

一种简便的噬菌体 λ DNA 纯化方法

叶盛钰 李其梁 沈思祥 严佩芳 周兵 吕幼仪

(中国科学院上海生物化学研究所)

随着核酸第二类限制性内切酶的发现和使用, DNA 结构和功能研究及遗传工程取得了飞速的进展。我们实验室为筛选一些限制性内切酶需要有一定纯度的、大小适合的 DNA 作为底物, 噬菌体 λ DNA 是合适的底物之一。目前国内制备噬菌体 λ , 一般都采用氯化铯密度梯度超离心法^[1], 耗费比较昂贵, 国内有些实验室也受条件限制。因此, 我们发展了一种较为简便的分离纯化噬菌体 λ DNA 的方法, 适用于我们实验室筛选限制性内切酶的工作。我们并用它作了一些已知限制性内切酶(如 EcoRI、AluI 和 HhaI 等)的酶解图谱, 与文献报道的结果一致^[2,3,4]。

材料和方法

1. 菌株 噬菌体 λ 溶原性大肠杆菌即 *E. coli* 225 (λ c1857 sam7)。

2. 培养基 蛋白胨 1%; 酵母浸出汁 0.5%; 氯化钠 0.5%; 葡萄糖 0.2%, 氢氧化钠调 pH 至 8.0。15 磅灭菌 20 分钟。

3. 限制性内切酶 EcoRI 按 J. Sumegi 等^[5]方法制备, AluI 按 R. J. Roberts 等^[3]方法制备, HhaI 按沈思祥等^[6]方法制备。

4. 酶解图谱 酶解基本上按 Greene 等^[7]的条件, 在 37°C 保温一定时间后加等体积溴酚兰溶液(50 mM EDTA Na₂, 30% 蔗糖, 0.05 溴酚兰)停止反应。反应液全部转到 1.0% 或 1.5% 琼脂糖(Agarose)凝胶柱上[1.0 克或 1.5 克 Agarose 在 100 毫升电泳缓冲液(89 mM Tris, 89 mM 硼酸, 2.5 mM EDTA Na₂, 含 0.5 微克/毫升溴化乙锭)溶解后注入玻璃管中成胶], 200 伏电泳走 2—3 小时, 取出胶在紫外灯下观察或

照相。

5. 纯化方法 *E. coli* 225 (λ c1857 sam7) 在上述培养液中 32°C 培养过夜(A_{650} 毫微米达 1.5 左右), 次日用新鲜培养基扩大 20 倍, 然后 32°C 培养 1 小时(A_{650} 毫微米达 0.3 至 0.4), 接着在 45°C 水浴中热诱导 15 分钟, 再转入 37°C 继续培养 3 小时(A_{650} 毫微米达 0.8 左右)。4°C、6000 转/分离心 20 分钟收集菌体, 将菌体(一升培养液得菌体约 2.5 克)悬浮于 50 毫升 SM 缓冲液(0.05M NaCl, 0.01M MgSO₄, 0.02M Tris-HCl, pH 7.5)加氯仿至 2%, 然后在 37°C 轻微摇动维持 15 分钟使溶菌。再用牛胰核糖核酸酶(0.1 毫克/毫升, 东风厂产)及 DNase II(0.1 毫克/毫升, Serva 产)37°C 处理 1 小时。4°C、4,000 转/分离心 20 分钟, 去菌体残片。取上清液, 加氯化钠至 3%, 聚乙二醇 6000 至 8%, 置冰箱过夜。4,000 转/分离心 20 分钟收集沉淀, 悬浮于少量(每升菌液用 3 至 5 毫升)含 10 mM MgCl₂ 的 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 缓冲液中, 4,000 转/分离心 10 分钟, 取上清加蔗糖至 20%, 上琼脂糖凝胶(Sephase 2B)柱(预先用 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7.5 缓冲液平衡), 用相同的缓冲液洗脱, 洗出液第一个峰即噬菌体 λ 。

噬菌体 λ 用水饱和酚(用 Tris 调 pH 至 8.0)抽提二次, 氯仿: 异戊醇(24:1)抽提一次, 乙醚抽提二次、水相减压浓缩后对 10 mM NaCl、10 mM Tris-HCl, pH 8.0 透析, 即得噬菌体 λ DNA。其浓度由 A_{260} 及荧光分析法^[8]测定。

结果与讨论

溶原性大肠杆菌热诱导使阻遏蛋白 cI 失

活,原噬菌体就进入裂解周期,即原噬菌体从大肠杆菌染色体上割离下来,它的DNA进行自主复制,形成噬菌体。此热诱导温度需控制在42—45℃,超过45℃噬菌体产量明显下降^[9]。

取得溶菌清液后,可用 *E. coli* 266 作指示菌,计数噬菌斑,以测定其效价。若此时噬菌斑达 10^{12} , 则原每立升菌液可得毫克水平的 λ DNA。若效价太低,则得量太少。

用聚乙二醇 6000 沉淀浓集噬菌体 λ 时,我们比较了 4% NaCl、14% 聚乙二醇 6000 与 3% NaCl、8% 聚乙二醇 6000 二种条件。用后一种条件既达到浓集噬菌体 λ 的目的,又使沉淀中被牛胰 RNase 和 DNase II 降解的大肠杆菌的 RNA 和 DNA 片段较少。利于进行琼脂糖柱 (Sephacose 2B) 过滤,琼脂糖柱能进一步把噬菌体 λ 和小分子的 RNA 与 DNA 片段完全分开 (图 1)。

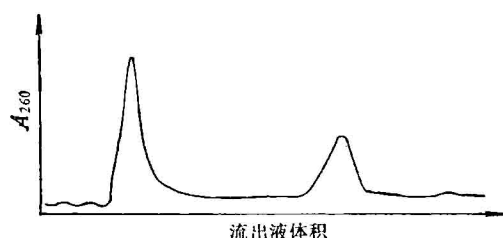


图 1 溶菌清液琼脂糖 (Sephacose 2B) 凝胶过滤紫外吸收分布曲线

溶菌清液聚乙二醇沉淀之悬液上于 Sepharose 2B 柱 (1.0 cm $\times$ 95 cm), 以 10 m M MgCl₂, 10 m M Tris-HCl, pH7.5 缓冲液洗脱, 第一峰为噬菌体 λ , 第二峰为降解之 RNA、DNA 等。

这样所得的噬菌体 λ , 经酚抽提除去蛋白质后,得到的 DNA 在 1% Agarose 凝胶柱上电泳呈一条窄带 (图 2a)。紫外吸收光谱在 258 毫微米为波峰, 230 毫微米为波谷。用溴化乙锭荧光分析法测定含 DNA 量达 95% 以上。(荧光测定液用 RNase 处理前后, 荧光强度不变, 证明无明显 RNA 存在)。

用核酸限制性内切酶 EcoRI、HhaI 和 AluI 酶解后电泳所得图谱同文献报道^[2, 3, 4] 结果一致。



图 2 噬菌体 λ DNA 及其内切酶 EcoRI, HhaI 和 AluI 酶解产物的琼脂糖 (Agarose) 凝胶电泳图

a. 噬菌体 λ DNA; b. 噬菌体 λ DNA 的内切酶酶解产物 (1) λ DNA + EcoRI; (2) λ DNA + HhaI; (3) λ DNA + AluI; c 与 b 对应的文献结果: (1) λ DNA + EcoRI, 录自文献 2, 图 IV, a; (2) λ DNA + HhaI, 录自文献 4, 图 3 (1); (3) λ DNA + AluI 录自文献 3 图 2 (1)。

综上所述, 用这样的简便方法得到的噬菌体 λ DNA 纯度比较高, 从限制性内切酶酶解图谱说明, 筛选内切酶时用它作为酶的底物是完全可以满足要求的。

参 考 文 献

- [1] Berkner, K. L. and Folx, W. R.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 3176, 1977.
- [2] Thomas, M. and Daris, R. W.: *J. Mol. Biol.*, **91**, 315, 1975.
- [3] Roberts, R. J.: *J. Mol. Biol.*, **102**, 157, 1976.
- [4] Roberts, R. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, **103**, 199, 1976.
- [5] Sumegi, J. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 78, 1977.
- [6] 沈思祥等: 《中国科学》, 待发表。
- [7] Greene, P. J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **5**, 2373, 1978.
- [8] Le Pecq, J. B. and Paoletti, C.: *Anal. Biochem.*, **17**, 100, 1966.
- [9] Miller, J. H.: *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, 319, 1972.

[本文于 1979 年 6 月 12 日收到]