

## 经验交流

# 介绍一种回收 DNA 片段和浓缩核酸稀溶液的方法

马延高 陈蔚梅 王静怡 燕小安  
(武汉大学病毒研究所)

在核酸的结构与功能和遗传工程研究中，常常遇到由凝胶带上回收限制性内切酶酶切片段和大体积溶液中核酸(或片段)浓缩的问题。多年来，不少人，采用不同方法试图解决这一问题，但是，有的回收率不高(20—30%)；有的回收后样品不能直接为酶作用，有的样品含量太低，不能满足研究需要。

我们受 D. E. Mitchell 等<sup>[1]</sup>工作的启发，摸索出一种快速有效的方法，介绍如下：

### 材料和方法

1. 所用装置由洗浓器、电泳槽和电泳仪三部分组成。

(1) 洗浓器是主要部件(图 1)，由 1 cm 厚的有机玻璃，按图 2 的尺寸胶合而成。分为样品放置端、过渡部分 1、过渡部分 2 及样品回收端四个部分(图 2B)。如果在洗浓器中加入 10 ml 溶液，则四部分中各占有 3.5 ml、4.6 ml、1.75 ml 和 0.15 ml。

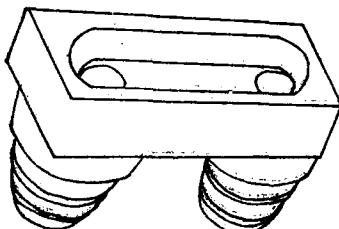


图 1 洗浓器外观

(2) 电泳槽(图 3)，其大小由每次使用的洗浓器的个数来决定。

(3) 电泳仪为一般实验室常用电泳仪。

2. 从琼脂糖凝胶上回收 DNA 片段的具体步骤 在长波(300nm)紫外灯下分别取出电泳分开的 DNA 片段的胶带，切成适当大小( $0.5\text{cm} \times 0.2\text{cm}$ )，置样品放置端中，两端用处理过的透析膜封住。加入洗浓缓冲液(5mM Tris, 25mM 醋酸)至 10ml，再加入 10μl 酵母 tRNA 溶液(1μg/ml)，把洗浓器放入含有足够量的电泳缓冲液(40mM Tris-HAc, 20mM NaAc 1mM EDTA-Na<sub>2</sub>)

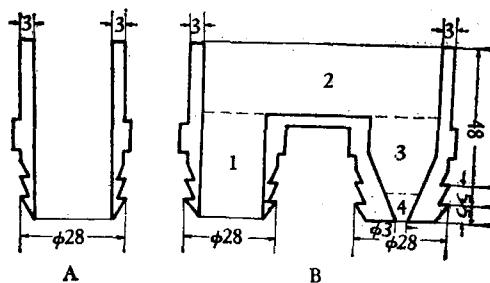


图 2 洗浓器剖面观  
A. 横剖面观 B. 纵剖面观  
1.——样品放置端 2.——过渡部分 1  
3.——过渡部分 2 4.——样品回收端；单位：mm

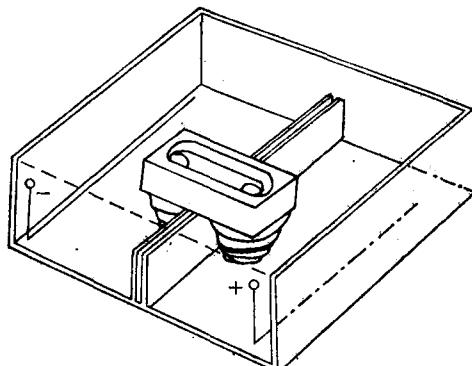


图 3 电泳槽

pH8.0)的电泳槽内，200V，电泳 4 小时。用吸管吸去 1、2、3 部分溶液(此时已不含 DNA 片段)小心取出第 4 部分(约 150 μl)，即为回收片段之溶液。

如要浓缩低含量的核酸溶液，则先将此溶液对洗浓缓冲液(5mM Tris, 25mM 醋酸)充分透析后，再倒入洗浓器中，电泳 3 小时，即可收取浓缩样品。

### 结果与讨论

1. 由琼脂糖凝胶上回收的样品，电泳迁移率与原来的一样(图 4 见封二)；不需任何处理即可直接被酶切(图 5 见封二)，回收率达 60—80% 左右。

用其他电洗脱方法回收的样品，如不经处理。在重新电泳时迁移距离有改变或根本不能进胶，也不能被酶切。但样品经过一系列处理，损耗太大，最终可能无法回收。本法具有上述优点的主要原因是放在样品放置端的琼脂糖，由于本身的重量和电中性，不可能进入样品回收端，但操作必须十分仔细。此外，与DNA结合的EB，经长时间电泳而除尽，不影响DNA的再使用。

2. 稀含量 DNA 溶液的电泳浓缩效果见图 6 (封二)。如果电泳时间延长至 3 小时或电压提高至 200V，则样品全部集中到第 4 部分内。浓缩效果可达 60—70 倍。

3. 把洗浓缓冲液换成电泳缓冲液 (或稀释 100 倍)，则回收不到样品，因为随着电泳时间的延长，洗浓器中的温度电流迅速增加，电泳两小时后温度达 70—80℃，电流则由开始的 5mA 上升到 30—35 mA。用高离子强度的溶液作洗浓缓冲液，由于持续高温可能使样品破坏。采用我们推荐的洗浓缓冲液，即使电泳 4

小时，温度不超过 40℃，电流仅由 2mA 上升到 10mA 左右。

4. 电洗脱浓缩的时间和电压是相关的。如果电压低于 100V，起始电流 1mA 左右，电泳即使持续到 4 小时，终电流也只有 3—5mA，洗浓效果很不理想。如果延长电泳时间，效果也不见改善。

5. 本文介绍的回收 DNA 片断和浓缩 DNA 稀溶液的缓冲系统及电泳条件，对于 tRNA，也可得到满意结果。估计也可用于由聚丙烯酰胺凝胶上洗脱并浓缩 DNA。

## 参 考 文 献

- [1] Mitchell, D. E. and J. W. Nelson: *Anal. Biochem.*, **85**, 188, 1978.
- [2] 马延高等：《病毒学集刊》，第三期，141, 1983。
- [3] 马延高等：《武汉大学学报》(自然科学版)，第三期，96, 1983。

[本文于 1984 年 1 月 19 日收到]

# 安培法测定谷物直链淀粉含量

何照范 单友谅 牛爱珍

(贵州农学院生化营养研究室, 贵阳)

谷物中直链淀粉含量是衡量谷物品质优劣的主要指标之一，因此建立一个简易而精确的方法测定它，很有必要。在实践中我们感到 Bates 等人(1943)的安培测定法是比较满意的。我们在此基础上，根据国内条件自行试制了一台简易安培滴定装置。在测定时，以热稀碱溶液处理甘汞电极，消除了甘汞电极易因淀粉沾附而钝化的弊病，提高了测量准确度。

## 一、材料与方法

### 1. 主要试剂及仪器

1 毫克/1 毫升直链淀粉标准液：称取直链淀粉(纯度为 96—97%)52 毫克，加 0.5N 氢氧化钠溶液 10 毫升，在热水浴中溶解，以蒸馏水定容至刻度。

1 毫克/1 毫升支链淀粉和 1 毫克/1 毫升糊精溶液的制备；方法同上。

安培滴定装置(图 1)，由旋转铂电极，甘汞电极，微安表及微量滴定管组成。旋转铂电极由电动搅拌器和铂电极改装，将铂电极上端导线外皮剥开露出铜丝，套上铜管，焊接在一起，插入电动搅拌器孔内。用一有弹性的铜片将一块石墨电刷固定在铜棒上，使铂电极旋转不受阻碍，铂电极通过电刷联一导线接微安表正

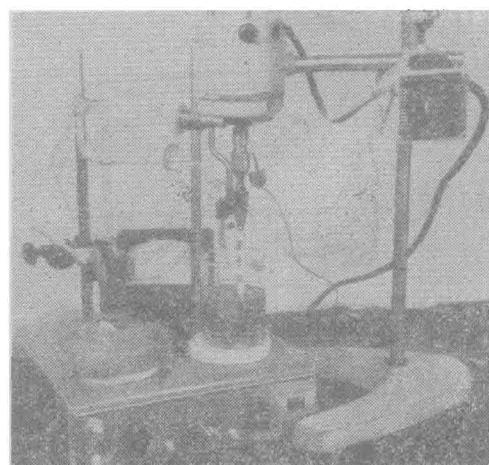


图 1 安培滴定装置

极，甘汞电极上端接负极，使电磁搅拌器与铂电极旋转方向相反，确保溶液搅拌均匀。如果用 DT-830 型液晶显示数字万用表代替一般的微安表，可将甘汞电极接线插头插入万用表的 COM 孔中，铂电极接头插入 mA 孔中，量程开关选择在 DCA 合适位置。



图1 质粒DNA粗制剂的琼脂糖凝胶电泳  
A: 未用RNA酶消化; B: 用RNA酶消化



图2 制备性电泳纯化质粒DNA的电泳图谱  
两侧的凝胶条用EB染色中间的宽幅凝胶未给染色

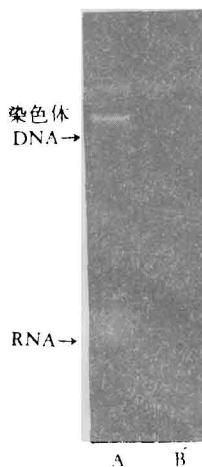


图3 用制备性电泳电泳洗脱和有机溶剂抽提得到的纯化质粒DNA  
A: 纯化前的粗制剂; B: 只含一个质粒的DNA纯化样品

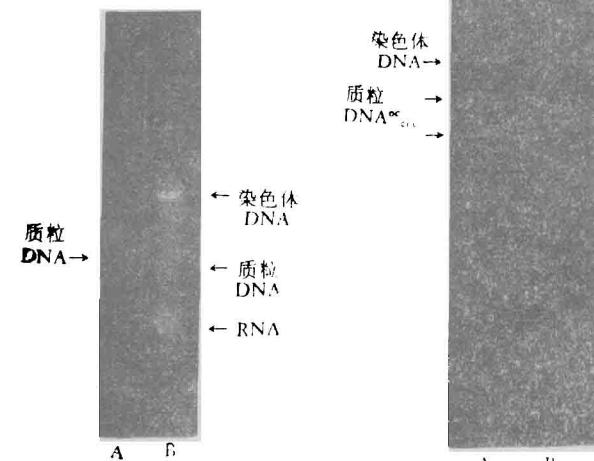


图5 用NaCl速度区带超离心法得到的纯化质粒DNA  
A: 纯化的质粒DNA  
B: 未纯化样品

马延高等“介绍一种阻蔽DNA片段和浓缩核酸稀溶液的方法”一文的图

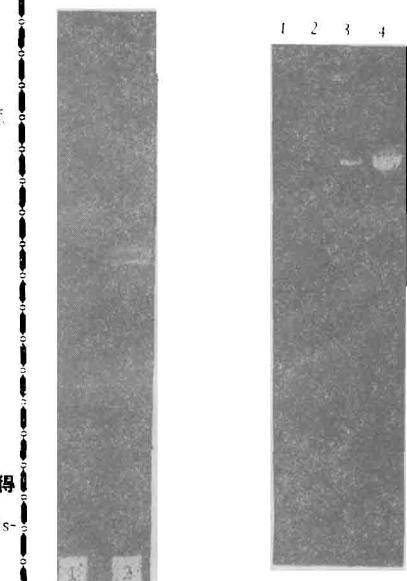


图6 用CsCl等密度超离心法得到的质粒DNA  
A: 从Bacillus thuringiensis Var israelensis 4Q2-22分离;  
B: 从Ecoli DFC138分离



图4 回收片段的再电泳

1. 为蓖麻蚕NPV-DNA(按文献[2]、[3]方法制备+Bgl II(上海东风厂或生物物理所生产),2、3、4、5分别为回收后再电泳的蓖麻蚕NPV-DNA+Bgl II的四个片段

图5 回收片段的再酶切

1. 蓖麻蚕NPV-DNA+Bgl II的第一个片段+EcoRI
2. 蓖麻蚕NPV-DNA+Bgl II的第二个片段+EcoRI

图6 稀核酸溶液的浓缩效果

操作: 取0.1 OD 260的家蚕NPV-DNA,先对流浓缓冲液充分透析后,取5ml,100V,电泳2小时后,于1,2,3,4,四个部分中分别取150,150,150,50μl,在0.7%的琼脂糖凝胶上电泳。