

# 碘化钾梯度离心在制备噬菌体 DNA 中的应用

曾伟强 李小兵

(中国科学院遗传研究所,北京)

通过氯化铯梯度离心除去细菌 DNA 及细菌残渣来分离纯化噬菌体颗粒是一种方便而有效的方法<sup>[2]</sup>。其唯一缺点是氯化铯价格昂贵。Blin 等人<sup>[1]</sup>报道说,可用碘化钾梯度离心法从琼脂糖电泳凝胶中回收 DNA。Smith<sup>[3]</sup>发展了 Blin 法,在碘化钾溶液中加入 1mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  以防止碘离子的氧化,使 DNA 稳定不受干扰。最近,我们把该法应用于分离纯化  $\lambda$  噬菌体的重组体 DNA,结果表明在噬菌体颗粒的梯度离心纯化过程中,完全可以用碘化钾替代氯化铯。

1.材料  $\lambda$  Charon 4A 重组体,系在 *Eco* RI 切点含有插入的外源人肝 DNA 片段,经我们用  $\alpha$ -干扰素  $^{32}\text{P}$  探针原位杂交法选出来的阳性株,命名为  $\phi 811$ 。

2.噬菌体的扩增培养 取  $\phi 811$  噬菌体贮备液 1—2 $\mu\text{l}$ ,用噬菌体缓冲液 (10mM  $\text{MgCl}_2$ , 10mM Tris-HCl pH 7.5) 稀释到  $10^{-6}$ ~ $10^{-7}$ ,取 0.1ml 稀释液与 0.2ml 对数生长中期的 LE392 细菌混合,于 37 $^\circ\text{C}$  保温 15—20 分钟后,加上 2.5—3ml 0.7% 软琼脂糖胶 (agarose 溶于培养基中,45—50 $^\circ\text{C}$ ),铺于 1.3% 的琼脂平皿上,37 $^\circ\text{C}$  培养 10 小时或过夜。可见噬菌斑近于汇合。向长有噬菌体的平皿注入 8ml 对数中期的 LE392 培养液,用刮勺捣碎软琼脂糖层,然后吸到三角瓶中 (500ml 三角瓶含 150ml 对数前中期培养菌),并加  $\text{MgCl}_2$  到 10mM 浓度。于 37 $^\circ\text{C}$  摇动培养过夜。次日,加入 1% 氯仿,并继续摇动 30—60 分钟。8,000rpm 离心 20 分钟,收集裂解上清液。裂解液的噬菌体效价在  $10^{11}$ PFU/ml 以上。上清液再经 25,000rpm

(BECKMAN LB-55 或 MSE75 离心机的 6  $\times$  100ml 容积转头)离心 1 小时,收集噬菌体颗粒沉淀。沉淀悬浮于 10—14ml 缓冲液中,用电磁搅拌器于 4 $^\circ\text{C}$  搅拌过夜。离心 6,000rpm 10 分钟以除去不溶解的沉渣。留下上清液做下一步梯度离心用。

3.碘化钾-硫代硫酸钠梯度离心 用噬菌体缓冲液配制新鲜的碘化钾溶液,并加入 1mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  以防  $\text{I}^-$  的氧化。铺梯度,由下向上,其浓度为 1.71 g/ml (饱和的)、1.5 g/ml、1.3g/ml、及 36% 蔗糖,各层为 6—8 ml。最上层为样品液 6—12 ml,以装满离心管为限,样品不够可加噬菌体缓冲液。于 MSE75 或 BECKMAN LB-55 离心机的悬挂式转头 (Swinging Bucket Rotor) 慢加速 25,000rpm 离心 2.5 小时。

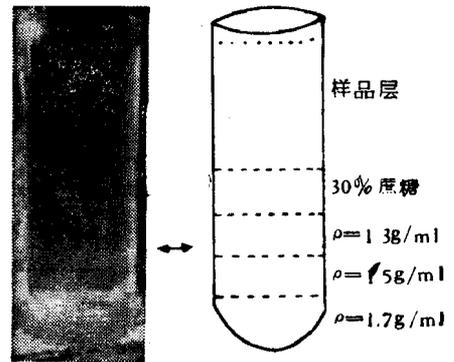


图1 右, KI- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  梯度示意。

左,离心 25K 2.5 小时后结果。

由上到下: 样品层, 36% 蔗糖  $\rho = 1.3\text{g/ml}$ ,  
 $\rho = 1.5\text{g/ml}$ ,  $\rho = 1.71\text{g/ml}$

注意, 停机时不能用刹车 (BRAKE OFF), 不然会搞混液层。在暗室白光束下可看到于 1.5 g/ml 的碘化钾梯度上部呈乳白色的噬菌体带 (图 1), 用长针头注射器吸取。用透析袋对噬菌体缓冲液透析过夜 (最好透析液加 1 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  并搅动)。透析后用核糖核酸酶 (RNase A, Sigma 产品) 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  37°C 消化 1 小时, 再用蛋白酶<sup>1)</sup> (proteinase K, MERCK 产品) 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  37°C 消化 1 小时。用等体积的新重蒸并用 TEN<sup>2)</sup> 饱和过的酚提取 3 次。水相加入 1/20 体积的 5M NaCl 及 3 倍体积乙醇 (-20°C) 沉淀 DNA。置 -20°C 2 小时以上, 离心收集 DNA 沉淀。乙醇沉淀可重复 4—5 次, 以利于下一步限制性酶切。图 2 为该法提取的  $\phi 811$  DNA 经 *Bam*HI、*Egl*II、*Eco*RI、*Hind*III 切割后的 1% 琼脂糖凝胶电泳图谱。对照为经 *Hind*III 切的  $\lambda$ DNA。从图谱上看该法所得结果条带清晰, 合乎要求。有如氯化铯梯度离心一样, 碘化钾梯度也可连续重复二次, 所得 DNA 纯度会更好。图 2 对照  $\lambda$ DNA 实际上是经 2 次梯度离心纯化的, 其背景要比只经 1 次梯度离心的  $\phi 811$  DNA 清晰。但就一般做 DNA 绘制限制图谱或系列分析, 只经一次梯度离心就足够了。

我们的体会是: 噬菌体颗粒的回收得率及纯度, 本法与氯化铯法相似。关键在于扩增后的裂解液的噬菌体效价要高, 最好是  $10^{11}$  PFU/ml 以上, 若效价低于  $10^{10}$  PFU/ml, 则没有做

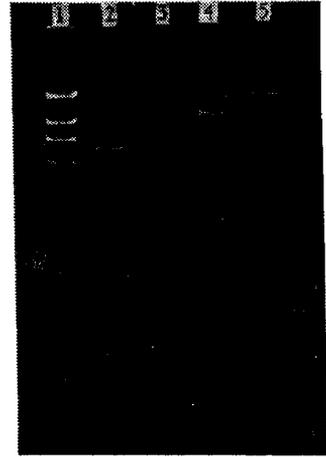


图 2 1% agarose 凝胶电泳溴化乙锭染色结果  
(1)  $\lambda$ DNA + *Hind*III 切; (2)  $\phi 811$ DNA + *Bam*HI 切;  
(3)  $\phi 811$ DNA + *Bgl*II 切; (4)  $\phi 811$ DNA + *Eco*RI 切  
(5)  $\phi 811$ DNA + *Hind*III 切。

梯度离心的必要。还有, DNA 放置碘化钾溶液中的时间不要太长, 配碘化钾溶液、离心及透析要在一天内完成。

### 参 考 文 献

- [1] Blin, N. et al.: 1975. *FEBS Lett.* 53, 84.
- [2] Robert, F. Schleif and Pieter, C. Wensink: *In Practical Methods in Molecular Biology*, Springer-Verlag, New York Inc., pp. 33—35.
- [3] Smith, H. O: *Methods in Enzymology*, Vol. 65, pp.357—377.

- 1) 不使用蛋白酶实际上也可以。因 RNase A 不能完全消化 RNA, 所以必要时最好同时加 RNase T1, 或用凝胶柱过滤去除 RNA 污染。
- 2) TEN: 10mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA。

(上接第 33 页)

### 参 考 文 献

- [1] 高士廉: 1980. 实用解剖学图谱, 四分册 (上肢), 上海科技出版社, 176—196 页。
- [2] 北京积水潭医院手外科学编写组: 1979. 手外科学, 人民卫生出版社, 37—38 页。
- [3] 陈敬焕等: 1983. 遗传, 5(4): 36—38。

- [4] 蒋左庶等: 1981. 遗传疾病分类系统与国外文献索引, 80—81 页。
- [5] 肖坤则等: 1981. 中华医学杂志, 61 (12): 758—761。
- [6] C. 斯特恩 (吴曼译): 1979. 人类遗传学原理, 科学出版社, 95 页。
- [7] Fitch: 1980. 国外医学, 遗传学分册, (3): 148。
- [8] Mckusick, V. A.: 1979. *Mendelian Inheritance in Man*, 5th ed., p.80—81。