

快速制备酵母质粒和基因组DNA PCR 模板*

刘秋云 罗 樾 何康泽 李宝健

(中山大学基因工程教育部重点实验室与生物工程研究中心 广州 510275)

摘要: 发展了一个利用煮沸法快速制备酵母质粒和基因组 DNA PCR 模板的程序, 成功地从低拷贝的 ARSCEN 酵母质粒和酵母基因组扩增到了相应基因。

关键词: 煮沸法, PCR 模板

中图分类号: Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 05-0077-04

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30070420)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 30070420)

广东省自然科学基金资助项目 (No. 980303)

教育部高等学校骨干教师计划资助项目 (No. 2000-061-314301)

收稿日期: 2000-11-21, 修回日期: 2001-01-21

RAPID PREPARATION OF PCR TEMPLATE OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PLASMID AND GENOMIC DNA

LIU Qiu-Yun LUO Xi HE Kang-Ze LI Bao-Jian

(The Key Laboratory of Gene Engineering of Education Ministry and Biotechnology
Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract: A procedure for the preparation of PCR template from *Saccharomyces cerevisiae* using boiling method is described, and *arg-13* gene from low copy ARSCEN plasmid and *ymc1* gene from genomic DNA are amplified with high efficiency respectively.

Key words: Boiling preparation, PCR template

寻找快速有效的 PCR 方法, 是分子遗传学研究的重要内容。本文基于粗糙脉孢霉的方法^[1]发展了快速制备酵母质粒和基因组 DNA PCR 模板的程序, 具有良好的重复性。

1 材料与方法

1.1 材料

酿酒酵母菌种 1c1636d *arg11*, *ura-3* 和酵母 2- μ m 载体 pFL44 (L) 为比利时 Oriane Soetens 博士馈赠。野生酿酒酵母菌种 G1M234 为本中心周惠副教授惠赠。酵母 ARSCEN 载体 pYX133 从康乃尔大学曹维国博士处获得, 并由此构建了粗糙脉孢霉 *arg-13* cDNA 的酵母表达载体 pYXA5。培养基为 SD 或 YPD 液体培养基。

1.2 方法

1.2.1 酵母质粒提取^[2]: 取 1.5mL 对数生长晚期的培养液, 13,000r/min 离心 15s, 悬浮于 100 μ L TE 缓冲液。加 200 μ L 裂解液 (2% Triton X-100; 1% SDS; 0.1mol/L NaCl; 10mmol/L Tris HCl pH8; 1 mmol/L EDTA), 200 μ L 苯酚/氯仿/异戊醇, 300mg 石英砂 (0.5 ~ 1mm)。振荡 2min, 13,000r/min 离心 5min。乙醇沉淀, 加 TE 缓冲液。

1.2.2 酵母质粒和基因组 DNA PCR 模板制备: 取对数生长晚期的酵母菌 1.5mL, 13,000 r/min 离心 15s, 去上清。用双蒸水洗涤 1 次, 13,000 r/min 离心 15s。沉淀悬浮于 200 μ L TE 缓冲液。在沸水上煮 1 ~ 10min, 冰浴 10min。13,000 r/min 离心 5min。将上清储存在 -20 $^{\circ}$ C 取 1 μ L 用来做 PCR。

1.2.3 PCR 扩增: 扩增质粒 pYXA5 的 PCR 引物为: 1.ATGGACTCCGTACCAG; 2.CTCAAGCCATAGGAAA。扩增完整的 1.1kb *arg-13* 读码框。扩增基因组 DNA 的 PCR 引物为: 1.GCGGATCCACCATGTCTGAAGAATTTCC; 2.GTGGATCCTCAACCCAATAACCTC。扩增完整的 0.95 kb YMC1 基因读码框。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 45s, 54 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 90s, 36 或 40 个循环。扩增产物用异丙醇沉淀后做酶切分析。

2 结果与讨论

从制备的质粒、煮沸法制备的质粒与基因组 DNA 模板我们分别扩增到了低拷贝的 ARSCEN 质粒 pYXA5 上的 1.1kb *arg-13* 基因与基因组的 0.95kb YMC1 基因 (图 1), 酶

切分析予以了确定(图2)。质粒 pYXA5 的 *arg-13* PCR 扩增产物的 *Bgl* II、*Sac* I 酶切结果与转化子的 *arg-13* PCR 扩增产物的酶切结果一致, *Bgl* II 产生 0.58kb、0.51kb 条带, *Sac* I 酶切给出 0.61kb、0.42kb (0.05kb 条带不可见), 与我们测得的 *arg-13* cDNA 序列的酶切分析一致。酵母野生型菌株的 YMC1 PCR 扩增产物的 *Eco*R I 酶切产生 0.49kb、0.46kb 条带。酵母野生型菌株的 YMC1 PCR 扩增产物的 *Nco* I 酶切产生 0.75kb、0.2kb 条带。均与 GenBank 的 YMC1 序列的酶切分析一致。

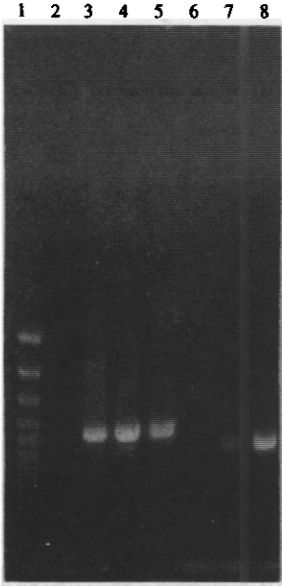


图1 质粒和基因组 DNA PCR 扩增结果

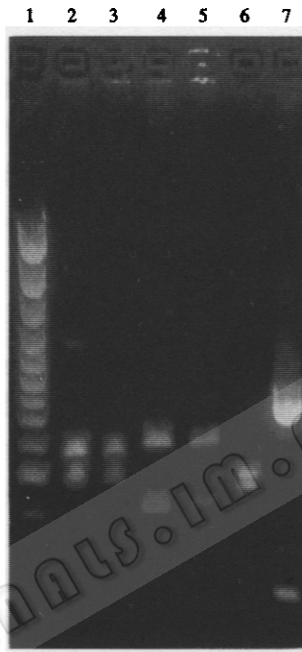


图2 PCR 扩增产物的限制性酶分析



图3 基因组的 YMC1 基因的 PCR 扩增时程实验

1 100bp 梯级分子量标准 (3.0kb, 2.0, 1.5, 1.2, 1.1, 1.0, 0.9, 0.8), 2 无模板的负对照, 扩增 *arg-13* 基因, 3 模板为从大肠杆菌提取的质粒 pYXA5, 扩增 *arg-13* 基因, 4 模板为从酵母提取的质粒 pYXA5, 扩增 *arg-13* 基因, 5 从转化子用煮沸法制备的质粒与基因组 DNA 模板, 扩增 *arg-13* 基因, 6 无模板的负对照, 扩增基因组的 YMC1 基因, 7 从转化子用煮沸法制备的质粒与基因组 DNA 模板, 扩增基因组的 YMC1 基因, 8 煮沸法制备的基因组 DNA(酿酒酵母菌株 1c1636d *arg*11, *ura*-3)模板, 扩增基因组的 YMC1 基因

1 100bp 梯级分子量标准 (3.0kb, 2.0, 1.5, 1.2, 1.1, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3), 2 质粒 pYXA5 的 *arg-13* PCR 扩增产物的 *Bgl* II 酶切结果, 正对照, 3 用煮沸法从转化子制备模板的 *arg-13* PCR 扩增产物的 *Bgl* II 酶切结果, 4 质粒 pYXA5 的 *arg-13* PCR 扩增产物的 *Sac* I 酶切结果, 正对照, 5 用煮沸法从转化子制备模板的 *arg-13* PCR 扩增产物的 *Sac* I 酶切结果, 6 用煮沸法从酵母野生型菌株 GIM234 制备模板的 YMC1 PCR 扩增产物的 *Eco*R I 酶切结果, 7 用煮沸法从酵母野生型菌株 GIM234 制备模板的 YMC1 PCR 扩增产物的 *Nco* I 酶切结果

1, 8 100bp 梯级分子量标准 (3.0kb, 2.0, 1.5, 1.2, 1.1, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5), 2 无模板的负对照, 3 酿酒酵母菌 1c1636d *arg*11, *ura*-3 煮沸 1min 制备的模板扩增结果, 4 煮沸 2min, 5 煮沸 3min, 6 煮沸 4min, 7 煮沸 5min, 9 煮沸 6min, 10 煮沸 7min, 11 煮沸 8min, 12 煮沸 9min, 13 煮沸 10min

时程实验表明煮沸 1min 至 10 min 均可扩增出基因组的 YMC1 基因(图3), 2 ~ 5min 效率相对要高一些。YMC1 具有酵母线粒体内膜转运酶的特征序列, 但详细功能未知。我们观测不到酵母与质粒条带, 可能煮沸不能使酵母完全破壁, DNA 释放不完全。另外, 煮沸也会使 DNA 线性化和断裂成不同长度片段。我们用的酵母为双重转化

(下转 84 页)

(上接 79 页)

子, 2- μ m 载体 pFL44 (L) 所携带的选择标记 URA3 能够互补酿酒酵母菌种 1c1636d *arg11*, *ura-3* 的 *ura-3* 缺陷, 酵母表达载体 pYXA5 携带的 *arg-13* 基因能够互补酿酒酵母菌种 1c1636d *arg11*, *ura-3* 的 *arg11* 缺陷。本法具有良好的重复性, 从多个酵母转化子和酵母野生型与突变型菌株分别扩增到了低拷贝的 ARSCEN 酵母质粒和基因组的基因。本法可能可以用于其它真菌与细菌的质粒和基因组 DNA PCR 模板制备。

参 考 文 献

- [1] Yeadon P J, Catcheside D E A. Fungal Genetics Newsletter, 1996, 43: 71.
- [2] Transy C, Legrain P. Molecular Biology Reports, 1995, 21: 119.