

从凝胶中回收 DNA 的一种简便方法

吴芝清 宋陆铨 任向宇

(河北大学生物工程研究所,保定)

关键词 DNA 纯化, DNA 重组, 凝胶电泳

从凝胶中回收 DNA 的方法已见多种报道, 其中的电洗脱法^[1-6]较实用, 已有几种装置作为商品出售。Wu 等^[1]的方法无须任何专门设备, 而是在 DNA 电泳区带前方挖槽, 槽内嵌半透膜, 使样品自凝胶泳入槽内的缓冲液中。该方法说来简单, 实际操作却很费劲, 尤其在样品数量大或重复操作时, 更觉不便。我们按照 Wu 等的工作原理, 制成一种电洗脱器, 可使 DNA 的回收操作变得简单而高效。

一、材料与方法

1. 材料 λ DNA、 λ DNA/Hind III (DNA 分子量标志物), 中科院生物物理所产品; Hind III (限制酶), 医科院基础医学所产品; 琼脂糖, Serva 产品。

2. 方法 对 DNA 的各种处理, 除另有说明者外, 全部按文献[7]推荐的有关方法。

二、结果与讨论

1. 洗脱器 洗脱器用有机玻璃等材料制成, 一个洗脱器上可设多个洗脱室。洗脱室为前后封有半透膜的小室, 由洗脱器架(图 1(a))与前后两片夹板(图 1

(b))围成, 半透膜夹在洗脱器架与夹板之间, 用橡皮筋(由乳胶管剪成)把它们紧固在一起。组装成的洗脱器如图 2 所示。

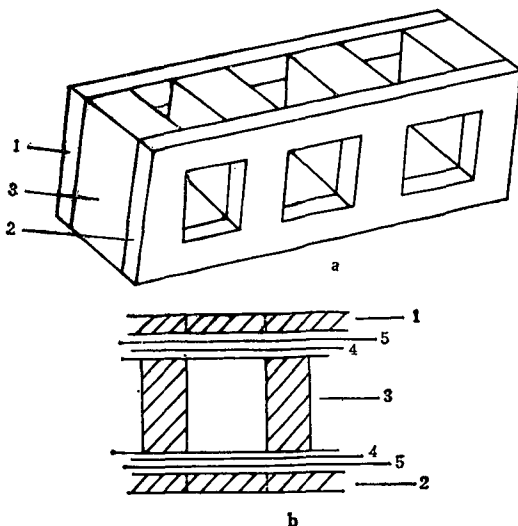


图 2 洗脱器结构的示意图

(a) 结构示意图 (b) 组装示意图(顶视)

1、2. 夹板 3. 洗脱器架 4. 半透膜(取自透析袋)

5. 蜡膜, 形状与夹板相同

根据不同的工作需要, 洗脱器可作成不同大小和不同的几何形状, 其横截面可为正方形、长方形或等腰梯形。洗脱器的外部尺寸以能放进作凝胶电泳的电泳槽为宜, 这样电洗脱便可使用原有的电泳装置。这种洗脱器结构简单, 一般实验室皆可自制。在制作时洗脱器接触半透膜的各个平面要求尽量平整, 组装时再涂上凡士林少许, 或垫上一层蜡膜(parafilm), 可防止洗脱室漏水。为避免半透膜干裂, 组装好的洗脱器最好保存于 TAE 缓冲液^[7]中。

2. DNA 样品的电泳分离 以水平式琼脂糖凝胶电泳法分离 DNA。使用 TAE 缓冲液制胶和电泳, 琼脂糖浓度为 0.7%, 胶层厚 4.5mm, 电场强度 5V/cm。电泳毕以溴化乙锭(EtBr) (5 μ g/ml) 染色, 于紫外灯(365nm)下将欲回收的 DNA 电泳区带自凝胶切出。

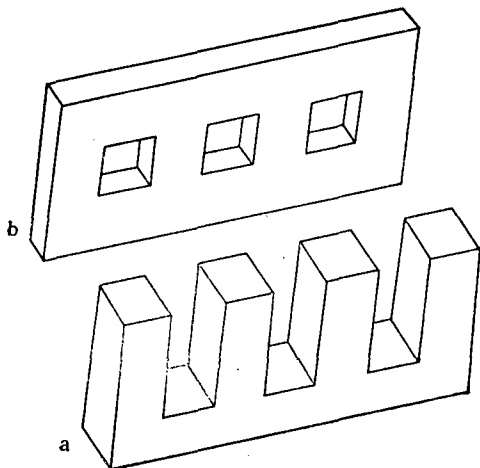


图 1 洗脱器的主要零件

a. 洗脱器架, 由有机玻璃块粘合而成;

b. 夹板, 共两块, 由有机玻璃板挖孔制成

3. DNA 样品的电洗脱回收 将洗脱器放入电泳槽,把待回收的 DNA 胶块置于洗脱室靠近阴(电)极一侧窗口处,调整洗脱室内液面使与外界缓冲液的液面一致后,以 5V/cm 电场强度进行电泳洗脱。在紫外灯下可监视被 EtBr 染色的 DNA 自凝胶块泳出的全过程, DNA 泳出后将集中于洗脱室阳(电)极端窗口附近的缓冲液中。在电泳过程中,部分 DNA 会吸附于阳极窗口的半透膜上,故电洗脱停止后应立即倒换电极反洗 30—60 秒。反洗后把洗脱室内的液体吸出,离心甩掉可能混入的琼脂糖碎胶块,上清液即为回收到的 DNA 粗溶液。该液以等体积异戊醇抽提,可把与 DNA 结合的 EtBr 洗入有机相。

4. 本方法回收率的测定 λ DNA 经限制酶 Hind III 切割后,可产生分子链长已知的一系列 DNA 片段(23.1、9.4、6.6、4.4、2.3 及 2.0kb),我们以电泳法将它们分离制备出来作为样品,对本方法的电洗脱回收率进行了测定。

每个样品皆定量上样,使走入凝胶中。为了测定方便,电泳后仅将作为 DNA 分子量标志的胶条切出作 EtBr 染色,按其标示的位置将含有样品的凝胶块切出,按上述方法回收 DNA,所得结果列为表 1。表 1 中 DNA 的量以换算为等体积溶液的 O.D₂₆₀ 值表示,为三次的平均值。

一般认为,随着 DNA 分子量增大,样品从凝胶中洗脱的回收率显著降低,当 DNA 片段大于 20kb 后,回收率很少能高于 20%^[7]。由表 1 的数据看, DNA 分子量在 2.0—23.1kb 范围内,本方法的回收率大致相同,平均为 87.6%。

5. 回收的 DNA 是否可被限制酶切割 绝大多数不同级别的琼脂糖中杂有硫酸盐多糖,它们是多种以 DNA 为底物的酶(如限制性内切酶、连接酶、激酶、聚合酶等)的强抑制剂。用琼脂糖凝胶回收 DNA,样品中就可能混入该种抑制剂,而影响其在基因克隆操作

表 1 电洗脱回收率的测定数据

样品 (DNA 分子链长, kb)	上样量 (O.D ₂₆₀)	回收量 (O.D ₂₆₀)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
23.1	0.072	0.070	97.2	87.6±6.9
9.4	0.048	0.040	83.3	
6.6	0.060	0.055	91.7	
4.4	0.028	0.024	85.7	
2.3 和 2.0	0.020	0.016	80.0	

中的使用。我们将 λ DNA 走入凝胶,再按上述方法进行回收作为样品,分为三份,分别进行如下处理:

- (1) 乙醇沉淀,之后将沉淀溶于 TAE 缓冲液;
- (2) 酚抽提,所得水相以乙醇沉淀,沉淀溶于 TAE 缓冲液;
- (3) 酚抽提两次,所得水相作乙醇沉淀,沉淀溶于 TAE 缓冲液。

经上述处理的各 DNA 样品,分别进行 Hind III 酶切,电泳检查看到,以本方法回收的 DNA 经两次酚抽提后,便可被限制酶切割,可用于重组 DNA 的各种工作。

参 考 文 献

- 1 Wu Ray *et al.* *Method in Enzymology* (Wu R ed.), New York; Academic Press, 1979; 68: 176
- 2 Smith N O. *Method in Enzymology* (Grossman L, Moldave K eds), New York; Academic Press, 1980; 65: 371
- 3 Dretzen G *et al.* *Anal Biochem*, 1981; 122: 295
- 4 David B D. *Anal Biochem*, 1982; 125: 139
- 5 Zassenhaus H P *et al.* *Anal Biochem*, 1982; 125: 125
- 6 马延高等. 生物化学与生物物理进展, 1985; (1): 73
- 7 Maniatis T *et al.* *Molecular Cloning*, New York; Cold Spring Harbor Laboratory, 1982: 156, 164

[本文于 1989 年 2 月 20 日收到]