

# 棒状杆菌中质粒 DNA 的快速检测方法

余红 方序 杨能

(浙江大学生物科学与技术系)

**摘要** 在棒状杆菌质粒 DNA 快速检测中,比较了三种方法:强碱法、快裂法和我们设计的酶法。用强碱法抽提的质粒带很淡,快裂法其次,且不能区别两个分子量相近的质粒;而用酶法则显带清晰,且能很好地区分两个大小相近的质粒,分辨率高,认为在棒状杆菌质粒快速检测中是一种很好的方法。

**关键词** 棒状杆菌;质粒 DNA;质粒检测

棒状杆菌是氨基酸、核苷酸发酵的主要生产菌,有较高的经济价值。在棒状杆菌中建立

分子克隆系统有很大意义<sup>[1]</sup>,它不仅可使我们对这类菌进行遗传学研究,而且能够为菌种的

改良提供一个极为有效的工具。质粒 DNA 检测是基因工程中一项不可忽视的基础性工作。在棒状杆菌中由于细胞壁较为特殊,给质粒 DNA 的检测带来了一定的困难,许多常规质粒 DNA 检测方法在棒状杆菌中都不够理想。我们在建立棒状杆菌转化系统中,为了适合工作需要,在比较了 Barnes<sup>[2]</sup> 和 Kado<sup>[3]</sup> 的质粒检测方法之后,提出了一种适合在棒状杆菌中进行质粒 DNA 快速检测的有效方法。

## 材料与方 法

1. 菌株和质粒: 所用菌株为谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*), 它们的来源及所含质粒如下:

菌株	携带质粒	来源
1014	pXZ10145(Cm <sup>r</sup> )*, pZM10141	上海工微所
1014-1	pZM10141	1014 衍生株
1014-6T	pXZ10145(Cm <sup>r</sup> )	1014 衍生株
1014-6	-	1014 衍生株

\* Cm<sup>r</sup>: 氯霉素抗性标记

2. 培养基(%): 蛋白胨 1, 氯化钠 0.5, 牛肉膏 1, pH 7.2。

### 3. 质粒快速检测方法

(1) 强碱法: 5 ml 培养基培养过夜的菌体,用 50  $\mu$ l TE 缓冲液 (40 mM Tris, 2 mM EDTA, 乙酸调 pH 7.9) 悬浮,加入 100  $\mu$ l 溶菌液 (3% SDS 溶于 50 mM Tris 中,用 NaOH 调 pH 12.6),一定温度下水浴 10—15 分钟,用 TE 饱和酚液抽提一次,上清液电泳检测<sup>[3]</sup>。

(2) 快裂法: 5 ml 培养液培养过夜的菌体,用 25  $\mu$ l 裂解缓冲液 (50mM NaOH, 0.5% SDS, 5mM EDTA, 0.025% 溴甲酚绿) 悬浮,在 45 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟,加 2.5  $\mu$ l 25% 蔗糖,台式高速离心机 12000 r/min 离心,上清液电泳检测<sup>[2]</sup>。

(3) 酶法: 5 ml 培养液培养过夜的菌体,用 200  $\mu$ l TEN 缓冲液 (Tris 30 mM、EDTA 50 mM、NaCl 50 mM, pH 8.0) 悬浮,加入 70  $\mu$ l 溶菌酶 (25mg/ml), 35 $^{\circ}$ C 振荡 2 小时,加 30  $\mu$ l 10% SDS 至终浓度 1%,室温放置 10 分钟,让细胞充分裂解, TEN 饱和酚抽提一次,

上清液作电泳检测。

(4) 电泳: 0.8% 琼脂糖凝胶, 硼酸电泳缓冲液 (89 m M Tris, 89 m M 硼酸, 20 m M Na<sub>2</sub>EDTA), 电压 80V, 室温下电泳 2.5 小时。

## 结果与讨论

强碱法是在大肠杆菌中建立起来的质粒检测方法。我们把这一方法应用于棒状杆菌中,结果不理想,质粒带很淡,模糊不清(图 1)。

快裂法检测棒状杆菌 1014 及衍生菌株的质粒 DNA, 结果见图 2, 此法能快速检测棒状杆菌质粒的存在,但质粒带不够清晰,分辨率不高,1014 菌株所含的二种质粒用此法不能显示出来。另外,此法与菌浓度有较大关系,处理时间和温度影响不大。

酶法快速检测质粒 DNA 的方法是在质粒 DNA 抽提的基础上建立起来的。用酶法快速检测谷氨酸棒状杆菌 1014 菌株及其衍生株,能清晰地分析出菌株中所含质粒的个数和质粒 DNA 分子量大小,如图 3 所示,1014 菌株清晰地显示出二个质粒带,这是强碱法、快速裂解法无法比拟的。此法简便易行,重复性好,适用于大批量菌株的质粒快速检测。例如,带质粒菌株筛选,转化子的鉴定,插入片段的检测等。运用此法,在芽孢杆菌中进行质粒快速检测也获得较好结果。此法还可以进行放大,在酶抽提后,再用酸酚法<sup>[4]</sup>去除染色体 DNA,然后用冰乙醇沉淀,这样所得的质粒可用于转化和酶切。

以上我们介绍的酶法比已报道的棒状杆菌质粒 DNA 快速检测方法<sup>[5-7]</sup>更为简便、有效,可用于不同需要。

## 参 考 文 献

- [1] 余红等: 生物工程学报, 3(3): 161—168, 1987.
- [2] Barhes, W. M.: *Science*, 195: 393, 1977.
- [3] Kado, C. I. and Lin S. T.: *J. B.*, 145(3): 1365, 1981.
- [4] 李谱勋: 遗传, 5(2): 17, 1988.
- [5] Yoshihama, M.: *J. B.*, 162(2): 591—597, 1985.
- [6] Miwa, K.: *A. B. C.*, 48(11): 2901—2903, 1984.
- [7] Santamaria, R.: *J. Gen. Microbiol.*, 130: 2237—2246, 1984.