

## 改良质粒快提法及其在酶切检查中的应用

杨于军 周辰 A. JONG\*

(解放军第一军医大学,广州)

**关键词** 质粒,限制性内切酶,电泳,基因重组

基因重组后,从转化的细菌中快速提取小量质粒作限制性酶切检查,以筛选出阳性克隆,现已成为分子生物学实验的一项常用技术,至今已建立了多种方法<sup>[1-4]</sup>。目前常用的为碱法和煮沸法。虽然现今所用的最新方法比传统的方法大大简化,但仍然相当耗时,即使是一个熟练的技术人员,提取获得18—24个样品仍需约2.5—3小时<sup>[2]</sup>,这还不包括酶切、电泳等步骤。此文介绍我们改良的快提法,此法可在10分钟之内迅速有效地提取质粒,结合改进随后的酶切、电泳等过程,即可在三小时内筛选18个样品。

### 材料和 方法

#### 一、试剂、溶液

TENS 溶液: 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA (即 TE 缓冲液), 0.1 mol/L NaOH 和 0.5% SDS。

限制性内切酶及酶切缓冲液购自 BRL, 琼脂糖购自 FMC corporation。

#### 二、质粒提取

1. 接种单一克隆在 1.5—3ml 培养液中, 37°C 振荡培养过夜。

2. 取 1.5 ml 新鲜菌液, 置离心管中, 高速台式离心机, 14000 r/min, 离心 10s。

3. 倒掉上清(留下 25—50 μl), 然后在微量振荡器上振荡约 10s 充分悬起细胞。

4. 加入 300 μl TENS 溶液, 振荡 5—10s 至溶液变粘稠即可, 不可太长。

5. 加入 150 μl 醋酸钠溶液 (3.0 mol/L, pH 5.2), 振荡 3—5s, 可见絮状沉淀, 14000 r/min, 离心 2—3min, 沉淀细胞碎片及染色体 DNA。

6. 将上清液 (含有质粒 DNA 及 RNA) 倒入另一小离心管中, 加入 1ml 预冷到 -20°C 的 95—100% 乙醇, 与上清液充分混匀, 14000 r/min, 离心 2 min, 此时可见白色沉淀。

7. 倒掉上清, 用 70% 乙醇淋洗沉淀二次, 真空抽干 2—3 min。

8. 将沉淀溶于 20—50 μl TE 缓冲液或消毒蒸馏水中。

#### 三、酶切消化

取 1—5 μl 样品液, 与 1 μl 10 倍浓酶切缓冲液, 1 μl RNase (5—10 mg/ml), 2—4 单位限制性内切酶及适量的蒸馏水混合, 总体积 10 μl, 37°C 水浴酶切 30—40min。实际应用时常需筛选 10 个以上样品, 此时可先计算各成分所需的总量, 然后将除样品液以外的各成分混合, 每管分装适量, 然后与样品液混合使成每管总体积 10 μl, 这样可大大节省时间, 特别是可以节省限制性内切酶, 因为每管直接分装 2—4 单位 (通常是 0.2—0.4 μl) 是非常困难的, 常因适当多取而造成浪费。

#### 四、电泳检测

用琼脂糖凝胶电泳检测。在铺胶时按 25ml 凝胶加 5—10 μl 菲啶溴红 (1mg/ml) 的比例混合。加样后随检测片段的大小不同, 电泳 10—40 min, 即可在紫外灯下直接观察结果, 必要时照相备查。

### 结果与 讨论

本文介绍的方法是在原碱法快提<sup>[2,3]</sup>的基础上作了以下改进: ①用 TENS 溶液代替原裂解细胞使用的两种溶液, 一次加入使细胞裂解, 释出质粒 DNA。②用醋酸钠代替醋酸钾中和氢氧化钠及提供随后沉淀质粒所需的离子浓度。③省略用溶菌酶及酚-氯仿抽提等步骤。④可省去加入溶液之间存放时间。

经过以上改进, 本法具有以下特点: (1) 快速, 10—15 分钟内即可完成。随着提取样品增多, 需要时间较长, 但在 40 分钟内仍可完成 18 个样品的提取。(2) 产量高, 从 1.5 ml 过夜菌液提取获得的质粒可满足 10—20 次酶切消化之用。(3) 经济、简单, 只需 TENS 和醋酸钠两种溶液, 均可事先配制, 在室温下完成, 而且不需临用前配制溶菌酶, 准备沸水浴等工作, (下转第 325 页)

\* Division of Hematology·Oncology Children Hospital of Los Angeles.

表2 稳定性实验结果

T	0.5s	5s	10s	1.5 min	40min	1.5h	16h	17h
mV	949	949	949	950	951	951	951	951

液后 0.5s 内即达恒定, 17h 内仍保持稳定, 见表 2。

四、在生物及医学上的应用

1. 用 H<sup>+</sup>-ISFET 测定 10 例铅中毒患者尿样品的

表3 铅中毒患者尿样品 pH 值

尿样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	均值	标准差	P 值
H <sup>+</sup> -ISFET 法 (x)	5.85	5.66	5.37	5.93	5.68	5.97	6.38	5.52	6.12	5.60	5.81	0.30	
玻璃电极法 (y)	5.93	5.72	5.41	6.03	5.76	6.06	6.52	5.69	6.25	5.79	5.92	0.32	
差数 (d=y-x)	0.08	0.06	0.04	0.10	0.08	0.09	0.14	0.17	0.13	0.19	0.11	0.02	<0.01

2. 测定了 34 例正常人尿液 pH 值。用 H<sup>+</sup>-ISFET 法, 其均值为 6.11, 标准差为 0.57。用玻璃电极法, 其均值为 6.24, 标准差为 0.59。每个样品用 H<sup>+</sup>-ISFET 法所得结果均比电极法低, 两方法差数的均值为 0.13, 差数的标准差为 0.07, 经平均差数的显著性检验, P<0.01, 有极显著差异。两方法的相关系数 r = 0.9688, 说明 H<sup>+</sup>-ISFET 法与原玻璃电极法测定结果呈正相关, 而且关系十分密切, 同时 H<sup>+</sup>-ISFET 对氢离子更为敏感。

3. 用 H<sup>+</sup>-ISFET 测定铅中毒大鼠血液 pH 值, 全血 pH = 7.53, 血浆 pH = 7.85。

4. 用 H<sup>+</sup>-ISFET 测定生物膜提取液(镍中毒红细胞 NaKATP 酶提取液) pH = 10.22。

以上结果表明, H<sup>+</sup>-ISFET 器件各项性能良好, 可在有复杂成分并存的尿液、血液及生物膜提取液等

(上接第 326 页)

提取过程可随时开始。(4)结果可靠, 图 1(见封二)显示了三种不同方法提取的质粒经酶切后的电泳图谱。用改良快提法获得的质粒, 其纯度及产量均与碱法及煮沸法相似, 甚至更好。

用改良快提法获得的质粒可满足不同酶切条件的需要。用快提法所得质粒作酶切检查常会遇到切不开的现象, 尤其是用低盐缓冲液限制性内切酶更是如此<sup>[2]</sup>。为此对改良快提法所得质粒进行不同酶切检查, 结果显示, 无论是高盐浓度 (React 3)、中等盐浓度 (React 2) 还是低盐浓度 (React 1), 甚至在某些含特殊离子的缓冲液 (React 4 和 React 6) 中, 相应的酶都显示理想的酶切效果(图 2, 见封二)。这表明, 改良快提法所得质粒可满足不同酶切条件的需要。

本文介绍的改良快提法及在酶切、电泳过程中的某些改进, 可在三小时内完成至少 18 个样品的筛选工

pH 值, 并与 231 型玻璃电极比较, 两方法相关系数 r = 0.9936, 结果见表 3。实验结果表明, 用 H<sup>+</sup>-ISFET 测得每个样品的 pH 值都比用玻璃电极的结果低, 平均低 0.11 pH, 经平均差数显著性检验, P<0.01, 表明两方法有极显著差异, 可能是由于 H<sup>+</sup>-ISFET 对氢的敏感性比玻璃电极对氢的敏感性更强所致(同样氢离子浓度的条件下, 测得 pH 值越低, 说明酸度越大, 即能被器件测到的氢离子越多)。

生物医学材料中得到满意的测试结果。由于 pH 值与许多生化反应有关, 所以可广泛用于多学科的研究中。又由于体积小、伸入被测液的尖端芯片仅 0.8mm 宽, 包括外封装仅 2mm 宽, 特别适用于体积小的标本测试。并可不经活化, 不用外加电源, 直接测试。且携带方便, 有较好的实用价值。此外, 该器件将来可进一步制成针尖形, 从而为实现直接植入人体进行整体生化动态观察创造条件。

参 考 文 献

- 1 Chauvet F et al. *Sensors and Actuators*, 1984; 6 (4): 255
- 2 輕部征夫. センサ技術, 1983; 3(12): 43

[本文于 1989 年 5 月 11 日收到]

作。图 3(见封二)显示了一次实验的结果。若加上细胞生长 5—6 h, 也可在接种当天(共 9 h)获得结果。

本文承蒙徐铃教授指导帮助, 特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Mariatis T, Fritsch E T et al. *Molecular cloning: A laboratory manual*, New York: Cold Spring Harbor, 1982
- 2 Karen Lech, Roger Brent. In: Freulerick M et al. ed, *Current protocols in molecular biology*, New York: John Willey and Sons, 1987: 161—164
- 3 Alter D C, Subramanian K N. *Biotechniques*, 1989; 7 (5): 456
- 4 Windle B E. *Biotechniques*, 1989; 6(5): 402
- 5 Zhou Chen et al. *J Biol Chem*, 1989; 264 (15): 9022

[本文于 1989 年 7 月 24 日收到]