

文章编号: 1005—8893 (2003) 03—0030—02

# 细菌质粒 DNA 的快速提取及检测<sup>\*</sup>

李 亮, 蔡志强, 赵希岳

(江苏工业学院 生物工程实验室, 江苏 常州 213016)

**摘要:** 介绍一种质粒 DNA 的快速提取方法, 所分离出的 DNA 纯度较好, 全部操作仅在两只 Eppendorf 管中进行。含质粒 DNA 的上清液可直接点样琼脂糖凝胶电泳。整个提取过程在较短时间内完成。该方法简便、快捷、效果好。

**关键词:** 质粒 DNA; 提取方法; 凝胶电泳

**中图分类号:** Q 812      **文献标识码:** A

分子生物学(基因工程)的实验中,经常要做质粒 DNA 的提取及检测工作,以便获得运载基因的载体 DNA;或用于时行电泳检测分析,了解样品是否含有质粒 DNA(包括重组质粒 DNA),判断其分子量大小,区别不同质粒等等。因此质粒 DNA 的提取是基因工程实验中最常用的手段之一,笔者根据前人的经验<sup>[1~4]</sup>和本实验室工作特点,摸索了一种快速提取质粒 DNA 的方法和检测手段。现将此法作一介绍,供大家参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌种与质粒

大肠杆菌 Pbr322 或其它含质粒的革兰氏阳性、阴性菌均可。

#### 1.1.2 试 剂

溶菌酶(中国科学院上海生物化学研究所);重蒸酚、乙醇、硼酸、氯仿、异戊醇、蔗糖、Tris(三羟甲基氨基甲烷)、(均为上海试剂一厂,分析纯);琼脂糖、溴酚蓝、蛋白胨、琼脂、氯化钠、EDTA Na<sub>2</sub>(均为上海化学试剂总厂);SDS(上海新华化工厂进口分装);EB(溴化乙锭,FLUKA公司);Rnase。

#### 1.1.3 仪 器

小型高速台式离心机(TGL—16B型,上海安亭科学仪器厂);水浴锅;涡旋混合器;Eppendorf管;微量加样器。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 试剂配制

a. 培养基(%):牛肉膏 0.5,蛋白胨 1,氯化钠 0.5,琼脂 1.6, pH7.0~7.2, 121℃灭菌 30 min;

b. 缓冲剂:蔗糖 10%, Tris 50 mmol/L, EDTA 25 mmol/L, pH8.0;

c. 溶菌液:溶菌酶 10 mg/mL, 用上述缓冲液配制;

d. SDS 液:SDS 10%, Tris 50 mmol/L, pH8.0;

e. Rnase 溶液:Rnase 100 μg/mL, Tris 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH8.0(需要以 100℃热处理几分钟)。

f. 酚:仿=1:1; 5 mol/L NaCl 溶液; 95%乙醇;

g. 电泳液:Tris 89 mmol/L, 硼酸 89 mmol/L, EDTA 2.5 mmol/L, pH8.3;

h. 0.7%琼脂糖凝胶,用电泳液配制;

i. 指示剂:0.05 g 溴酚蓝,溶于 100 mL 50%

\* 收稿日期: 2003—06—04

作者简介:李亮(1971—),男,新疆人,实验员

甘油中;

j. 染色液: 溴化乙锭 (EB)  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 1.2.2 操作方法

a. 用接种环或灭菌牙签从培养 20~24 h 的待测菌斜面上取一满环培养物于或用 Eppendorf 管, 注入 1 mL 过夜培养的菌液, 置台式高速离心机上以 12 000 r/min 离心 5 min, 倾去上清液即可;

b. 取  $10 \mu\text{L}$  缓冲液加入 Eppendorf 管中, 加 200  $\mu\text{L}$  溶菌液, 置涡旋振荡器振荡片刻, 使菌体均匀混和,  $37^\circ\text{C}$  水浴保温 10 min;

c. 加入  $10 \mu\text{L}$  SDS, 立即振荡片刻或将离心管颠倒 4~6 次, 放冰浴 5 min;

d. 加入  $5 \text{ mol/L}$  NaCl 液 55  $\mu\text{L}$ , 立即振荡片刻或颠倒 4~6 次, 放冰浴 30 min;

e. 加入酚/仿液 280  $\mu\text{L}$  缓慢颠倒 4~6 次, 混匀后 16 000 r/min 离心 5 min;

f. 将上清液移至另一离心管中, 加冷乙醇 0.5 mL, 在  $-20^\circ\text{C}$  下放置 20 min;

g. 16 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液 (尽量将乙醇倒干);

h. 加入  $40 \mu\text{L}$  RNase 溶液, 待沉淀溶解后放  $37^\circ\text{C}$  水浴保温 20 min, 加  $10 \mu\text{L}$  溴酚兰指示剂, 即可点样电泳。

### 1.3 电泳检测

琼脂糖凝胶水平电泳, 琼脂糖凝胶层厚 5 mm, 先以 100 V 电压, 电泳 10 min, 再改 60 V。然后取出胶板放入 EB 液染色 30 min, 取出置 254 nm 紫外灯下观察质粒 DNA 带。

## 2 结果与讨论

目前提取质粒 DNA 的常用的方法主要是碱变性法和煮沸法等。本方法与其相比, 得率和纯度都

不相上下 (结果见图 1), 但本方法所需时间较短, 完成 1 次提取过程不超过 1 h, 而且操作简单方便, 无需特殊设备, 菌体裂解、染色体 DNA 变性、蛋白质变性、质粒 DNA 有机溶剂萃取分离均在 2 只 Eppendorf 管中进行, 比较节省实验用材料。且应用本法所提的质粒 DNA 上清液中因含有载体缓冲液成分, 可直接点样琼脂糖凝胶电泳, 简化了电泳操作步骤。

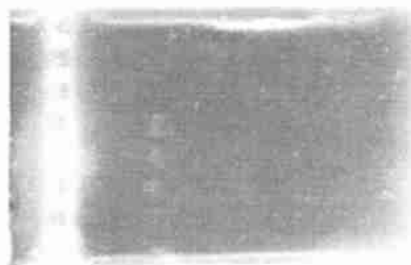


图 1 质粒 DNA 和 RNA 的电泳图谱

本方法对于各种革兰氏阳性、阴性菌所含的质粒载体, 如 PBR 第统、PUC 系统、PGE 系统、PUB110 以及各种重组的杂合质粒均能适用, 由于省时省力, 可用作大规模筛选重组质粒, 若能进一步纯化, 还能供酶切分析之用。

### 参考文献:

- [1] 李尔扬, 史乐文. 细菌中质粒 DNA 的快速检测 [J]. 微生物学杂志, 1987, 7 (1): 43-45.
- [2] 贺竹梅, 刘秋云. 一种提取质粒 DNA 的改良方法 [J]. 生物技术, 1996, 6 (1): 37-38.
- [3] 李俊英, 闻颖达, 蒋锦英, 等. 一种简便快捷的植物线粒体质粒 DNA 的提取方法 [J]. 南开大学学报 (自然科学版), 2000, 33 (4): 50-52.
- [4] 李尔扬, 程洁红, 史乐文. 耐盐菌的研究 [J]. 江苏石油化工学院学报, 2001, 13 (4): 4-6.

## A Simple and Rapid Method for Extraction of Plasmid DNA and its Detection

LI Liang, CAI Zhi-qiang, ZHAO Xi-yue

(Biochemistry Engineering Research Laboratory, Jiangsu Polytechnic University, Changzhou 213016, China)

**Abstracts:** This paper introduced a rapid method for extraction of plasmid DNA at a high purity. All the process could be completed only in two Eppendorf tubes. The supernatant liquid containing plasmid DNA could be directly sampled for agarose gel electrophoresis. The entire procedure could be finished in short time. This method was rapid, simple.

**Key words:** plasmid DNA; method for extraction; gel electrophoresis