

不同酶切体系对胶回收纯化 DNA 浓度的影响

徐 珍 张玉芹 聂永莉

摘 要 目的 通过建立不同的酶切体系,找寻酶切效果好、胶回收试剂盒纯化 DNA 得率高的实验设计。方法 使用 Xho I 单酶切重组质粒 pcDNA3 - P₂X₄,酶切体系的体积分别为:150 μ l、160 μ l、170 μ l、180 μ l;酶切体系组成为:dddH₂O(补足体积)、Buffer R(应用浓度是酶切体积的 10%)、质粒 DNA(无论所得质粒浓度如何,琼脂糖凝胶电泳胶回收的 DNA 上样量统一为 23 μ g),Xho I 10 μ l(6 μ l、4 μ l 两次加入);反应温度为:37℃;酶切的时间为 2~3h。结果 酶切体系越大,所需要的酶切时间越短、酶切效果越好、酶切条带越接近 Marker 标准条带(通过电泳拍照观察所得),但是胶回收纯化后 DNA 的浓度却越低:150 μ l 体系 DNA 的浓度 = 308.96 $\pm$ 8.71 μ g/ml,160 μ l 体系 DNA 的浓度 = 286.62 $\pm$ 8.37 μ g/ml,170 μ l 体系 DNA 的浓度 = 245.80 $\pm$ 15.64 μ g/ml,180 μ l 体系 DNA 的浓度 = 198.00 $\pm$ 16.54 μ g/ml(方差分析, $P < 0.05$, $n = 5$)。结论 将酶切的体系放大,杂质将相对稀释,不需增加酶的用量就能取得较好的酶切效果;提取质粒的浓度和纯度也决定着酶切效果。

关键词 琼脂糖凝胶电泳 胶回收 单酶切 DNA 纯化

Effects of Different Enzyme Systems on Concentration of DNA Purified by Gel. Xu Zhen, Zhang Yuqin, Nie Yongli. Institute of Cell and Molecular Biology, Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Hubei 430065, China

Abstract Objective To find good digestion results as well as the high rate of purification of DNA gel extraction kit through establishing different enzyme systems. **Methods** Single - enzyme(Xho I) digestion recombinant plasmid pcDNA3 - P₂X₄ was established by the volume of enzyme system of 150 μ l, 160 μ l, 170 μ l, 180 μ l respectively. Composition of the digest system was dddH₂O (fill volume), Buffer R (application of the concentration of enzyme volume 10%), plasmid DNA (no matter what the concentration was, sample volume on the unification of DNA gel recovery was always 23 μ g), Xho I 10 μ l(6 μ l,4 μ l, adding seperatly). Reaction temperature was 37℃ and digestion time was 2~3h. **Results** The the greater digestion system was that the shorter the time required for digestion, the better the digestion was and the closer the digestion band was to the standard Marker bands (photographed by electrophoresis observations). However, the concentration of gel purified DNA was low as following: DNA concentration of 150 μ l system = 308.96 $\pm$ 8.71 μ g/ml, DNA concentration of 160 μ l system = 286.62 $\pm$ 8.37 μ g/ml, DNA concentration of 170 μ l system = 245.80 $\pm$ 15.64 μ g/ml, DNA concentration of 180 μ l system = 198.00 $\pm$ 16.54 μ g/ml (One - Way ANOVA, $P < 0.05$, $n = 5$). **Conclusion** Enlarging the digestion system, would lead to impurities be relatively diluted and would be able to achieve better result without increasing the amount of enzyme. The concentration and purity of extracted plasmid also determined the digestion results.

Key words Agarose gel electrophoresis; Plastic recycling; Single enzyme; DNA Purification

琼脂糖凝胶作为电泳支持介质,发挥分子筛功能,使得大小和构象不同的核酸分子的迁移率出现较大差异,从而达到分离的目的^[1]。普遍使用琼脂糖凝胶电泳来显示分子生物学实验结果,将微观物质转为肉眼可识别内容,并通过电泳图判断是否进行下一步实验。琼脂糖凝胶电泳图可展现的内容包括:质粒

的纯度和亮度、有无蛋白污染,酶切条带质地是否均匀、有无其他杂带,纯化后 DNA 模板的纯度和亮度,转录出 RNA 的条带数和亮度等。近些年各种新颖的纯化方法层出不穷,我们也汲取各家所长,综合分析并结合自身条件,选择一种适合自己的优化方法。有两种 DNA 纯化方法既简单又方便:一种是挤压回收法,另外一种为碳酸钙沉淀法^[2,3]。其他常用的 DNA 片段回收方法有:透析袋电洗脱凝胶块法、DEAE - 纤维素膜转移法和低熔点琼脂糖凝胶回收法、凝胶冻融法。数种回收试剂盒中,常用的有树脂化系统、玻璃珠纯化系统^[4]。我们选择从低熔点琼脂糖凝胶中回收纯化酶切后的 DNA 片段,利用 DNA 在高盐缓冲体系中可以被特殊硅基质材料吸附,并可随后被去离子

基金项目:湖北省自然科学基金(2004ABA152);湖北省教育厅重点项目(D20081108)

作者单位:430065 武汉科技大学医学院细胞与分子生物学研究所(徐珍、张玉芹、聂永莉);442700 湖北省丹江口汉江集团汉江医院心内科(聂永莉)

通讯作者:徐珍,电子信箱:jiafeiandjane@126.com;张玉芹,电子信箱:zhangyuqin@wust.edu.cn

水或低盐缓冲液洗脱的原理。常用的酶切体系为: 100 ~ 200 μ l; 酶切的 DNA 用量为 23 μ g; 由于所需要的 DNA 片段的含量极其有限, 如果浓度太低就不能满足下一步实验的要求。所以我们比较不同的酶切体系对胶回收纯化所得 DNA 终浓度的影响, 最终目标是为了得到浓度高于 0.2 μ g/ μ l 的 DNA 模板进行转录。

材料与方法

1. 质粒: 3 个月以上未取过卵的成熟的雌性非洲爪蟾(购于中国科学院遗传与发育研究所)。重组质粒 pcDNA3 - P₂X₄ 由李超英教授馈赠(AstraZeneca CNS Discovery, 1800 Concord Pike, A133, P. O. Box15437, Wilmington, DE19850 - 5437), 其构建者为 Dr. G. Buell (Glaxo Institute for Molecular Biology)。

2. 实验药品及试剂盒: Plasmid isolation kit; BioDev; Xho I; Fermentas; DNA Purification kit, from gel; BioDev; T7 mMESSAGE mMACHINE Transcription kit; Ambion; 其他试剂为国药集团分析纯试剂。

3. 实验仪器: Ohaus Adventure 电子分析天平; 奥豪斯上海公司; 高速台式离心机(TGL - 16G); 上海安亭科学仪器厂; 凝胶成像分析系统: Gene 公司; 隔水式恒温培养箱(GNP - 9050 型); 上海精宏实验设备有限公司; 电泳仪(DYY - 10 型); 北京六一仪器厂; 恒温培养振荡器(ZHWY - 100C); 上海智城分析仪器制造有限公司; 单面净化工作台(SW - CJ - 1FD); 苏州净化设备有限公司制造; 电热恒温水槽(DK - 8D 型); 上海精宏实验设备有限公司; Biophotometer 核酸测定仪; Eppendorf 公司。

4. 转化和质粒提取: CaCl₂ 法制备感受态细菌, 将重组质粒转化 E. coli DH5 α , 两次抗生素抗性筛选转化细菌, 划线接种后, 转入液体培养基中培养。然后 B 型小量质粒快速提取试剂盒制备并纯化质粒 DNA, Xho I 单酶切鉴定, 以没有酶切的质粒为对照。

5. 试酶切: 因为完全酶切需要大剂量的酶, 如果酶切失败, 所用酶会造成经济浪费, 于是在完全酶切之前, 使用小剂量的酶切质粒 DNA, 能切开就进行完全酶切步骤。试酶切主要用来预测完全酶切的成功率。试酶切体系(Xho I 单酶切鉴定, 30 μ l): dddH₂O: 24 μ l; 10 $\times$ Buffer: 3 μ l; DNA: 2 μ l; Xho I: 1 μ l。

6. 完全酶切: 试酶切体系完成后, 放入 37 $^{\circ}$ C 水浴槽内孵育 2h。以没有酶切的质粒作为对照, 电泳监测酶切效果。酶切出一条质地均匀的条带, 即可进行质粒 DNA 的线性化。完全酶切体系一般采用 100 ~ 200 μ l 体系。由于本实验室历届实验人员操作存在个体差异性, 不同人使用的酶切体系不一样, 实验结果都是成功的, 只是胶回收纯化 DNA 浓度不一样, 所以本人设计实验分析不同酶切体系对胶回收纯化 DNA 浓度的影响。实验室历年采用的 4 个酶切体系分别是 150 μ l、160 μ l、170 μ l、180 μ l; 10 $\times$ buffer 稀释成 1 $\times$ buffer; 无论提取的

质粒 DNA 的浓度为多少, 统一核算成 23 μ gDNA。1 μ l 酶通常可切开 2 μ gDNA, 通常使用 10 μ l 的酶, 分两个时段添加(6 μ l 1h, 4 μ l 2h)。加样顺序是三蒸水 - 10 $\times$ buffer - DNA - 酶, 各组加完后用枪头混合均匀, 并用离心机低转速数秒将溶液离心到管底, 最后放入 37 $^{\circ}$ C 水浴槽内反应 3h, 电泳显示酶切成功, 然后加入点样液或者 80 $^{\circ}$ C 水浴 20min 使酶失活。

7. 线性 DNA 的纯化: 建立 4 种酶切体系线性化提取的质粒 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳后紫外灯下切胶, 用 B 型小量 DNA 片段快速胶回收试剂盒回收, 以纯化转录模板。或者使用苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提纯化 DNA。

8. 体外转录和 RNA 的纯化: 转录反应按 mMESSAGE mMACHINE T7 RNA Transcription Kit 操作流程进行, 取 1 μ l 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后进行 RNA 的纯化, 取 RNA 1 μ l 测浓度并将其稀释至所需要浓度(1 ng/ μ l)备用。

结 果

1.4 种酶切体系的电泳结果: 电泳结果表明, 酶切体系越大, 酶切的效果越好, 条带越接近 Marker(图 1)。

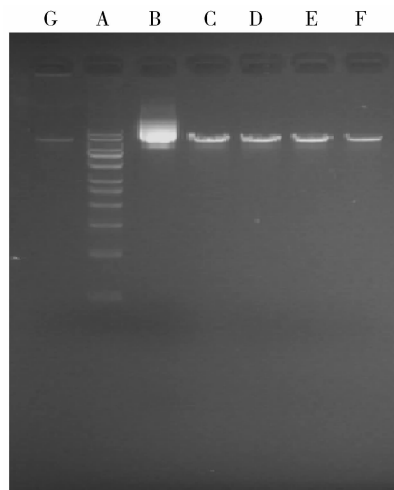


图 1 4 种酶切体系单酶切的结果电泳图

A. Marker; B. 没有酶切的质粒 DNA(酶切前); C. 150 μ l 酶切体系; D. 160 μ l 体系; E. 170 μ l 体系; F. 180 μ l 体系; G. 纯化后 DNA 模板

2. 质粒 DNA 酶切不完全的电泳结果: 酶切不完全与提取质粒 DNA 的浓度和纯度有关, 通常酶切的时间为 2 ~ 3h, 如果延长酶切的时间 1 ~ 2h, DNA 片段将会被切碎(图 2)。

3.4 种不同酶切的体系对胶回收 DNA 片段浓度的影响: 150 μ l 酶切体系胶回收试剂盒纯化所得 DNA 片段浓度最高, 180 μ l 酶切体系所得 DNA 浓度最低。

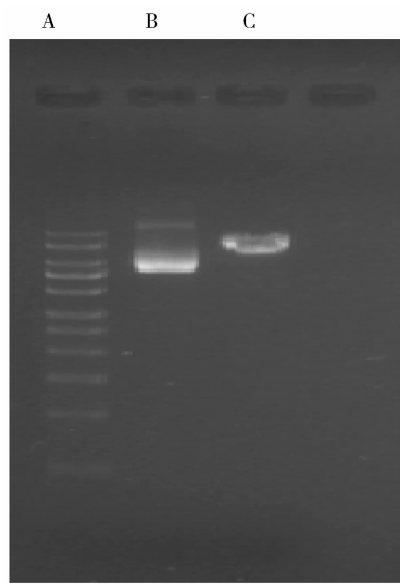


图 2 质粒酶切不完全的电泳图

A. Marker; B. 质粒 DNA; C. 酶切不彻底的 DNA 片段

我们观察了 4 种不同酶切体系对胶回收 DNA 片段浓度的影响,通过方差分析 4 组数据,组间比较都具有显著性差异(表 1)。

表 1 4 种不同酶切体系对胶回收 DNA 浓度的影响

酶切体系 (μl)	胶回收所得 DNA 片段浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)						$\bar{x} \pm s$
150	315.20	302.40	299.80	306.90	320.50		$308.96 \pm 8.71^*$
160	298.60	280.70	277.50	290.80	285.50		$286.62 \pm 8.37^*$
170	242.40	256.70	266.80	232.20	230.90		$245.80 \pm 15.64^*$
180	200.50	198.60	170.20	208.10	212.60		$198.00 \pm 16.54^*$

* $P < 0.05$

4. 抽提纯化和胶回收试剂盒纯化所得 DNA 的浓度和纯度:抽提纯化后 DNA 的浓度高,但是纯度较低;离心柱吸附法(胶回收试剂盒)纯化后 DNA 的浓度低,但是纯度高。通过两独立样本的均数比较,差异具有显著性(表 2)。

表 2 两种不同纯化方法对 DNA 纯度和浓度的影响

线性 DNA 纯化方法	纯化后 DNA 的浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)/纯度 (260/280)						$\bar{x} \pm s$
抽提纯化	464.10/1.73	430.50/1.83	425.60/1.88	460.00/1.75	416.40/1.90		439.32 ± 21.41
离心柱吸附法	263.20/1.96	255.60/1.99	306.50/2.00	269.80/1.93	289.70/1.98		$276.96 \pm 20.81^*$

* $P < 0.05$

5. 两种 DNA 纯化方法所得 DNA 片段转录成 RNA 的浓度比较:抽提纯化法纯化后 DNA 模板转录成 RNA 的浓度高于离心柱吸附法,通过两独立样本的均数比较,具有显著性差异(表 3)。

表 3 两种纯化方法对 DNA-RNA 转录率的影响

线性 DNA 纯化方法	转录产物 RNA 的 浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)						$\bar{x} \pm s$
抽提纯化	8.90	12.20	15.80	18.00	10.60		13.10 ± 3.74
离心柱吸附法	22.60	25.10	20.90	16.70	26.40		$22.34 \pm 3.81^*$

* $P < 0.05$

讨 论

非洲爪蟾(xenopus laevis)卵母细胞是一种应用最早、表达功能强大、适用范围广的基因表达体系之一。早期主要用它来表达珠蛋白、球蛋白、各种病毒蛋白等,后来,发现不同类型的离子通道和受体蛋白也可在爪蟾卵母细胞中表达。这种细胞不仅能有效和精确地翻译外来的 RNA,还能完成翻译后的加工,如糖基化、磷酸化、蛋白裂解和向细胞膜转运等步骤,

最终使表达的蛋白质显示一定的功能。爪蟾卵母细胞表达的受体(或通道)可结合电生理实验进一步研究受体(通道)的功能、调制等。为了实现对 ATP 受体的研究,我们建立 4 种酶切体系来研究酶切条件对胶回收纯化所得 DNA 终浓度的影响。4 种酶切体系酶切 23 μg DNA,加入 10 μl Xho I。孙连魁等人研究内切酶 Xho I 部分氨基酸残基的化学修饰中得出:赖氨酸和精氨酸皆为 Xho I 的活性位点的必需基团,它们也许为酸和底物的结合所必需,或与催化作用有关。巯基不但为酶的活性所必需,而且在酶的活性中心,可能参与酶的催化作用,也可能与保持酶的空间构象有关^[5]。在我们的研究中发现,酶切体系越大,酶切时间越短,酶切效果越好,酶切条带越接近 Marker 标准条带(图 1),将酶切体系放大,杂质将相对稀释,不需增加酶量就能取得较好的酶切效果。但是随着酶切体系的增大,胶回收纯化后 DNA 浓度却越低(表 1)。同时发现提取的质粒 DNA 片段的纯度不高,因此,在进行酶切时就很难酶切完全,如果延长酶切时间, DNA 片段将会被切碎,从而很难进行胶回收(图

2)。

经典纯化法用苯酚/氯仿抽提去除蛋白,再用乙醇沉淀收集质粒 DNA。离心柱吸附法选用特异的核酸吸附材料硅胶膜吸附质粒,结合高速离心去除蛋白和其他杂质的污染。我们比较两种纯化方法所得的 DNA 浓度和纯度(表 2),发现各有利弊。抽提纯化 DNA 终浓度比较高,但是纯度低;胶回收纯化得率很低,但是纯度非常高。于是我们进一步设计了比较实验,将所得的 DNA 用转录试剂盒转录成 RNA,通过比较所得转录产物 RNA 的浓度来选择比较优化的 DNA 纯化方法。结果发现离心柱吸附法(胶回收纯化法)的 DNA 转录率显著高于抽提纯化法(表 3)。我们进行分子生物学实验目的是获得高浓度的 P2X₄嘌呤受体的 RNA,将其微量注射到具有完整表达体系的非洲爪蟾卵母细胞中进行表达,从而翻译出我们所要研究 P₂X₄嘌呤受体(ATP 受体的亚型之一),因此,高浓度的 RNA 的获得是我们后续电生理(电压钳技术)实验得以顺利进行的前提。通过反复研究比较,我们认为,配体门控通道的质粒转录成 RNA 的过程中,选择胶回收方法纯化 DNA 更有利于获得较高浓度的 RNA。

综上所述,比较 150 μ l、160 μ l、170 μ l、180 μ l 4 种酶切体系中:180 μ l 的酶切效果最好,由于将酶切体系放大,杂质将相对稀释,不需增加酶的用量就能取得较好的酶切效果。同时,在我们的实验中还发现,

提取质粒 DNA 片段的纯度低就很难酶切完全,如果延长酶切的时间 1~2h, DNA 片段将会被切碎。我们的目的是获得高浓度的纯化 DNA 片段,由于 150 μ l 酶切体系胶回收纯化 DNA 片段浓度最高,所以选用 150 μ l 体系。比较两种 DNA 纯化方法:苯酚/氯仿抽提纯化和离心柱吸附法(胶回收试剂盒),结果显示,抽提纯化 DNA 片段的浓度高、纯度低;离心柱吸附法浓度低、纯度高。将两种纯化方法所得 DNA 片段进一步转录成 RNA,离心柱吸附法转录成 RNA 的浓度较高。我们研究的 P₂X₄受体来自于非洲爪蟾卵母细胞对相应 RNA 的翻译,所以选择离心柱吸附法(胶回收方法)纯化 DNA 片段。

参考文献

- 1 刘水平,罗志勇. 琼脂糖凝胶电泳实验技巧. 实用预防医学, 2006, 13(4):1068
- 2 薛仁镐,金圣爱,孙世孟,等. 琼脂糖凝胶中 DNA 片段的挤压回收法. 生物技术, 2006, 16(3):50-51
- 3 曹阳,董晓宇,姜国斌,等. 碳酸钙沉淀法回收琼脂糖凝胶中 DNA 的探讨. 生物技术, 2004, 14(2):28-29
- 4 谭艳平,杨玖英,朱英国,等. 琼脂糖电泳凝胶中回收微量 DNA 片段的新方法. 中南民族大学学报(自然科学版), 2004, 23(1):10-13
- 5 孙连魁,殷剑宁. 内切酶 XhoI 部分氨基酸残基的化学修饰. 西北大学学报, 1990, 20(1):65-71

(收稿:2010-04-24)

(修回:2010-06-28)

改良人骨髓间充质干细胞分离方法提高细胞定向分化能力

张 卉 董学君 邵健忠 项黎新

摘 要 **目的** 改良人骨髓间充质干细胞(hBM-MSCs)分离方法,提高细胞定向分化能力。**方法** 用密度梯度离心法从少量人骨髓中分离得到单个核细胞,贴壁培养 3 天后换液,实验组换液后 72h 内每隔 12h 更换新鲜培养液,传代时胰蛋白酶 37℃ 作用 2min 后终止消化;对照组未经频繁换液,胰蛋白酶消化 3min。镜下观察分离细胞的形态变化。用成骨、脂肪和软骨细胞诱导液诱导两组第 3 代(P3)细胞分化,碱性磷酸酶钙钴染色法、茜素红染色法和 Von Kossa 银染色法检测成骨细胞分化;油红 O 染色法检测脂肪细胞分化;阿尔新蓝染色法检测软骨细胞分化。**结果** 首次换液 72h 后,实验组与对照组相比,贴壁细胞数量较少

基金项目:浙江省省部共建项目(WKJ2007-2-037);浙江省自然科学基金项目(Y2090337)

作者单位:325035 温州医学院检验医学院(张卉);312000 浙江省绍兴市人民医院(张卉、董学君);310058 杭州,浙江大学生命科学院(邵健忠、项黎新)

通讯作者:董学君,电子信箱:dxj9666@163.com