

一种快速提取质粒 DNA 用于鉴别重组克隆的方法

A Rapid Method for Preparation of Plasmid DNA for Screening Recombinant Clones

郭旭东, 毛舒燕, 侯冬霞, 旭日干*

GUO Xu-Dong, MAO Shu-Yan, HOU Dong-Xia and BOU Shorgan*

内蒙古大学哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室 呼和浩特 010021

The Key Laboratory for Mammalian Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China

摘 要 介绍了一种利用过夜培养的菌液瞬时提取质粒 DNA, 并用于电泳鉴别含有插入子克隆的方法。事先无需准备许多繁琐的相关试剂, 提取质粒的全过程只需 3 ~ 5min 就可完成, 非常适合于做重组克隆的快速鉴别。

关键词 质粒 DNA, 酚/氯仿/异戊醇, 重组克隆

中图分类号 Q784 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)01-0176-03

Abstract A simple and rapid method for preparation of plasmid DNA from overnight incubation was introduced. It does not require any additional reagents; the incubation mixture containing recombinant plasmid DNA was just mixed with H₂O and phenol/chloroform/isoamyl alcohol in certain ratio. After vortexing and spinning of the mixture, the supernatant could be directly loaded onto agarose gel and analyzed using electrophoresis. The whole preparation requires only 3 ~ 5 minutes. So to quickly screen recombinant clones, this method is better compared with traditional methods.

Key words plasmid DNA, phenol/chloroform/isoamyl alcohol, recombinant clones

从宿主菌中提取质粒 DNA 用于克隆的初步筛选是基因工程的一项基本工作。经典的提取质粒 DNA 方法包括 SDS 碱裂解法、煮沸裂解法以及氯化铯密度梯度离心等^[1]。从上世纪 90 年代开始, 大量层析树脂试剂盒的出现的确极大地提高了基因工程的工作效率。但是在利用试剂盒精确提取质粒 DNA 之前, 仍然需要初步的筛选。这样既节省时间, 又节约了试剂盒的用量。虽然有一些实验室曾提出经过改进的快速提取质粒的方法^[2-6], 但是过程仍然很繁琐, 或者需要准备许多相关的溶液和试剂。本文介绍一种能够快速提取质粒的方法, 极大

地提高了筛选克隆的工作效率。而且经过多次实践, 在不同宿主间比较证明该方法的结果稳定可靠。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株: 宿主菌 *E. coli* DH5 α 、JM109 以及 Top10 均为本室保存; 质粒为常用高拷贝数的克隆载体 (pUC18、pMD19T、pGEM-7Zf+ 等)。

1.1.2 试剂: 不含 DNA 酶的无菌水, 酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1), 10 \times Loading Buffer, 0.8% 琼脂糖凝胶。

Received: August 15 2006; Accepted: September 21 2006.

This work was supported by the grants from the National "863" program (No. 2002AA242061) and the Natural Science Foundation of Inner Mongolia (No. 200607010405).

* Corresponding author. Tel: +86-471-4992890; E-mail: xrg@xzwzlx.imu.edu.cn

国家高技术研究与发展计划 (No. 2002AA242061) 项目、内蒙古自然科学基金 (No. 200607010405) 资助项目。编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.2 方法与步骤

1.2.1 分别挑取若干含有转化重组质粒的 DH5 α 、JM109 和 Top10 单菌落,以及空质粒对照,分别接种于 3mL 含抗生素的 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 摇床培养约 12~16h。

1.2.2 依次取细菌培养液 80 μ L、无菌水 20 μ L、酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)80 μ L 和 10 \times Loading Buffer 20 μ L (按体积比例 4:1:4:1)混合于 1.5mL 离心管中,激烈振荡 1min。

1.2.3 12000r/min 离心 1min。

1.2.4 上清 30 μ L 直接点样,0.8% 琼脂糖凝胶电泳 100V 45min 后观察结果。

2 结果与讨论

本方法是利用菌液加一定量的水后渗透压的改变,进而促使大肠杆菌细胞膜、壁破裂,释放出内含物。再利用酚/氯仿/异戊醇试剂抽提,沉淀大部分蛋白质等杂质,使分离出的 DNA 直接溶在水相中而完成的。

获取质粒的量可按制备比例(4:1:4:1)扩大或缩小。按照本文叙述的量制备,可获得大约 120 μ L 的质粒上清液。

上述方法是笔者所使用最快的、粗制质粒 DNA 的方法,样品制备过程只需要 3~5min。非常适合于重组质粒的初步筛选。而且所需要的实验试剂简单,只需要酚/氯仿/异戊醇试剂,无需配制其他溶液。该方法结果与煮沸法^[4]、碱法快速提取^[5]等比较,同样可以得到较清晰、明确的电泳结果(见图 1、

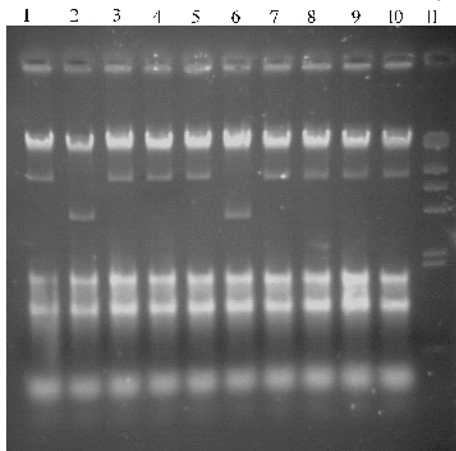


图 1 插入子大小为 ~1kb 的质粒电泳结果 (宿主菌为 *E. coli* DH5 α)

Fig.1 Electrophoresis result of plasmid samples containing insertion around 1kb

#6 is vector control, #11 is DNA marker λ DNA Hind III digest. Others are candidate clones.

2、3)。

但是该方法的不足之处:一是电泳结果中条带较多,不仅含有质粒 DNA,而且还有宿主基因组 DNA 以及 RNA 等,容易干扰电泳结果。所以电泳中设置同样方法制备的空质粒对照尤显重要。二是样品只用于快速甄别含有插入子的克隆质粒,而不能用于其他用途的实验。比如进一步的限制性内切酶分析以及测序反应等。而且经过放置一定时间,样品条带将逐渐被降解。所以制备样品后即刻上样电泳十分必要。

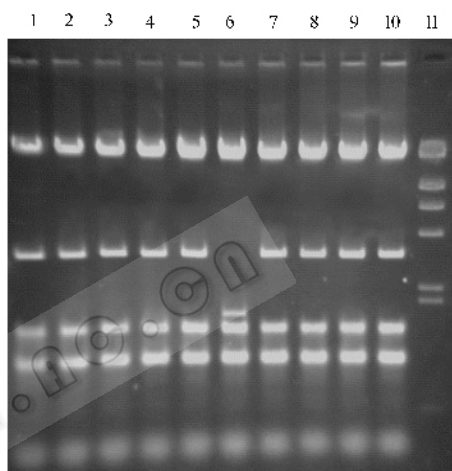


图 2 p19TKI 克隆(插入子大小约为 2.5kb)的电泳筛选结果(宿主菌为 *E. coli* Top10)

Fig.2 Electrophoresis result of plasmid samples which contain insertion around 2.5kb

#6 is vector control, #11 is DNA marker λ DNA Hind III digest. Others are candidate clones.

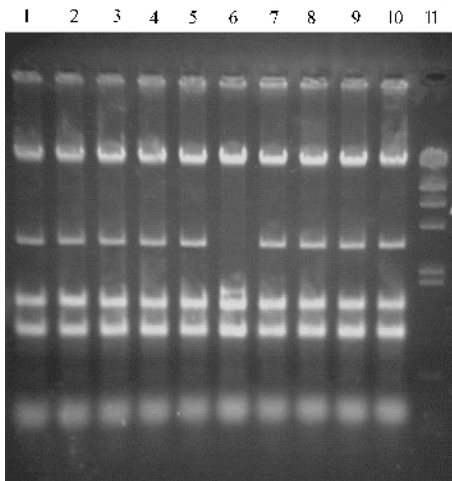


图 3 p19TKI 克隆(插入子大小约为 2.5kb)的电泳筛选结果(宿主菌为 *E. coli* JM109)

Fig.3 Electrophoresis result of plasmid samples which contain insertion around 2.5kb

#6 is vector control, #11 is DNA marker λ DNA Hind III digest. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn> Others are candidate clones.

REFERENCES(参考文献)

- [1] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 3rd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 2001 , pp.26 - 66.
- [2] Macneil DJ. A flexible boiling procedure for isolating plasmid DNA from gram-positive microorganisms. *J Microbiol Methods* ,1986 **5** : 115 - 123.
- [3] Ortlepp SA. An improved boiling method for the preparation of bacterial plasmid and phage DNA. *Gene Anal Tech* ,1989 **6** (5) 93 - 96.
- [4] Majumdar MK , Williams DA. Minipreparations of plasmid DNA directly from cell culture by the boiling method. *Biotechniques* , 1992 , **13** (3) 366.
- [5] Feliciello I , Chinali G. A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli* . *Anal Biochem* ,1993 **212** (2) 394 - 401.
- [6] Birnboim HC , Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* , 1979 , **7** (6) : 1513 - 1523.