

一种简单快速回收 DNA 片段的方法

——DE-81 滤纸

王 华 岩 贾 锋

(北京农业大学动物生物化学教研室)

琼脂糖凝胶电泳对于快速分离不同分子量的 DNA 片段是极为有效的,但把 DNA 片段从凝胶中回收回来有时要碰到一些困难,如回收的 DNA 易受凝胶中硫酸多糖的污染(该成分是一些酶的抑制剂,如内切酶、连接酶、激酶、聚合酶等);大片段 DNA 回收效率低等。从凝胶中回收 DNA 的方法概括起来有:DEAE 纸片法,^[1,2]挖槽法,^[3]冻融法,^[4,5]低熔点琼脂糖法,^[6]透析袋法,^[7]玻璃珠或玻璃纤维法。^[7]在这些方法中,有的操作比较复杂费时回收效率低,有的易受硫酸多糖的污染,有的实验材料比较昂贵。

我们参照 Dretzen^[1]的方法,经过改进,采用 DEAE DE-81 滤纸片法回收 DNA 片段。本法材料简单,操作方便省时,回收效率较高。回收的 DNA 片段可以直接用于各种酶切反应和基因重组实验。

材 料 和 方 法

1. 将 DNA 片段转移到 DE-81 滤纸上

采用 0.7~1.5% 的琼脂糖凝胶,制胶时加入 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溴化乙锭(电泳后将凝胶在 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溴化乙锭溶液中染色也可以)。电泳后,在紫外灯下观察 DNA 片段分离情况(图 1a, 见封三)。用快刀片在 DNA 片段前沿切一条比 DNA 带稍宽的缝隙,将滤纸片插入缝隙(图 1b, 见封三)。继续电泳 10~20 分钟,然后在紫外灯下观察 DNA 片段是否已经进入滤纸(图 1c, 见封三)。

2. 从 DE-81 滤纸上回收 DNA 片段

当 DNA 片段全部转移到滤纸片上以后,取出纸片放入一干净的小离心管中,加入 200 μl 10mmol/L Tris/HCl pH7.5, 1mmol/L EDTA, 1mol/L NaAc 的洗脱液,在振荡器上混匀 30 秒钟,室温静置 20~30 分钟。向管中加入等体积酚/氯仿(1:1),离心后缓慢吸取上清液,有机相反抽提一次,合并两次水相,加入等体积水饱和乙醚抽提一次,除去残留的酚。用两倍体积乙醇沉淀 DNA,离心回收 DNA,再用 70% 乙醇冲洗 2 次,除去多余的盐。

结 果 和 讨 论

1. 为了测定 DE-81 滤纸回收 DNA 的效率,把 λ 噬菌体 DNA 用 Hind III 酶解, DNA 样品经电泳分离后,得到下述几个主要片段 23.1kb, 9.4kb, 6.6kb, 4.3kb, 2.3kb 和 2.0kb (图 1a, 见封三)。分别在这些片段的前沿插入 DE-81 滤纸回收 DNA 片段。回收效率见表 1。

表 1 DNA 片段回收率

片段 (kb)	上样量 (μg)	回收量 (μg)	回收率(%)
23.1	0.668	0.300	44.9
9.4	0.272	0.158	57.9
6.6	0.189	0.140	74
2.3	0.126	0.107	85.3

当被回收的 DNA 片段小于 2kb 时,用本方法回收 DNA 的效率一般可达到 80% 以上,这与文献中报道的结果一致。^[1]若想进一步提高 DNA 片段的回收率,可以延长洗脱液浸泡纸片的时间。

2. 以质粒 pUC19 DNA 为样品,分别用 DE-81 滤纸,新华滤纸, whatman 3MM 滤纸和硝酸纤维素滤纸进行电泳回收,结果见图 2(封三)。从图 2b 中可见,DE-81 滤纸基本上全部将 DNA 吸附在纸片上了,而其他三种滤纸只吸附了部分 DNA,大部分 DNA 则穿过滤纸,这说明 DE-81 滤纸对 DNA 有较强的吸附作用。经测定,这四种滤纸回收质粒 DNA 的效率分别为:DE-81 滤纸大于 70%,Whatman 3MM 滤纸为 50%,新华滤纸为 30%,硝酸纤维素滤纸不到 10%。在实验中我们发现,用 DE-81 滤纸回收 DNA 时,继续电泳时间不宜超过 30 分钟。因为当 DNA 转移到纸片上以后,继续电泳时间过长, DNA 会沿纸片缓慢上行,有时会造成 DNA 损失。

3. 采用 DE-81 滤纸回收 DNA 片段的纯度是可靠的,可直接用于各种分子生物学工作。本室使用这

用曙红 B 活体染色法区别大鼠死活精子

许 焯 黄桂芳 钱绍祯

(江苏省计划生育研究所)

在雄性生殖生理研究中,有人用曙红 Y-黑色素(eosin Y-nigrosin)活体染色法^[1,2]评价存活精子的百分率。此法可以判断人精子是否存活,但不适于大鼠精子的判断。

本文扼要介绍我们摸索的判断大鼠精子死活的一种染色方法。

用一针头从雄性大鼠附睾管中括取约 20 μ l 附睾液,置于盛有 1ml 台氏液的培养板孔内,37℃ 孵育 5—10 分钟后染色。

用红细胞吸管分别吸取 5% 曙红 B、20% 苯胺蓝和精子悬液各 5 μ l,各置于同一载玻片的不同部位。用细玻棒先将曙红 B 与精液混匀,然后再与苯胺蓝混匀后推片,以 15 秒钟内为宜,推片后立即在酒精灯上烤干。在 200—400 倍附有 OLYMPUS 牌 45-G533 绿色滤片的显微镜下观察,死精子头部染红色,活者不染色。

用以上方法处理人的精液,死精子染成深红色,活精子无色,较大鼠更易区别。

取 5 只成年雄性 SD 大鼠,将其附睾悬液置 37℃ 温浴不同时间后,再用上法染色计算活精子率,并与常

规观察活动精子的方法做比较(表 1)。结果孵育 5—10 分钟活精子率为 86.0%,活动精子率为 80.5%,表明常规方法观察的不活动精子约有 $5.5 \pm 0.91\%$ 为活精子,与文献报道的结果近似^[3]。表 1 还表明,随着温孵时间延长,活精子率及活动精子率均逐渐下降。

实验用具必须清洗干净,配制试剂的水质应以去离子水再经双蒸馏后使用,台氏液须新鲜配制,染液的用量和浓度尽可能精确,稍有偏差即可影响结果。提高曙红 B 的用量可使死精率上升;而提高苯胺蓝的用量,则死精率下降。经多方摸索,以上面所提出的用量和浓度为最理想。

用本法区分死活精子,主要是曙红 B 的作用,苯胺蓝仅用来衬托背景的对比性,故应先将精液与曙红 B 混匀,再与苯胺蓝混匀。滤色片的型号和精子悬液涂片的厚度也影响镜下分辨率。推片用的玻片的边和角均应磨光,以减少精子的损伤,否则也可影响实验结果。

镜下观察时常可见到一些头部稍稍红染的精子,我们认为这些是濒死的“临界”精子,但并非死精。这可能是由于质膜通透性已开始发生变化,这部分精子应归在活精之列。

表 1 曙红 B 活体染色活精子率与常规法活动精子率比较

孵育时间(分)	5—10	30	60
活精子%(n=10)	86.0 $\pm$ 6.1	82.8 $\pm$ 8.1	76.1 $\pm$ 5.5
活动精子%(n=10)	80.5 $\pm$ 6.1	73.8 $\pm$ 9.6	69.8 $\pm$ 9.2
孵育时间(分)	180	300	
活精子%(n=10)	72.3 $\pm$ 10.4	68.8 $\pm$ 10.0	
活动精子%(n=10)	65.5 $\pm$ 9.7	59.3 $\pm$ 9.2	

种方法制备的 DNA 片段,做了各种酶切、修补和基因重组反应,都得到了良好的效果。

参 考 文 献

- [1] Dretzen, G. et al.: *Anal. Biochem.*, 1981, 112, 295.
- [2] Banner, D. B.: *Anal. Biochem.*, 1982, 125, 139.
- [3] Yang, R. et al.: *Methods In Enzymology*, v. 68, Academic, New York, 1979, 176.

参 考 文 献

- [1] WHO. Laboratory Manual For The Examination of Human Semen and Semen-cervical Mucus Interaction, Press Concern Singapore 1980, 11.
- [2] Dougherty, K. A. et al.: *Fertil Steril.*, 1975, 26, 700.
- [3] Talbot, P. et al.: *The Journal of Experimental Zoology*, 1981, 215, 201.

[本文 1987 年 9 月 7 日收到]

- [4] Thuring, R. W. J. et al.: *Anal. Biochem.*, 1975, 66, 213.
- [5] Tautz, D. et al.: *Anal. Biochem.*, 1983, 132, 14.
- [6] Weislander, L.: *Anal. Biochem.*, 1979, 98, 305.
- [7] Vogelstein, B. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1979, 76, 615.

[本文于 1987 年 8 月 11 日收到]

王华岩等：“一种简单快速回收 DNA 片段的方法”一文的附图 1,2

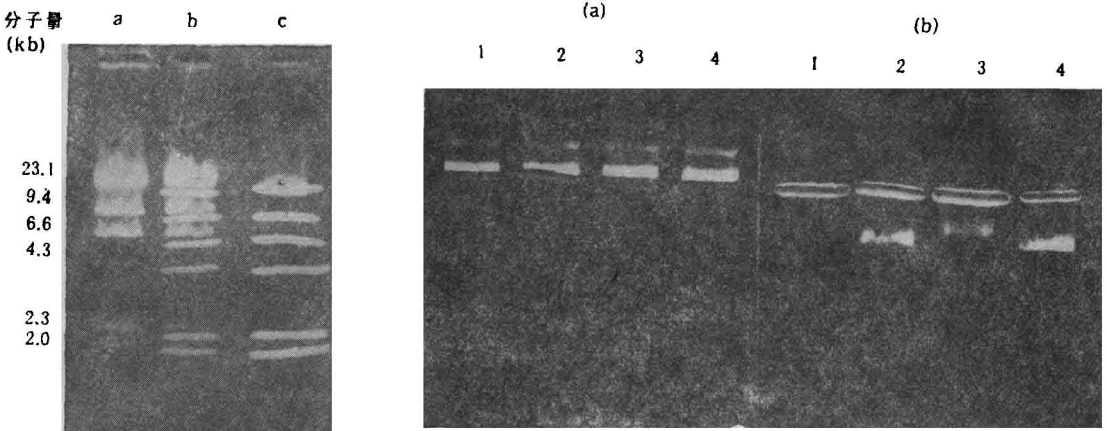


图 2 不同滤纸回收 DNA 的比较

(a) 质粒 pUC19 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离，三条带分别为超螺旋、线性和开环的质粒 DNA。将滤纸插入超螺旋带前沿。1—4 分别为 DE-81，新华滤纸，Whatman 3MM，硝酸纤维滤纸。
(b) 继续电泳 20 分钟后，四种滤纸吸附 DNA 的情况

图1 1.4 μ g DNA-HindIII 经 0.7%

琼脂糖凝胶电泳分离

a. 1.5 小时后 DNA 带分开；b. 把 DE-81 滤纸片插在 DNA 带前；
c. 继续电泳后 10 分钟，DNA 转移到滤纸上

(上接中文总目录)

胶原水解液的氨基酸分析……………张林生等 (469)
饭豇豆凝集素等电点的快速测定……………赵永芳等 (470)

简 报

肌酸激酶变性失活的关系……………刘国华等 (74)
磁处理水对预防血细胞聚集的研究……………王 健等 (160)
计算蛋白质可及性的一种新方法……………温元凯等 (234)
单链核酸分子二级结构图的计算机绘制……………何东明等 (236)
用限制性内切酶 HaeIII 进行绦虫染色体 G 分带的研究……………刘国章等 (237)
胰岛素和肾上腺素对家兔血浆及组织 cAMP 和 cGMP 含量及代谢的影响……………彭 腾等 (317)
用氨基酸分析仪测定茶氨酸……………李布青等 (472)
NMU 诱发大鼠乳腺癌……………周惠人等 (473)

其 它

全国“生物膜与疾病”专题讨论会在京召开…………… (22)

关于生物物理学名词(第一批)征求意见的通知……………
……………生物物理学名词审定委员会 (75)
金属络合物和 DNA 的反应……………徐万祥等 (80)
首届国际神经网络学术会议已于 1987 年 6 月在圣迭戈举行…………… (94)
自抽连续液/液离心分离机…………… 金绿松等 (238)
参加第 11 届国际神经化学会和第 18 届美洲神经化学会联合会议见闻……………薛启冀 (239)
第二届中日双边生物物理学学术会议在日本京都召开…………… (311)
反义寡聚脱氧核糖核苷酸对 P21 合成的抑制作用 ……
……………刘景梅 (319)
麻省理工学院生物信息处理中心简介……………
……………姚国正等(第 4 期封三)
胰岛素受体的蛋白工程……………王志珍 (474)
人尿中微量甲苯丙胺的抽提……………封 勇 (410)
第五届国际镁学术会议在日本京都召开…………… (475)