

一种新的小分子 DNA 纯化方法——石英棉纯化法

A New Purification Methods of Small DNAs——the purification methods with silica wool

张 靖, 应天翼, 高 川, 宋云扬, 韩维涛, 王惠芳*

ZHANG Jing, YING Tian-Yi, GAO Chuan, SONG Yun-Yang, HAN Wei-Tao and WANG Hui-Fang

北京防化研究院第四研究所, 北京 102205

Beijing Research Institute of Chemical Defense, Beijing 102205, China

摘 要 建立了小分子 DNA 的高效分离纯化方法, 适合于分离几十到 300 个核苷酸组成的基因, 在此基础上, 建立更大的 DNA 片段的分离纯化方法。对不同大小的 DNA 片段经琼脂糖凝胶电泳后, 采用石英棉分离纯化法纯化 DNA。结果显示, 石英棉的分离效果最好, 对于 200 个碱基以下的 DNA 的回收率约高达 90% 以上, 对于 300 个碱基的 DNA 回收率为约 85~90, 该项技术纯化的 DNA 的酶切、酶连效率与试剂盒法纯化的 DNA 的酶切、酶连效率相同。该分离纯化 DNA 技术明显优于试剂盒方法。

关键词 石英棉, DNA, 纯化, 琼脂糖电泳

中图分类号 Q812 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)03-0504-05

Abstract The principal purpose of this study is to set up efficient purification techniques of small DNAs which are suitable for isolation of from tens to three hundred bases of genes. On the bases of the technique, purification methods for big DNA fragments are established. In the experiment, the DNA bands were cut after agarose gel electrophoresis and put into 0.5 mL of tubes with silica wool, glass wool, absorbent cotton and cotton at the bottom. And then 10 000 r/min for 2 min, the liquid was collected. The results indicated that silica wool was the best of the materials. The recovery rate for DNAs below 200bp was over 90%, 85%~90% for 300bp. And the technique can be applied to purify bigger DNA fragments. The kits for DNA purification hardly recovered DNA below 150bp. The recovery rate for 150bp of DNA was 5%, 60% even for 300bp. The efficiencies of enzymic digestion and enzymic connection for the DNAs purified by the technique were the same as those for the DNAs isolated by the kits. So, the technique is obviously superior to kit purification methods.

Key words silica wool, DNA, purification, agarose gel electrophoresis

基因工程技术离不开 DNA 的分离与纯化技术, 在不同大小的 DNA 混合物中, 分离纯化特定分子量的 DNA 片段, 是基因工程技术的基础。目前实验室主要采用的是凝胶电泳分离 DNA, 切下含所需 DNA 的凝胶后再纯化的方法, 基本上能满足对常规大小 DNA 纯化的要求。

DNA 的回收率与 DNA 片段的大小有一定的关系, 当 DNA 片段处于合适的大小范围时, DNA 的回

收率较高。随着 DNA 分子量增大, 回收率明显下降, 当 DNA 片段大于 20kb 时, 回收率低于 20%。同样, 随着 DNA 分子量减少, 回收率也明显下降, 当 DNA 片段小至一定程度时, 回收率变得非常小, 给正常使用带来很大困难。

目前, 虽然有不少公司研制了各种各样的分离纯化 DNA 的试剂盒或分离柱^[1], 对常规大小的 DNA 的回收纯化非常有效, 但这些试剂盒对于分离纯化

Received: November 16, 2005; Accepted: January 17, 2006.

* Corresponding author. Tel: 86-10-66758323; E-mail: bjzhamjing@tom.com

小分子 DNA 效率都不高,有时甚至完全得不到纯化产物。而自然界中存在一些编码小肽的 DNA 片段,有些片段只有几十个至 100 多个左右碱基。目前的试剂盒和分离柱分离这样的 DNA 片段不仅效果差,价格贵,且操作过程较长,花费时间较多。

琼脂糖凝胶是一立体网络结构,有一定大小的网络孔径,在离心力场的作用下,小于孔径的分子容易从凝胶中分离出来。本文依据这一原理,采用石英棉离心法分离 300 个碱基以下的 DNA 片段。

本文建立的 DNA 片段高效分离纯化方法,特别适合于分离由几十个到 300 个左右碱基组成的 DNA 片段,也适用于分离大于 300 个碱基的 DNA 片段。可应用于 PCR 扩增的 DNA 片段的回收、DNA 片段的分离、肽基因分离、未知肽基因和小分子蛋白质基因及其相关研究,还适用于为增加表达效率而采取的基因串联表达所需的 DNA 片段的分离纯化等工作。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 引物与基因:各种不同的引物和小分子肽基因由博亚公司合成。

1.1.2 工具酶:限制性内切酶 *Nde* I 和 *Alu*NI,华美生物工程公司产品;Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶为美国 Promega 公司产品。

1.1.3 试剂盒:DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒市售。

1.1.4 主要试剂:DNA Marker 购自天为公司;dNTP, Promega 产品;其它为市售进口或国产生化试剂。

1.1.5 主要仪器:高速台式冷冻离心机 3K-12, Sigma 公司;DNA/RNA 计算机, Pharmacia 公司;PCR 仪, Mastercycler personal, Eppendorf 公司;凝胶成像系统, Gel Doc 2000, Bio-Rad 公司;紫外透射仪, TFX, 法国 Vilber Lourmat 公司;电泳仪, 300, Bio-Rad 公司;冷冻干燥机 ALPHA-1-4, CHRIST 公司。

1.2 方 法

1.2.1 PCR 反应:50 μ L PCR 反应体系中含:Tris-HCl 10mmol/L, 模板 DNA 10ng, dNTP 0.2mmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 上、下游引物各 50ng。以上反应液混合均匀后, 95 $^{\circ}$ C 变性 5min, 再加入 Taq DNA 聚合酶 1.5u。循环反应完成后 72 $^{\circ}$ C 延伸反应 5min。

1.2.2 人工合成小分子肽基因正、负链的退火:将合成的小分子肽基因正、负链以 1:1 的比例, 各约 10 μ L 加入到 20 μ L 退火缓冲液中, 补水至 200 μ L 反应体系, 99 $^{\circ}$ C 反应 10min 后迅速降温到 30 $^{\circ}$ C, 反应 15min, 加入 1mol/L MgCl₂ 2 μ L 和 3mol/L pH6.0 NaAC

20 μ L, 4 $^{\circ}$ C 放 15min, 乙醇沉淀后溶于 7.5 μ L 的水中。

1.2.3 其它 DNA 的操作:DNA 的酶切、酶连等操作按照文献[2,3]及试剂盒产品操作说明进行。

1.2.4 DNA 的电泳:在 1 \times TAE 缓冲液中加入一定量的琼脂糖使其终浓度为 2%。加热溶解琼脂糖, 待溶液冷却至 60 $^{\circ}$ C 以下时, 加入溴化乙锭(EB), 使其终浓度为 0.5 μ g/mL。将琼脂糖凝胶倒入模具, 待凝胶完全凝固后, 加样品, 电泳。

1.2.5 DNA 的纯化:

(1)用试剂盒纯化:从琼脂糖凝胶电泳中分离不同大小片段的 DNA 按有关 Promega 公司生产的试剂盒操作说明书进行。

(2)纯化方法:准备 0.5 mL 离心管在其底部用针扎一小孔, 取适量的玻璃棉、石英棉、脱脂棉或普通棉花堵塞到离心管的底部, 尽量压实避免离心时琼脂糖凝胶渗出, 然后将其套于 1.5mL 的离心管中。

不同大小的 DNA 片段经琼脂糖凝胶电泳后, 切下相应的含 DNA 的凝胶, 尽量沿着 DNA 条带边缘切胶, 以防纯化后的溶液 DNA 片段浓度较低, 并带入较多的离子。把切下的含 DNA 片段的胶块置于准备好的 0.5mL 离心管中, 经 10 000 r/min 离心 2min, 收集离心的液体, 即为分离纯化的 DNA 片段。

1.2.6 DNA 的定量测定:溶液状态 DNA 的定量分析在 DNA/RNA 计算机上测定 A_{260} , 通过计算得出 DNA 的含量;凝胶中的 DNA 在凝胶成像仪上用灰度扫描法定量测定。

2 结 果

2.1 PCR 扩增不同大小的 DNA 片段

经 PCR 扩增获得了不同大小的 DNA 片段, 经 PCR 鉴定后, 用于随后的纯化方法研究。

2.2 不同棉花对 DNA 分离效果的影响

把 20 μ L 200bp 的 DNA 经琼脂糖凝胶电泳后, 切下相应的含 DNA 的凝胶, 置于预先放置不同棉花的离心管中, 离心收集液体, 并冷冻干燥后, 溶于 10 μ L 的去离子水中, 用琼脂糖凝胶电泳分析纯化效果, 实验结果见图 1。由图 1 可知, 在本实验中, 用普通棉花与脱脂棉分离 DNA 效果很差, 几乎完全得不到 DNA;石英棉的分离效果最好, 在上样量相等的情况下分离得到的 DNA 最多;玻璃棉的分离效果也不错, 但比石英棉的分离效果略差一点。因此, 用本方法分离 DNA, 石英棉的回收率最高。

2.3 不同大小 DNA 片段的分离效果

对于象 39bp、59bp、150bp 这样的 DNA 片段, 用

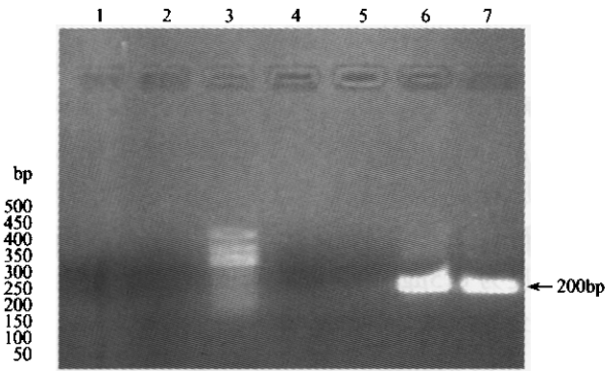


图1 不同棉花分离 200bp DNA 的效果
Fig.1 Purification effects of 200bp of DNA by different kinds of cotton

1,2: common cotton;3: marker;4,5: absorbent cotton;6: silica wool;7: glass wool.

传统的方法或试剂盒无法纯化得到所需的 DNA 片段或纯化效率很低;而对于 200bp 和 300bp DNA 片

段用传统的方法或试剂盒纯化效率也较低。用石英棉离心法可以很高的效率分离纯化到这样的 DNA 片段或小肽基因,实验结果见图 2。

由图 2 可以看出,用石英棉离心法从琼脂糖凝胶中分离纯化 39bp、59bp、150bp DNA 的效率很高,经 Bio-lab 凝胶成像灰度扫描分析,石英棉离心法对 39bp、59bp 和 150bp DNA 片段的回收率约分别为 95%~99%、95% 和 90%~95%。而用试剂盒纯化基本上得不到 39bp 和 59bp 的 DNA 片段,即使 150bp 的 DNA 片段,回收率也仅约为 5% 左右。200bp、300bp 的 DNA 编码的蛋白在自然界存在较多。用石英棉离心法可以很高的效率分离纯化这样的基因,纯化效率约分别为 90% 和 85%~90%。而用试剂盒纯化 200bp 和 300bp 的 DNA 片段,回收率仅约分别为 35%~40% 和 60% 左右。

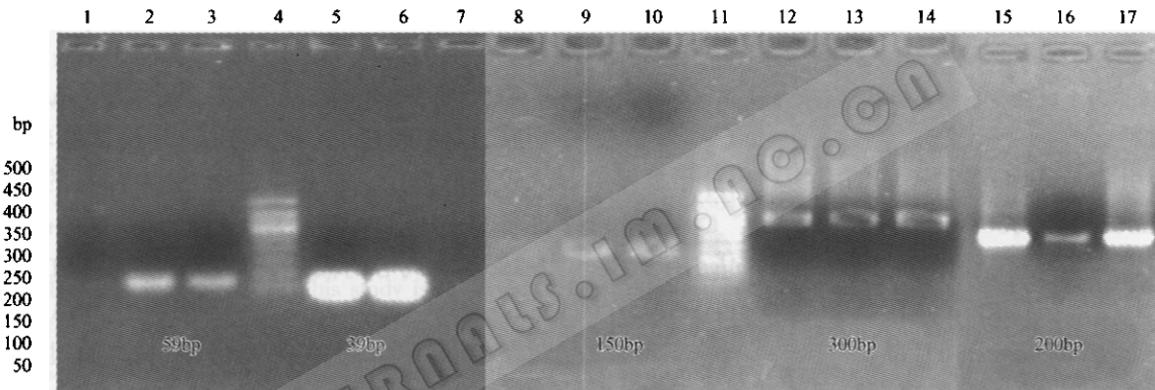


图2 DNA 的分离纯化

Fig. 2 Purification of DNA fragments by silica wool

4, 11: 50bp marker;2, 6, 10, 12, 17: DNA stock solutions;3, 5, 9, 13, 15: DNAs purified by silica wool; 1, 7, 8, 14, 16: DNAs purified by kits.

2.4 用石英棉离心法纯化的 DNA 片段的酶切效率

从琼脂糖凝胶中纯化的 DNA 一般都要进行酶切、酶连等 DNA 操作,以便克隆或表达。由石英棉回收的 DNA 对酶切效率是否有影响? 为了了解这一问题,比较了石英棉回收 DNA 和试剂盒方法回收 DNA 的酶切效率。

选用经试剂盒与石英棉回收的等量的 200bp 的 DNA 片段,经 *AlwN I* 酶切可获得 50 和 150bp 的片段。此外,选取 300bp 的 DNA 片段经 *Nde I* 酶切可获得 50 和 250bp 的片段,结果见图 3。

由图 3 的结果可知,由石英棉离心法回收的 DNA 片段的酶切效率与试剂盒法回收的 DNA 片段的酶切效率基本相同。

2.5 石英棉纯化 DNA 的酶连效率

2.5.1 石英棉纯化 DNA 与载体的连接效果: 在基因工程实验中,需将获得的的目的基因片段连接到克

隆载体、表达载体或 T 载体中。因而,检验石英棉回收后的 DNA 片段的连接效率是一项关键的指标。实验中选取合成的 84bp 两段基因的正负链,退火为双链 DNA,两条 DNA 片段的首尾为粘末端。经该方法纯化后,加入酶进行自连,获得 2 倍自连的 168bp 片段和 3 倍自连的 252bp 片段,通过电泳观察其连接效果,结果见图 4。由图 4 可知,经石英棉纯化得到的 DNA,可实现正常的酶催化连接反应。

2.5.2 连入石英棉离心法纯化 DNA 的表达载体的转化效率: 经石英棉纯化的 DNA 片段接入表达载体后,其转化效率是否与连入试剂盒回收 DNA 的表达载体存在差别,采用电转化法对此两个载体进行了转化,37℃ 培养 24h 后,比较各转化平板上的细胞克隆数,结果显示,石英棉回收 DNA 不影响载体的转化效率。

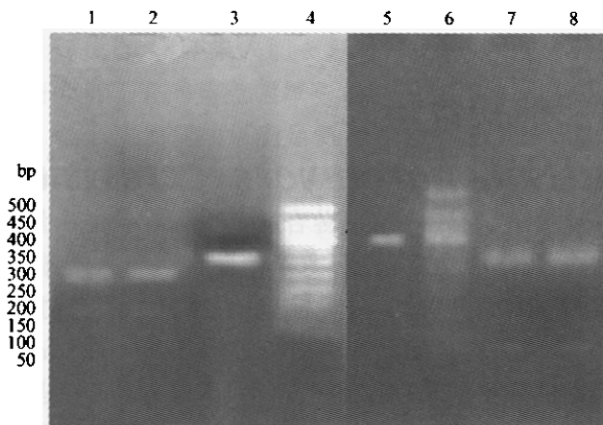


图3 200bp、300bp DNA 的酶切效率

Fig. 3 Enzymic digestion efficiencies of 200bp and 300bp of DNA

1, 8: DNAs purified by kits; 2, 7: DNAs purified by silica wool; 3, 5: DNAs stock solutions; 4, 6: 50bp marker.

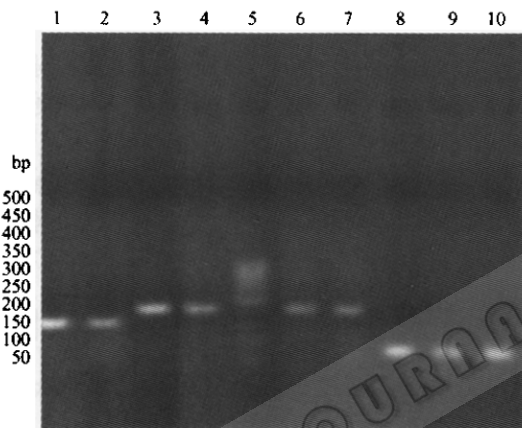


图4 84bp DNA 的酶连效率

Fig. 4 Linkage efficiencies of 84bp of DNA catalyzed by enzyme

1, 2: 168bp; 3, 4, 6 and 7: 252bp; 5: 50bp marker; 8, 10: 84bp.

3 讨论

传统的从琼脂糖凝胶中分离 DNA 的方法操作非常复杂^[4], 费时、费力, 近年来多采用试剂盒方法。试剂盒方法与传统的 DNA 分离方法相比虽然有了很大改进, 但价格仍然较贵, 所需时间仍然较长, 如从琼脂糖凝胶中纯化一次 DNA 约需 2h 左右。本研究所建立的石英棉或玻璃棉纯化方法, 每次纯化仅 2min, 价格仅几分钱, 省时、省力、省钱、操作简便。

在一定的电场条件下, 以适当浓度的凝胶介质作为电泳支持物, DNA 分子的迁移速率与其碱基对数的常用对数成反比^[5], 分子越大, 迁移越慢; DNA 的泳动速率与电场强度成正比^[6], 通过凝胶的分子筛作用, 大小不同的核酸分子泳动率出现较大差异, 达到分离目的^[7,8]。但当 DNA 分子大小超过一定范

围时, 这一简明的相关关系就会被破坏。

由于凝胶是一立体网络结构, 离心时在离心力的作用下, 小于网络孔径的 DNA 片段容易从凝胶中分离出来, 越小的片段越容易分离; 而大于网络孔径的 DNA 片段较难从凝胶中分离出来, 越大的越难分离。因此, 随着 DNA 片段增大, 回收率有降低的趋势。此外, 普通棉花和脱脂棉可能对 DNA 有较强的吸附能力, 从凝胶中游离出来的 DNA 可能被棉花或脱脂棉牢固的吸住, 因而离心所得溶液中回收不到 DNA 片段。

原来认为只有分子较小的 DNA 才能用此法纯化, 实验结果表明, 用此法纯化高达 300 个核苷酸的 DNA 的回收率仍高达约 85% ~ 90%, 明显高于试剂盒纯化的回收率。根据试验结果判断, 即使再大的 DNA 分子也能用这一技术高回收率地进行纯化, 如果把凝胶浓度降至常用的 1%, 则纯化的 DNA 分子更大。一般说来, 普通 DNA 纯化方法仅对大于 200 个碱基的 DNA 有效, 本实验中所用的试剂盒纯化技术分离 200bp DNA 的回收率约为 35% ~ 40%, 而分离小于 200bp 碱基 DNA 的回收率则明显太低, 甚至完全得不到所需的 DNA。故本项研究所建立的方法明显优于试剂盒纯化方法。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Branovic K, Forcic D, Ivancic J *et al*. Application of short monolithic columns for fast purification of plasmid DNA. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, **801**(2):331 - 337
- [2] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [3] Ausubel FM, Smith JA. *Short Protocols in Molecular Biology*. 3rd ed. John Wiley & Sons Inc, 1995, pp.287 - 288
- [4] Lu SD (卢圣栋). *Current Protocols for Molecular Biology*. In Beijing: Higher Education Publishing House, 1993, pp.124 - 155
- [5] Helling RB, Goodman HM, Boyer HW. Analysis of endonuclease R-EcoR I fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol*, 1974, **14**: 1235 - 1244
- [6] Calladine CR, Collis CM, Drew HR *et al* A study of electrophoretic mobility of DNA in agarose and polyacrylamide gels. *J Mol Biol*, 1991, **221**: 981 - 1005
- [7] Zhang LX (张龙翔), Zhang TF (张廷芳), Li LY (李令媛). *Methods and Protocols for Biochemistry*, 2nd ed. In Beijing: Higher Education Publishing House, 1997, pp.253 - 257
- [8] Aaij C, Borst P. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta*, 1972, **269**: 192 - 200