

上述结果表明, 在 vero 细胞抽提物中, 在外源性蛋白质 SV40 Tag 的参与下, 质粒 pZ189 能利用抽提物中参与体内 DNA 复制所需的蛋白质成分, 有效地进行 DNA 体外复制. 而 SV40 Tag, 磷酸肌酐激酶和磷酸肌酐均为 DNA 体外复制所必需, 其缺失将导致 DNA 体外复制能力的缺陷. 国外研究证实, SV40 Tag 在 ATP 存在的条件下, 能有效地识别并结合至质粒 DNA 复制起点, 同时起到 DNA 解螺旋酶的作用, 为参与体外复制系统唯一的外源性蛋白质成分. 而磷酸肌酐激酶和磷酸肌酐组成了能量再生系统, 起到为 DNA 复制提供能量的作用<sup>[6,7]</sup>.

由于 DNA 体外复制系统为研究复杂的真核细胞 DNA 复制系统提供了简单、有效的手段, 目前在许多方面的研究中得到了应用. 我们建立了 pZ189 质粒在 vero 细胞抽提物中的 DNA 体外复制系统, 将有效地用于研究各种理化因子如何通过对 DNA 复制系统功能的损伤而导致其复制保真度的下降, 及最终导致基因突变、癌变等事件发生的确切机制.

### 参 考 文 献

- 1 Hurwitz J, Dean F B, Kwong A D *et al.* The *in vitro* replication of DNA containing the SV40 origin. *J Biol Chem*, 1990, **265** (30): 18043~18046
- 2 Hubscher U, Spadari S. DNA replication and chemotherapy. *Physio Rev*, 1994, **74** (2): 259~297
- 3 Seidman M M, Dixon K, Razzaque A *et al.* A shuttle vector plasmid for studying carcinogen-induced point mutations in mammalian cells. *Gene*, 1985, **38** (3): 233~237
- 4 Carty M P, Hauser J, Levine A R *et al.* Replication and mutagenesis of UV-damage DNA templates in human and

monkey cell extracts. *Mol Cell Biol*, 1993, **13** (1): 533~542

- 5 Stillman B W, Gluzman Y. Replication and supercoiling of simian virus 40 DNA in cell extracts from human cells. *Mol Cell Biol*, 1985, **5** (8): 2051~2060
- 6 Wobbe C R, Weissbach L, Borowiec J A *et al.* Replication of simian virus 40 origin-containing DNA *in vitro* with purified proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84** (7): 1834~1838
- 7 Wobbe C R, Dean F, Weissbach L *et al.* *In vitro* replication of duplex circular DNA containing the simian virus 40 DNA origin site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82** (17): 5710~5714

**Replication of pZ189 Plasmid DNA *in vitro*.**  
FENG Zhao-hui, YU Ying-nian, CHEN Xing-roo (*Department of Pathophysiology and Laboratory of Molecular Cellular Biology, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310031, China*).

**Abstract** *In vitro* DNA replication system derived from eukaryotes is capable of replicating exogenous plasmid DNA containing SV40 origin of replication efficiently and accurately. Such an *in vitro* DNA replication system has been established. In the presence of exogenous SV40 large T antigen, shuttle-vector plasmid pZ189 could replicate efficiently in monkey kidney vero cytoplasmic extracts, which provided all the other necessary proteins for DNA replication. This *in vitro* DNA replication system provides a useful measure for studying the composition and function of eukaryotic DNA replication system.

**Key words** shuttle-vector, eukaryote, DNA replication system, *in vitro*, SV40 large T antigen

## Magic/ Wizard DNA 纯化试剂盒的再生利用

袁 勇 宋泉声 刘红涛 狄春辉 王玉刚

(北京医科大学免疫学系, 北京 100083)

**摘要** DNA 的提取是分子生物学的常规操作, 美国 Promega 公司推出的 Magic/ Wizard 试剂盒大大简

化了这一烦琐、费时的的工作,但试剂盒一次性使用的价格使多数国内实验室难以承受,摸索出一种简单的试剂盒再利用的方法,使再生试剂盒的纯化效果与原装试剂盒无显著差别,在方便了研究工作的同时大大降低了实验成本.

**关键词** DNA 提取, 试剂盒, 再利用

**学科分类号** Q781

Wizard™ DNA 纯化系统是美国 Promega 公司推出的快速 DNA 纯化系统. 其核心成分是悬浮于 7 mol/L 盐酸胍中的特殊树脂. 该系统已广泛应用于质粒 DNA,  $\lambda$  噬菌体 DNA, M13 噬菌体 DNA, PCR 产物的提取和纯化. 纯化后的 DNA 可直接用于包括 DNA 序列测定在内的各种分子操作, 这种简单、迅速的实验方法大大提高了工作效率; 但试剂盒一次性使用的价格使多数国内实验室难以承受, 所以我们摸索了该试剂盒再生使用的方法, 使实验消耗降低, 也使国内更多的实验室能使用该试剂盒.

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

Wizard™ Minipreps DNA Purification System 购自美国 Promega 公司. 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购自 BRL-GIBCO 公司.

质粒 pUC18 购自瑞典 Pharmacia 公司, 盐酸胍购自美国 Promega 公司. 盐酸、无水乙醇、异丙醇为国产优级纯试剂.

### 1.2 方法

**1.2.1 质粒 DNA 的提取**按 Wizard™ 试剂说明书.

**1.2.2 Wizard™ 树脂的再生:** 将每次纯化用过的小柱子收集起来, 以 50 个柱子为例, 用针头将柱子中的树脂掏出. 将树脂悬于 50 ml 0.2 mol/L HCl 混匀, 在另一个较大的柱中抽滤、弃滤液, 再用 3  $\times$  50 ml 0.2 mol/L HCl 抽滤洗树脂三次, 然后用蒸馏水洗树脂至滤出液 pH 值为中性. 再用 50 ml 无水乙醇洗柱子一遍, 将滤干的树脂置于玻璃平皿, 110  $^{\circ}$ C 烤 1 h, 烘烤完毕后, 迅速将树脂悬于 50 ml 的 7 mol/L 盐酸胍中装瓶.

**1.2.3 小柱子的清洗:** 掏空树脂的小柱子在清洗液中超声清洗, 自来水清洗后, 再用蒸馏水超声波清洗; 60  $^{\circ}$ C 烘干后即可.

**1.2.4 洗柱液的配置:** 洗柱液根据使用目的分两种, 第一种用于质粒提取, 成分为: 80 mmol/L 醋酸钾, 8.3 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 40 mmol/L EDTA, 55% 乙醇, 第二种用于 PCR 产物纯化, 从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段, 其配方为 80% 异丙酸的水溶液.

## 2 结论与讨论

为了检验再生试剂的效果, 我们用原装试剂和再生试剂同时提取 DH5 $\alpha$  菌培养的 pUC18 菌 3 ml<sup>[1]</sup>, 纯化结果见表 1.

**表 1 原装试剂与再生试剂的 DNA 纯化效果**

	$A_{260}/A_{280}$	产量/ $\mu$ g	RNA	限制性内切酶消化	超螺旋质粒比例
原装试剂	1.7725	4.55	无	完全消化	> 80%
再生试剂	1.7305	4.45	无	完全消化	> 80%

结果显示再生试剂与原装试剂的纯化效果一样, 各项指标均达到进一步进行 DNA 分子操作的要求.

Wizard 纯化试剂盒的核心是 DNA 纯化树脂, 这也是厂家唯一没有说明确切成分的试剂. 通过分析纯化步骤, 我们估计这种树脂可能是一种疏水相互作用的树脂. 显微镜下观察会发现树脂由两种结构组成: 一是长纤维结构, 可能用于构成树脂的网状立体结构, 以保持过滤纯化时的通透性; 二是微粒状成分, 可能用于结合 DNA. 树脂的悬液是 7 mol/L 的盐酸胍, 其作用可能有两点<sup>[2]</sup>: 一是提供高盐环境, 使 DNA 结合于疏水介质; 二是使蛋

白质变性,以便在洗柱过程中去除蛋白质,抑制各种核酸酶对 DNA 的降解.我们曾用 Pharmacia 公司的疏水介质 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 进行类似的处理,发现这种介质也能起到纯化 DNA 的作用,但其缺陷是抽滤液体流速太慢,这进一步支持了我们关于树脂类型的推测.

通过对试剂盒组分的研究,我们打破了厂家对同种类不同试剂盒应用范围的限制,在 Wizard Minipreps DNA 纯化系统的说明书中,厂家明确指出该试剂盒不能用于纯化琼脂糖凝胶中的 DNA,但我们通过试验发现原装试剂盒与再生试剂盒都能用于从琼脂糖凝胶中回收 DNA,进行 PCR 产物的纯化,核酸的 clean up,甚至  $\lambda$  噬菌体和腺病毒 DNA 的纯化,只是在各种用途中条件略有改变,在 PCR 纯化、从胶中回收 DNA、clean up 时洗柱液用 80% 异丙醇,在纯化病毒 DNA 时,最后洗脱时要 75 °C 的热水或 TE,在高温水浴中孵育,洗脱效果更好,上述所有操作所获得的 DNA 均可直接进行下一步分子操作.

这种简单的树脂再生方法使试剂盒的成本降低 7 倍,从而使该试剂盒能被更广泛地接受.

## 参 考 文 献

- 1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989. 1.25~ 1.28
- 2 赵永芳等编.生物化学技术原理及其应用.湖北:武汉大学出版社,1987. 41~ 42

**The Recycle of Magic/ Wizard DNA Purification Kit.** YUAN Yong, SONG Quan-sheng, LIU Hong-tao, DI Chur-hui, WANG Yurgang (*Department of Immunology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

**Abstract** DNA purification is commonly used in molecular biology procedures. Promega's Magic/ Wizard DNA purification systems make this laborious and time-consuming work easy, but most laboratories in developing countries can not afford the price of this disposable kit. A simple method to recycle the kit was successfully developed. The performance of recycled kit shows no significant difference compared with the original one. The method makes this powerful tools acceptable to most laboratories.

**Key words** DNA purification, kit, recycle

# 固定化尿酸酶丝素膜的性质及其尿酸传感器\*

张雨青 顾仁敖<sup>1)</sup> 朱江<sup>2)</sup> 曹佩根<sup>1)</sup>

(苏州大学蚕桑学院, 苏州 215151)

**摘要** 应用电化学分析法对固定化酶丝素膜的性质进行了分析,结果表明这种酶经丝素膜固定后,活性得率高、性能稳定、能长期存放.用这种酶膜和氧电极等组成的流动注射分析式尿酸传感器对生物样品进行的百次重复分析结果表明,这种传感器的重现性良好,每小时能分析 60 个人血清样品.

**关键词** 固定化尿酸酶丝素膜,尿酸传感器,氧电极,流动注射分析

**学科分类号** O629.8

\* 江苏省教委自然科学基金资助课题 (970054). <sup>1)</sup> 苏州大学化学化工学院, 苏州 215151.

<sup>2)</sup> 苏州大学水产学院, 苏州 215151. 收稿日期: 1997-05-13, 修回日期: 1997-09-22