

简报

一种从培养细胞中分离高分子量 DNA 的有效方法

董 明

静国忠

(卫生部北京生物制品研究所) (中国科学院生物物理研究所, 北京)

关键词 培养细胞, DNA

简便快速地分离高分子量 DNA 技术, 无论对核酸分子生物学基础研究还是对重组 DNA 研究都是十分必需的。Blin 和 Stafford^[1] 报道了从组织培养细胞中分离高分子量 DNA 的方法, 此方法步骤繁杂, 包括酚、氯仿等有毒溶剂抽提、RNase 处理、较长时间反复透析乃至长时间氯化铯梯度离心等, 所得样品经乙醇沉淀后往往溶解度偏低。但由于此法确能得到较高分子量的 DNA 制品, 所以沿用至今。近年来由于 DNA 指纹图谱广泛用于对不同物种及细胞系进行遗传分析, 更需要建立快速可靠的 DNA 分离技术, 因此从不同生物样品中分离 DNA 的方法相继问世。Bahnak、Petrukhin、Dry、Signer 及 Miller 等人分别报道了从哺乳动物精子^[2]、冷冻组织^[3]、绒毛膜^[4]及血细胞^[5,6]等样品中提取 DNA 的方法。除 Miller 外, 所有这些方法虽然避免了酚、氯仿等有毒溶剂抽提步骤, 其不足之处是仍需长时间梯度离心并且产率偏低。

本文报道利用盐析-乙醇沉淀法^[7]从组织培养细胞中快速分离高分子量、高纯度 DNA 样品的简便有效方法。

材 料 和 方 法

一、兔肾细胞的培养与制备

取乳兔肾经胰蛋白酶消化后接种于 HD 培养基 (卫生部北京生物制品所配制) 的克氏瓶内 (15×9.5 cm), 37℃ 培养 48 小时, 两瓶培养细胞经胰酶消化后, 悬浮于 10ml 细胞裂解液 (10mmol/L Tris-HCl, 400 mmol/L, 2mmol/L Na₂EDTA pH8.2) 中, 悬液在 4℃ 经 2000r/min 离心十分钟, 弃去上清, 将细胞重悬于 3ml 的细胞裂解液中, 计数细胞备用。

二、DNA 的分离

将 0.2ml 10% SDS (购于华美生物工程公司) 及 0.5ml 蛋白酶 K (2mg/ml 溶于 1% SDS, 2mmol/L Na₂EDTA 中, 系 Cal Biochemical Boehringer Corp 产品) 立即加入到上述 3ml 细胞悬液中, 37℃ 保温过

夜, 然后加 1ml 饱和的氯化钠 (约 6mol/L) 溶液, 剧烈振荡 15 秒后, 在 4℃, 2500 r/min 离心 15 分钟, 小心地将上清移到另一干净试管中 (切勿吸走管底的蛋白质沉淀), 在室温下 (20—25℃) 加入二倍体积的无水乙醇, 轻轻地翻转试管至 DNA 纤维析出, 将沉淀搅到灭过菌的玻璃棒或塑料尖头上, DNA 样品溶解到 TE 缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl, 0.2mmol/L Na₂EDTA pH 7.5) 中。DNA 的纯度通过 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值及 0.3% 琼脂糖电泳测定, 产率按公式 A₂₆₀×50×稀释倍数=mg/ml 计算。

三、DNA 的限制内切酶酶解

上述 DNA 样品 (3.5 微克) 经 EcoRI (80 单位), HindIII (10 单位), BglII (5 单位) (限制内切酶购于 Boehringer Mannheim, 反应缓冲液按其处方配制) 酶解, 反应体积为 30 微升, 37℃ 保温过夜, 酶解后在 0.7% 的琼脂糖凝胶上电泳。

结 果 和 讨 论

1. 利用盐析-乙醇沉淀法从培养细胞中分离出高分子量、高纯度的 DNA。0.3% 琼脂糖凝胶电泳 (图 1) 的结果指出, 其主体部分分子量大于或相当于噬菌体 λDNA。从 0.7% 琼脂糖凝胶电泳 (图 2) 的结果指出, 用此法制备的 DNA 样品只有少量 RNA 污染。几次制备样品的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值都近于 2.0, 说明用盐析法能有效地从细胞裂解物中除去蛋白质。用此法从培养细胞中制备 DNA 产率可达 800 微克/2×10⁶ 细胞。

2. 用此法所得的 DNA 样品溶解度高, 在 37℃ 二小时可使 DNA 完全溶解在 TE 缓冲液中。

3. DNA 样品的 EcoRI、HindIII、BglII 等限制内切酶酶解图谱 (图 2) 指出, 用此法制备的 DNA 可分别被需高、中、低盐浓度的各类限制内切酶酶解, 说明用盐析法制备的 DNA 样品无氯化钠污染。

4. 培养细胞在细胞裂解液中放置过久, 细胞容易



图 1 0.3% 琼脂糖凝胶电泳图谱

1. 从兔肾细胞制备出的 DNA 样品
2. 完整的噬菌体 λ DNA

裂解而影响 DNA 的回收率。在制备细胞时可用等渗生理盐水洗细胞，经离心后再悬浮于 3 毫升的细胞裂解液中。

5. 我们还从人胚肺二倍体传代细胞中提取高分子量 DNA。值得指出的是，如果所用的细胞量过少，加入无水乙醇后可能看不到 DNA 纤维析出，在 4℃，15000r/min 离心 15 分钟回收 DNA 沉淀，可以得到满意的结果。此方法简便快速，适用于从各种培养细胞中提取高分子量 DNA。

参 考 文 献

- 1 Blin N, Stafford D W. *Nucleic Acids Res*, 1976; 3:

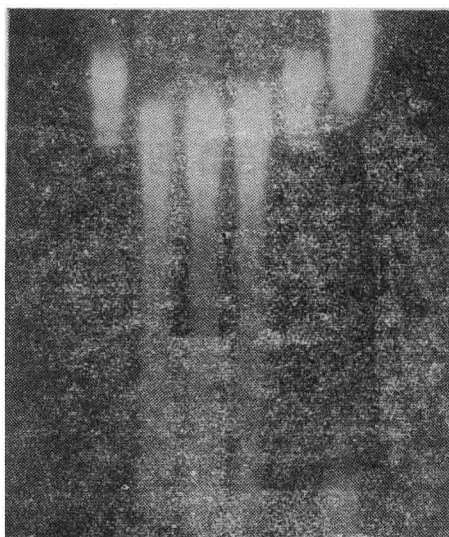


图 2 0.7% 琼脂糖凝胶电泳图谱

- 1,5: 噬菌体 λ DNA Hind III 酶解图谱(分子量标准)
- 2,3,4,6 分别为兔肾细胞 DNA EcoRI, HindIII, BglII 酶解图谱及兔肾细胞 DNA。

- 2303
- 2 Bahnak B R, Wu Q Y *et al. Nucleic Acids Res*, 1988; 16: 1208
- 3 Petrukhin K E *et al. Nucleic Acids Res*, 1988; 16: 5698
- 4 Dry P J. *Nucleic Acids Res*, 1988; 16: 7730
- 5 Miller S A *et al. Nucleic Acids Res*, 1988; 16: 1212
- 6 Signer E *et al. Nucleic Acids Res*, 1988; 16: 7738

[本文于1989年4月14日收到]



氨化秸秆制饲料、肥料技术

目前,我国肥料、饲料资源紧缺,充分利用农副产品废弃物及工厂废弃物制取肥料、饲料,社会效益和经济效益十分显著。本技术是通过氨化反应,使植物中的纤维转化为易被禽畜和农作物吸收的糖类和蛋白质等。本项目被农业部列为八九年重点推广的十项新技术之一。建厂房需 100 平方米,主要设备有造粒机等,预计投产时间半年左右。培训费:面授 500 元;函授:单位 200 元,个人 100 元。

[北京市星火技术研究所,北京 867 信箱 20816 组,邮政编码 100024,李 群]