DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.07.027
第21卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 21, No. 7
1999年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 1999

技术方法

一种改良的质粒DNA的快速提取方法*

An improved method for rapid isolation of plasmid DNA

刘贤华** 白晓军*** 胡川闽 王军平 袁永萍 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所)
重庆,400038

提 要 目的:建立一种确实有效的更实用的小量质粒DNA的提取方法。方法:将一含有目的质粒的大肠杆菌扩增后采用改良后的方法提取质粒DNA,然后采用紫外分光光度计测定含量,并且进行酶切。结果:每毫升原细菌培养物质粒DNA的产量明显增高,且酶切效果极好。结论:改良后的质粒DNA提取法具有速度快、收获量多、纯度高、经济又方便等优点,适合于应用与推广。

质粒DNA的提取是分子生物学研究中的基本技术,有关质粒DNA的提取已有不少方法。本文所介绍的是经我所反复实践,现已常规应用的基于碱裂解法[1]的一种改良的质粒DNA的快速提取方法。它主要有4个优点:①速度极快;②质粒DNA的收获量多,纯度高,可直接用于酶切、克隆等;③所配试剂可长时间保存,随时可进行质粒DNA的提取;④不需用特殊试剂,很大程度上节约了经费。

1 材料和方法

试剂及配制:① Ⅰ号液:8%蔗糖+50 mmol/L EDTA+2% Tritonx-100;② Ⅱ号液:0.2 mol/L NaOH;③ Ⅲ号液:3 mol/L NaAC pH4.8;④ Ⅳ号液:1 mol/L Tris;⑤平衡酚;⑥70%酒精;⑦24∶1的氯仿∶异戊醇;⑧异丙醇。

操作步骤:①从琼脂平板上挑取一含有目的质粒的大肠杆菌单菌落接种到标准LB培养基(每1 ml培养基含氨苄青100 mg)中生长12 h左右。②收集细菌,5 000 r/min离心5min(3 ml菌液,分2次离心),弃上清。③沉淀中加Ⅰ号液150 μl,充分弹匀,使细菌分散良好。④加Ⅱ号液300 μl,颠倒数次,使之混成稠糊状。⑤加Ⅲ号液150 μl,轻柔混匀。⑥加Ⅳ号液150 μl,轻柔混匀后,12 000 r/min离心10 min,取上清,弃沉淀。⑦加RNase酶(10 mg/ml)1 μl,55℃水浴5 min。⑧等体积酚与氯仿∶异戊醇1∶1抽提,12 000 r/min离心10 min。⑨吸上层水相,加0.5 ml异丙醇沉淀质粒,12 000 r/min离心15 min,弃上清。⑩70%冻乙醇洗沉淀,12 000 r/min离心10 min。⑪弃乙醇,自然干燥。⑫将质粒DNA溶于20 μl灭菌双蒸水中,紫外分光光度计测定含量后进行酶切。

2 结果

经紫外分光光度计测定,每毫升原细菌培养物质粒DNA的产量为4~6 μg。

酶切结果见图1。

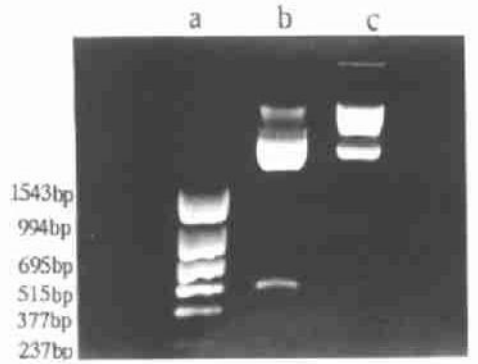


图1 质粒的提取、酶切和目的片段的电泳结果
a:PCR Marker b:酶切质粒 c:质粒

3 讨论

小量质粒DNA的快速提取方法实际上是一种碱裂解法。其基本原理是:Ⅰ号液破坏细菌膜,Ⅱ号液变性蛋白质和少量质粒,Ⅲ号液和Ⅳ号液是使质粒DNA复性而得以与染色体DNA分离。所以在加Ⅰ号液后一定要充分弹匀,使细菌沉淀在Ⅰ号液中完全分散才能得到更高产率的质粒DNA。加Ⅱ号液后,混匀动作要轻柔,以免机械剪切已变性的质粒DNA和染色体基因组DNA。据文献[1,2]报道小量质粒DNA的制备也需Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ号液,但各号液体的组成成份较多,配制过程繁琐,所以在本方法中作者按照他们的基本原理,综合采用试剂,优化试剂的配制,简化了质粒的提取过程。

加RNase酶水浴时,温度和时间一定要足够,否则,所提到的质粒DNA中会混有小分子RNA的污染。

在离心收集细菌时培养基要尽量去除干净,另外,在酚∶氯仿抽提后吸取上清液时,注意不要将水相下层的蛋白质等杂质吸入,不注意以上两点,在进行酶切时便会发现质粒DNA不能被限制酶所切割。

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39770237
** 刘贤华,女,26岁,实验师
*** 山西省太原市结核病医院 太原,030053

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

在偶然的情况下，会出现无质粒DNA的现象，这极可能是由于质粒已同乙醇一起被弃去，所以在进行70%冻乙醇洗沉淀时一定要小心操作。

据Itoh[3]和Ng[4]的有关文献报道，采用特制的滤过膜或滤过柱也可以达到快速提取质粒的目的。但是膜和柱子的造价太高，试剂保存时间也受一定限制。而本方法中所配制的液体除酚和70%乙醇需冷藏以外，其它试剂均在室温保存，且保存时间可长达1年左右，这使得质粒DNA的提取变得方便且迅速，整个质粒提取过程约需1.5 h即可。而且，所提取的质粒DNA数量和质量都很理想，可直接用于酶切、克隆等，也不需使用特殊试剂，很大程度上节约了经费。若想制备更多量的质粒时，只需成比例地加大细菌量与试剂加入量即可收获大量的质粒DNA。

关键词 质粒DNA；快速；提取；酶切

中图法分类号 R394

参考文献

1 [美]丁萨姆布鲁克，金冬雁. 分子克隆实验指南. 北京：科学出版社，1996. 16～26

2 卢圣栋 主编. 现代分子生物学实验技术. 北京：高等教育出版社，1993. 107～111

3 Itoh M, Carninci P, Nagaoka S, *et al*. Simple and rapid preparation of plasmid template by a filtration method using microtiter filter plates. Nucleic Acids Res, 1997, 25(6): 1315

4 Ng W L, Schummer M, Cirisano F D, *et al*. High-throughput plasmid mini preparations facilitated by micro-mixing. Nucleic Acid Res, 1996, 24(24): 5045

（收稿：1998-06-18；修回：1998-11-24）

（编辑 汪勤俭）

大鼠静脉输液装置的设计和制作

Design and production of intravenous infusion device for rats

彭 曦* 汪仕良 谭银铃 尤忠义 王凤君 （第三军医大学附属西南医院烧伤研究所）重庆，400038

提 要 **目的**：介绍一种自行设计的鼠用静脉输液装置。**方法**：将静脉留置管、活动套管及转轴连在一起，制成一小巧、灵活的输液装置。**结果**：大鼠在输液时可自由活动，留置管无脱落、扭曲，置管7 d无不良反应。**结论**：该装置设计合理、制作简单、价格低廉，适用范围广。

大鼠为常用的实验动物，生性活泼、嗜撕咬[1]。目前国内尚无在大鼠清醒及非限制状态下能进行持续输液的装置。国外虽有这类装置，但价格过于昂贵。为此，我们在以往工作的基础上[2]，自行设计了一种鼠用静脉输液装置，可在持续输液时勿需麻醉或束缚大鼠。现将制作方法介绍如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康成年Wistar大鼠（野战外科研究所动物室提供），雌雄不拘，体重220～290 g。

1.1.2 硅胶管 内径1.5 mm（上海橡胶制品五厂）。

1.1.3 静脉留置管 医用7号静脉输液针（江苏邗江长城医疗器械厂），去掉穿刺针后，拉细备用。

1.1.4 活动套管 以市售2 000 W电炉丝为原料，自行制作。

1.1.5 转轴 采用小型轴承代替。

1.2 制作方法

将电炉丝轻轻拉伸后截成数节，每节约25 cm，使其既柔软又有一定强度。将一侧末端用尖嘴钳拉开3～4圈，形成螺旋状，外径约1.5 cm、螺距约3～4 mm。将静脉留置管（约35 cm）从另一侧穿入，其上端固定在活动套管上。置管时在大鼠颈背部开一小孔，通过皮下隧道将留置管从背侧拉至颈外静脉处，置管完成后将活动套管缝于颈背部皮肤上，大鼠放入代谢笼中，将活动套管从笼中穿出，外套轴承，轴承平放于笼顶。并将留置管与硅胶管相连，接上电子蠕动泵，见图1。

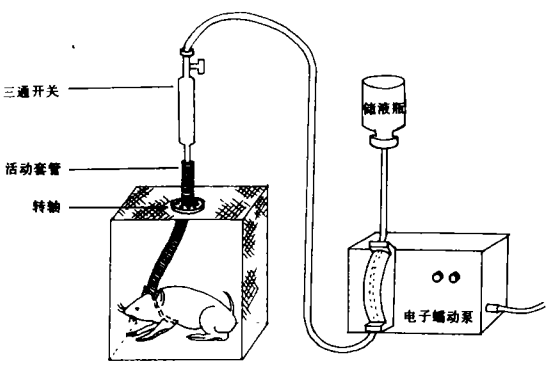


图1 静脉输液装置示意图

2 结果

采用该装置进行静脉营养的46只大鼠存活良好，仅有3只在置管时死于气栓。最长置管时间为7 d（如实验所需还可适当延长），最大输入量达152 ml/kg，根据输入量的不同调节输液泵速度。在整个过程中大鼠可自由活动，留置管无脱落、扭曲或折断，管口无栓塞，输液通道畅。

* 彭 曦，男，30岁，主治医师，博士研究生

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