

质粒 DNA 的酚-氯仿一步抽提法

魏征宇 王苏燕 叶寅 刘玉乐 田波

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

摘要 本文介绍了一种极快速提取质粒 DNA 的方法。该法是对 Serghini 等发表的方法的改进,全过程只需用酚-氯仿混合液抽提一次,用时少,操作简便,适用于大规模筛选重组克隆子,也可直接用作转化、酶切及 DNA 序列测定。

关键词 质粒 DNA; 酚-氯仿抽提; 凝胶电泳

质粒 DNA 的提取和纯化是分子克隆中常用的一种技术。质粒 DNA 的质量直接影响到基因操作的后续步骤,如转化、酶切和 DNA 序列分析等。目前普遍采用的质粒 DNA 的提取方法主要有碱法^[1]和煮沸法^[2],还有一些是在这两种方法基础上改进的方法。虽然各有特点,但均步骤较多而且费时,若用于重组克隆子的大量筛选就显得极不方便,消耗颇大。我们在 Serghini 等^[3]发表的方法基础上稍加改进,形成了一种快速提取质粒 DNA 的方法。经实验室的实践证明,该方法不仅简便、快速,而且十分有效,已成为我们实验室常用的方法之一。

材料与方 法

(一) 菌株与质粒

大肠杆菌 H5 α , 重组质粒(外源片段为 1.5 kb)。

(二) 化学试剂

TE 缓冲液: 10m mol/L Tris-HCl, pH8.0; 1m mol/L Na₂EDTA。

酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)混合液。

电泳缓冲液 TBE: 50m mol/L Tris-HCl, pH 8.0; 50m mol/L 硼酸, 20m mol/L Na₂EDTA。

点样缓冲液: 1×TBE 缓冲液, 50%甘油, 1%溴酚蓝, 1%二甲苯蓝

(三) 方法与步骤

1. 接种含质粒的大肠杆菌 DH5 α 于 3ml

LB 液体培养基中(含相应的抗生素),于 37℃ 摇床培养过夜。

2. 将 1.5ml 上述菌液转移至一个 Eppendorf 管中, 12000r/min 离心 1 分钟。

3. 弃上清液, 控干菌体。

4. 用 50 μ l TE 缓冲液重新悬浮菌体, 再加 50 μ l 酚-氯仿混合液, 充分振荡。

5. 12000r/min 离心 5 分钟。

(四) 电泳检测

用 1% 的 agarose 凝胶走电泳, 每孔加 3 μ l 上清抽提液(点样前样品中加 RNase 以去除 RNA 电泳效果更好)。

结果与讨论

1. 该方法是目前质粒 DNA 提取方法中最快之一种, 只需离心一次, 全过程用时不超过 10 分钟, 特别适用于大规模筛选重组克隆子。

2. 整个操作均在同一个 Eppendorf 管中进行, 仅用酚-氯仿抽提一次, 节约实验用品。

3. 该方法与煮沸法、碱法及 Serghini 等发表的方法相比, 质粒 DNA 的含量没有明显差别(图 1), 可用作限制性内切酶分析(图 2)及 DNA 序列测定^[4]。

4. 该方法适用于常用的高拷贝数、较小分子量质粒载体, 如 pUC 系统、pGEM 系统、Bluescript 系统等。

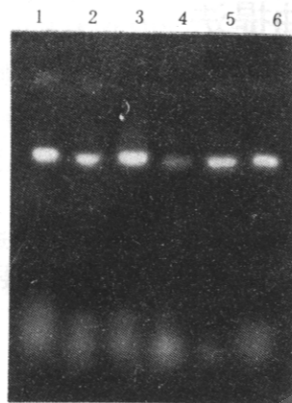


图1 同一重组质粒样品不同提取方法的电泳比较
1,6:采用本文的方法;2,5:Serghini 等的方法;3:煮沸法;4:碱法



图2 上述质粒用 Hind III, EcoR I 酶切后的电泳比较
1:本文介绍的方法。2:Serghini 等的方法。3:煮沸法。4:碱法

参 考 文 献

1. Brinboim H C and J Doly *Nucleic Acids Res.*, 7(5-6):1513, 1979.
2. Sambrook J, E F Fritsch and T Manitis; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, New York, P 1. 34--1. 35, 1989.
3. Serghini M A, C Ritzenthaler and L Pinck; *Nucleic Acids Res.*, 17(9):3604, 1989.
4. Ye Yin, Wei Zhengyu and Tien Po; *Nucleic Acids Res.*, 21(2): 361, 1993.

(1993-04-05 收稿)