]。 μ_2 RNA 和眼镜蛇细胞毒素的图谱未见报道。在第二部份,我们还就几年来在实验中摸索到的一些经验,作一介绍。

一、生物大分子的拉曼光谱

1. 材料和方法

溶菌酶:二次重结晶(上海东风试剂厂),用重蒸水溶解,浓度100mg/ml,以4000转/分