DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.053
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

文章编号:1000-5404(2002)04-0491-02

经验交流

高温变性对双链 DNA 分子的损害

Doublestranded DNA damage under high temperature

朱军民,饶贤才,胡福泉 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程重点实验室,重庆 400038)

高温变性是实验室常用的方法,如用煮沸法提取质粒DNA,用煮沸法变性DNA检测样品或DNA双链探针,以及在PCR中使用94 ℃变性模板等[1~3]。这给我们留下一个强烈印象:即核苷酸链是耐高温以至可以接受煮沸处理的。基于这一事实,最近我们使用煮沸法来灭菌欲无菌保存的DNA样品,结果意外发现100 ℃加温处理可以不同程度地损害DNA分子,引起了我们对高温变性处理双链DNA分子的高度重视,特设计实验观察高温对DNA损害的程度以及高温对不同来源DNA的损害是否有差异。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

铜绿假单胞菌PA6(本研究室从临床分离株)基因组DNA,约6.3 Mb;铜绿假单胞菌噬菌体PaP1(本研究室自行分离)基因组DNA,约47 kb;pFAST HTa质粒DNA,约4.8 kb。上述DNA按常规方法提取,置-20℃保存备用。

模板pFAST T38质粒为本室自己构建的表达载体,约5.0 kb,10× PCR缓冲液,$MgCl_2$,dNTP,Taq酶等为上海生工产品,PCR上下游引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 94 ℃和100 ℃热变性双链DNA方法

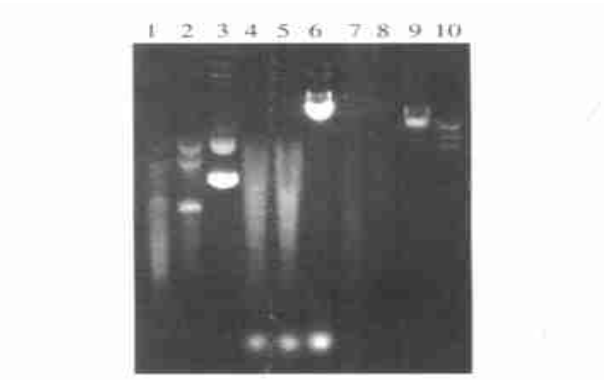
取PA6基因组DNA,PaP1噬菌体基因组DNA,pFAST HTa质粒DNA各10 μl,分别在94 ℃和100 ℃下变性5 min,然后以未变性处理的DNA为对照,在1%的琼脂糖凝胶上电泳1 h,紫外线下观察结果,摄像保存。

1.3 94 ℃和90 ℃PCR方法

观察94 ℃和90 ℃下完成PCR的方法是以pFAST T38质粒DNA为模板,取模板DNA 5 μl,加入PCR上下游引物各1 μl,再加入各PCR所需成分组成25 μl体系,分别在94 ℃和90 ℃变性条件下做PCR。PCR条件为94 ℃(或90 ℃)始变性3 min,94 ℃(或90 ℃)变性40 s,58 ℃退火40 s,72 ℃延伸40 s,共30个循环,72 ℃延伸10 min。然后各取5 μl在1%的琼脂糖凝胶上电泳1 h,在紫外线下观察结果,摄像保存。

2 结果和讨论

图1为94 ℃和100 ℃热变性双链DNA电泳结果图。由图1可见,不管是100 ℃还是94 ℃加温处理DNA 5 min后,双链DNA都受到了明显的损害。在图片上主要表现为模糊一片的拖尾现象,环状的质粒DNA分子对高温处理的耐受性较强一些,尚可看到一定带型,而细菌基因组DNA及噬菌体基因组DNA已经完全看不到带型。而且似乎分子量越大,热变性引起的损害越严重。图片上显示的DNA损害现象很难解释为是高温引起的"环状卷曲"(Cyclic coiled)的不可逆变性(Irreversible denaturation)[4],而是DNA链已经断裂为大小不等的小片段甚至是寡核苷酸片断。



1:λDNA/*Hind* Ⅲ marker;2~4:铜绿假单胞菌PA6基因组DNA未变性和94 ℃、100 ℃变性5 min;5~7:噬菌体PaP1基因组DNA未变性和94 ℃、100 ℃变性5 min;8~10:pFAST HTa质粒DNA未变性和94 ℃、100 ℃变性5 min

图1 94 ℃和100 ℃热变性双链DNA电泳图

从上述可以看出高温可引起DNA分子的严重损害是一种不争的事实,但用高温甚至煮沸变性DNA成功地应用于许多经典实验中同样也是不争的事实。问题的关键是要充分认识到高温处理对DNA损害的严重程度和在不同的实验中正确地使用高温变性DNA这一方法。

以下就怎样使用高温处理DNA提出几点看法:

(1)由于DNA溶液具有260 nm紫外吸收峰,故根据DNA链的"增色效应"(Hyperchromic effect)曲线,也称为解链曲线[5],见图2。可见90 ℃变性处理其实已经可以使DNA双链充分解链,也就是说,其实在很多实验中没有必要用高达100 ℃的温度来做DNA的变性处理。

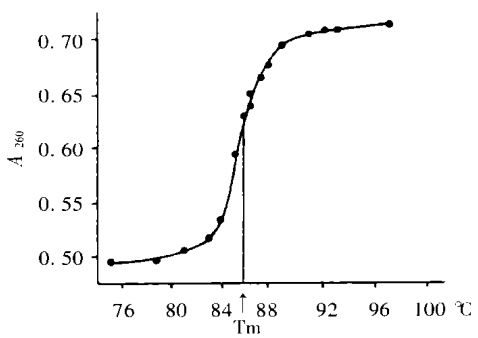


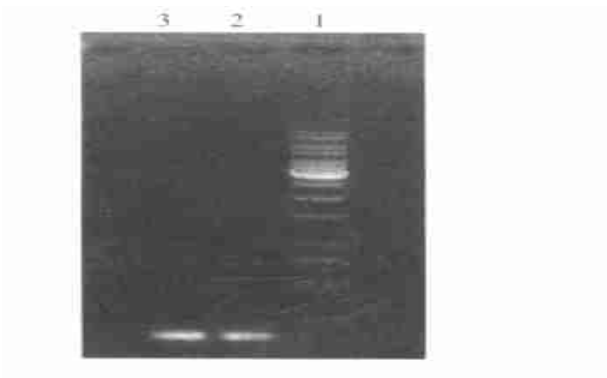
图2 DNA解链曲线

作者简介:朱军民(1975—),男,天津市人,硕士研究生,助教,主要从事微生物学方面的研究。电话:(023)68752239

收稿日期:2002-01-22;修回日期:2002-03-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(2)在 PCR 实验中通常使用 94 ℃来变性,这一变性温度可成功地进行 PCR 扩增已在千千万万的实验室中得到证实,这是因为在 PCR 实验中 94 ℃变性的时间通常是短暂的。新近生产的高质量 PCR 仪每一循环中的 94 ℃变性时间可短至 10 s 甚至更少,这样 25 ~ 30 个循环的累加 94 ℃处理时间不到 5 min,对 DNA 的损害是轻微的。在旧式 PCR 仪中,94 ℃变性时间达 1 min,30 个循环的 94 ℃变性累积时间为 30 min,但每个循环中 DNA 分子接受 94 ℃作用的时间是短暂的,即使在每个循环中有少量 DNA 分子受损,生成的大量产物可作为后续循环中的模板,因此 94 ℃可成功地用于 PCR 扩增是可以理解的。但根据DNA 解链曲线,可以认为对于大多数模板,温度低至 90 ℃[6,7],应该同样可进行成功的 PCR 扩增。图 3 反映的就是用 90 ℃和 94 ℃变性完成的 PCR 扩增结果。可见 90 ℃和 94 ℃ PCR 结果是一致的,都扩增出约 150 bp 的目的片断。这说明 90 ℃变性处理也能很好地完成 PCR 的扩增。较低的温度对于保持 Taq 酶的活性,提高 PCR 产量是有帮助的。



1: 1 kb DNA marker; 2: 94 ℃ PCR 扩增产物; 3: 90 ℃ PCR 扩增产物

图 3 94 ℃和 90 ℃ PCR 结果电泳图

(3)此外,在杂交实验中,人们常常用 100 ℃来处理欲杂交样品。可以理解,100 ℃处理样品(如裂解细菌)后,仍然可能获得阳性杂交,这是因为即使样品中的 DNA 分子断裂为一些小片段,只要这些片段仍然在近 20 bp 以上,仍可能继续与探针结合,获得阳性杂交结果。但如果使用 100 ℃变性 5 min 以上来处理双链 DNA 探针,显然是不恰当的,因为这种处理会明显地损害探针,使探针断裂为很小的片段,这可能会导致实验失败,或降低杂交实验的特异性。

(4)不推荐使用 100 ℃来灭菌欲保存的 DNA 样品。因为 100 ℃处理的时间少于 5 min 通常达不到灭菌目的,如果延长时间达 5 min 以上,肯定会引起 DNA 分子严重的不可接受的损害,影响其今后实验的准确性。

关键词:热变性;双链 DNA;DNA 损害

中图法分类号:Q523 文献标识码:B

参考文献:

[1] J 萨姆布鲁克,EF 弗里奇,T 曼尼阿蒂斯 主编. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社,1996. 22-23,488,680-683.

[2] F 奥斯伯,R 布伦特,RE 金斯顿 主编. 精编分子生物学实验指南[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社,1998. 18-19,61-64,589-591.

[3] 卢圣栋,李尹雄,胡晓年 主编. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京:中国协和医科大学出版社,1999. 112-113,212,458-463.

[4] Joseph Sambrook, David Russell, *et al*. Molecular Cloning(Third Edition)[M]. NewYork: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 1. 45, 7. 43

[5] 周爱儒,查锡良,于秉治 主编. 生物化学[M]. 第 5 版. 北京:人民卫生出版社,2001. 45-46.

[6] 孙志贤,汲言山,王开启 主编. 现代生物化学理论与研究技术[M]. 北京:军事医学科学出版社,1995. 422

[7] 严 杰,罗海波,陆德源 主编. 现代微生物学实验技术及其应用[M]. 北京:人民卫生出版社,1997. 3-7.

(编辑 冷怀明)

消息

First Turkish & United States Forensic Sciences Meeting

Istanbul-Turkey September 9-13, 2002

Sponsored By: The state institute of forensic medicine, Ministry of justice, Turkey

Meeting Place: The Conference Center of Ministry of Justice, Istanbul, Turkey

This first meeting is aiming to collaborate Turkish and United States Forensic Scientists for exchanging forensic knowledge and experiences and to discuss the updated methods and technology of Forensic Sciences.

Chairpersons: Prof. Oguz POLAT, M. D. Director The State Institute of Forensic Medicine, Ministry of Justice of Turkey ouzpol@yahoo. com

Thomas T. NOGUCHI, M. D. Emeritus Professor University of Southern California Los Angeles County Chief Medical Examiner-Coroner (Retired) noguchitt@aol. com

Contact Person: Nevzat Alkan, M. D. The State Institute of Forensic Medicine, Ministry of Justice of Turkey Phones Work 00 90 212 635 1179 Home 00 90 212 543 9444 and 00 90 212 660 2926 Fax: 00 90 212 526 736 E-mail: alkannn@turk. net Web address: www. atk. gov. tr

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net