

节旋藻(螺旋藻)高分子量 DNA 的两种制备方法*

茅云翔 张宝红 杨官品 张学成

(青岛海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

提要 DNA的简便高效制备方法是研究基因结构、功能及开展其它各项研究的基础。首次报道了针对节旋藻的结构和组成特性而建立的制备节旋藻高分子量 DNA的两种方法。其中第一个方法是常规方法,可大量提取纯度较高、分子量达 50 kb 的节旋藻 DNA,可用于构建节旋藻质粒文库、Southern 杂交和 PCR 操作等;第 2 种方法是用脉冲电场凝胶电泳分离 DNA 片段,制备的 DNA 片段达数百 kb,可用于构建节旋藻噬菌体文库、粘粒文库、BAC 文库等,从而为构建节旋藻物理图谱,定位克隆基因奠定基础。

关键词 节旋藻(*Athospi*),高分子量 DNA,脉冲场凝胶电泳

中图分类号 Q949.22*1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)02-0032-05

节旋藻(*Athospi*, 又常被称作螺旋藻 *Spirulina*),是原核丝状蓝藻,由于其所蕴涵的高品质营养成分而成为一类具有重要经济价值的微藻^[1]。目前,节旋藻的分子遗传学、基因组学、基因工程和遗传育种^[2]研究已成为微藻研究领域的热点之一。高纯度、高分子量 DNA 的简便高效制备方法是开展各项研究的基础,但节旋藻自身结构和成分上的特性给高纯度 DNA 的高效分离造成了一些困难。节旋藻外被胶质鞘,使其可耐受高浓度溶菌酶、冻融裂解、煮沸裂解等处理;同时节旋藻含有丰富的蛋白质、多糖和多种色素,并具有非常高的核酸酶活性,在 DNA 制备过程中这些成分不仅会干扰所提取 DNA 的纯度,而且还易使 DNA 被核酸酶降解。

目前,节旋藻 DNA 的制备方法可分为两类:一类是采用提取细菌基因组 DNA 的方法,如 Riccardi 等在克隆节旋藻谷氨酰胺合成酶(*glutamine synthetase*)基因的研究中所采用的 DNA 提取办法即是根据 Marmur^[3]所建立的从微生物中分离 DNA 的流程; Kawata 等^[4,5]则直接使用了商品化的细菌基因组 DNA 提取试剂盒(Wizard[®] Genomic DNA purification kit)来制备节旋藻 DNA,并用于构建节旋藻 TA 载体基因文库。此类方法一般首先用表面活性剂或超声破碎、冻融法等物理手段裂解细胞,再用酚、氯仿等使蛋白变性以纯化 DNA。由于其操作流程和试剂配伍未针对节旋藻的结构和组成特性,往往提取效率较低且 DNA 纯度难以保证。另一类方法则是沿用 Williams 制备集胞藻(*Synechocystis*) DNA 的方法及其改进方法^[6],但此类方

法采用 CsCl 密度梯度离心来纯化 DNA,操作比较复杂,花费较大;这两类方法提取的 DNA 分子量一般为 20~50 kb。近年来,随着基因组学的兴起,构建细菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome, BAC)或酵母人工染色体(Yeast Artificial Chromosome, YAC)文库、绘制大尺度物理图谱和染色体步查等工作要求制备更大分子量,甚至 Mb 级的基因组 DNA,但目前在节旋藻中,甚至在蓝藻中尚未见相关的研究报道。

本研究针对节旋藻结构和组成的特性,报道了制备节旋藻大分子量 DNA 的两种方法,其中第一个方法是常规方法,是对 Sahgal Maroof^[7]等建立的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)提取方法的改进,可大量提取纯度较高、分子量达 50 kb 的节旋藻 DNA,可用于构建质粒文库、Southern 杂交和 PCR 操作等;第二种方法则是以 Schwartz 和 Cantos^[8]发明的脉冲场凝胶电泳技术为基础,将节旋藻细胞用琼脂糖包埋后原位裂解、消化蛋白质、限制性酶切,然后用脉冲场凝胶电泳仪分离 DNA 片段,可用于构建(噬菌体文库、粘粒文库、BAC 文库等,从而为构建节旋藻基因组物理图谱,定位克隆基因等研究奠定基础。

* 国家 863 计划资助项目(8190610)

第一作者:茅云翔,出生于 1967 年,博士,讲师,研究方向:藻类分子生物学及基因工程。E-mail: maoyunxiang@yahoo.com.cn

收稿日期:2001-03-23;修回日期:2001-08-20

1 材料与方 法

1.1 材 料

处于对数生长期 ($OD_{660} = 0.8$) 的钝顶节旋藻 (*Athiospina platensis*) S₆ 品系经筛绢过滤收集,并用灭菌双蒸水冲洗 2~3 次后备用。用常规方法提取 DNA 时,新鲜或冷冻材料均可;而用包埋方法制备 DNA 时须用新鲜材料。

1.2 缓冲液

1.2.1 常规提取方法中所使用的缓冲溶液

CTAB 提取缓冲液 [2% (W/V) CTAB; 1.4 mol/L NaCl; 50 mmol/L EDTA (pH8.0); 100 mmol/L Tris-HCl (pH8.0); 2% (体积分数) β - 巯基乙醇 (使用前加入)];

CTAB 沉淀缓冲液 [1% (W/V) CTAB; 50 mmol/L EDTA (pH8.0); 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)]。

1.2.2 琼脂糖包埋法所使用的缓冲液

外鞘洗脱液 [0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH6.0), 1.5 mol/L NaCl]

高渗保护液 [10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 0.2 mol/L EDTA, 1 mol/L NaCl]

细胞裂解液 [10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 0.2 mol/L EDTA (pH8.0), 1 mol/L NaCl, 0.5% 十二烷基肌氨酸钠, 1 g/L 溶菌酶, 1% β - 巯基乙醇]

蛋白消化液 [0.5 mol/L EDTA (pH9.0), 0.5% 十二烷基肌氨酸钠, 1 g/L 蛋白酶 K, 1% β - 巯基乙醇]

1.3 DNA 的制备流程

1.3.1 常规方法制备节旋藻 DNA

取 1 g 藻丝体液氮冷冻 15 min,取出后液氮研磨,过程中加入 0.1 g 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP), 磨碎的藻粉转入已预热至 65 °C 的含 10 mL CTAB 提取缓冲液的离心管中,搅拌混合均匀,65 °C 水浴保温 60 min;将水浴温度降至 50 °C,加入 RNase A 至终浓度 50 μ g/ mL,继续温育 30 min;加入蛋白酶 K 至终浓度 200 μ g/ mL,继续温育 90 min。温育过程中隔 15 min 混匀 1 次。待溶液冷却至室温后,加入等体积氯仿: 异戊醇 (24: 1),轻柔地颠倒混匀 20 min,变性并抽提蛋白质;室温下 10 000 r/ min (12 000 g) 离心 10 min,上清液转入另一离心管中;重复抽提 2~3 次,至有机相和水相之间无变性的蛋白质。在上清液中加入等体积的 CTAB 沉淀缓冲液,轻柔颠倒混合,可见白色絮状物质,室温放置 30 min 以上至过夜;用玻棒缠绕白色絮状物质将其挑出后溶解于 5 mL 1 mol/L NaCl 溶液中;加入两倍体

积的无水乙醇,轻柔混匀后可见透明絮状的 DNA,室温静置 30 min 以上;用玻棒缠绕挑出 DNA,在 5 mL 75% 乙醇中浸洗除盐,沥干乙醇,最后溶于 1 mL T₁₀ E_{0.1} (10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mmol/L EDTA (pH 8.0)) 缓冲液。

1.3.2 琼脂糖包埋法制备节旋藻大分子量 DNA

筛绢过滤约 10 mL 节旋藻培养液收集藻丝,用外鞘洗脱液冲洗藻丝体两次;将藻丝体重悬于 20 mL 的外鞘洗脱液中,30 °C 下 60 r/ min 振荡 60 min;再次过滤收集藻丝,用高渗保护液洗涤两次;用 1 mL 高渗保护液重悬藻丝,使密度达到约 10⁹ 细胞/ mL,45 °C 温育;与等体积 1.6% 的低熔点胶 (用高渗保护液配制) 混匀后,注入 BioRAD CHEF Mapper™ 的凝胶块型模 (6 mm × 1.5 mm × 10 mm) 中,0~4 °C 固化 30 min;将固化的琼脂糖块置于 20 倍体积的裂解缓冲液中,于 37 °C 轻柔振荡温育 24 h;将琼脂糖块转入 10 倍体积的蛋白消化液中,于 50 °C 温育 48 h 消化蛋白质,中间更换一次消化液;将含有大分子量 DNA 的凝胶块放于 40 倍体积的含 1 mmol/L PMSF 的 TE 中,50 °C 温育 1 h 以灭活蛋白酶 K;然后于 40 倍体积的 TE 缓冲液中漂洗两次。凝胶块在 40 倍体积的 0.05 mol/L 的 EDTA (pH8.0) 溶液中于 4 °C 可储存半年以上。

1.4 DNA 纯度及含量测定

常规方法提取的 DNA 可用紫外分光光度计测定 DNA 溶液在波长为 260 nm 处的光吸收值,从而计算出 DNA 量;同时测定 230 nm 和 280 nm 处的光吸收值,并通过计算 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 的值来判断纯度。

对于包埋于凝胶块中的大分子量 DNA 用下述方法判断含量:一系列标准浓度的 λ DNA 用琼脂糖包埋制成浓度为 0.8% 的凝胶块,将样品与 λ DNA 标准同时用 EB 染色,紫外灯下通过比较样品和标准的荧光强度估计 DNA 含量。

1.5 DNA 的限制性内切酶消化与电泳

共选用 13 种限制性内切酶 (图 1) 对常规方法制备的 DNA 进行酶切实验,限制酶的用量均为 10 U/ μ g DNA;酶切温度除 *Sma* I 为 30 °C 外,其余皆是 37 °C;消化时间为 1 h。酶切产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离,电泳缓冲液为 1 × TAE,电压为 4 V/cm。

包埋于琼脂糖凝胶中的大分子量 DNA 进行限制性酶切之前,要先将凝胶块放入 10 倍体积 TE 溶液中

室温洗涤 4 次,每次 30 min;再用 10 倍体积 T_0E_0 浸泡 1 h;然后置于 2 倍体积的 $1\times$ 酶切反应缓冲液中,

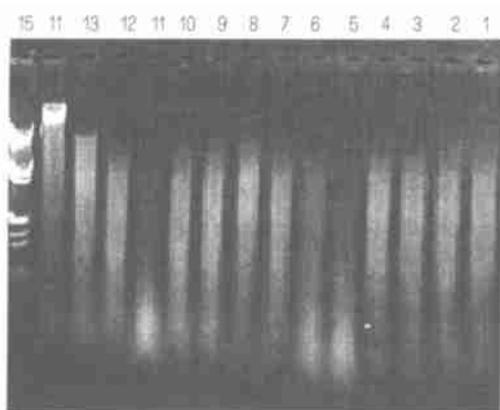


图 1 常规方法制备 DNA 及限制性酶切电泳图谱
Fig.1 Electrophoresis of genomic DNA treated by restriction enzymes

1. *Bam*HI; 2. *Cla*I; 3. *Eco*RI; 4. *Hind*III; 5. *Hpa*II;
6. *Mbo*I; 7. *Nco*I; 8. *Nde*I; 9. *Pst*I; 10. *Pvu*I; 11. *Sau*3A
I; 12. *Sst*I; 13. *Xba*I; 14. High Weight Molecular DNA; 15.
 λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III

4℃平衡 3 h,重复 3 次;然后每块凝胶加入 0.3 mL 冰冷的含有限制性内切酶的酶切缓冲液,冰浴放置 1 h 后于适宜温度下消化。对于进行完全酶切的 DNA 样品,限制酶的用量为 5U μ g DNA,酶切 4 h 以上至过夜;而部分酶切的条件需预实验确定,消化时间均设为 1 h,限制酶的用量分别为 1U、2U、4U、8U 和 16U。最后加入 1/10 体积的 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 终止反应。本实验使用 BioRad 公司的 CHEF Mapper 脉冲电场凝胶电泳仪进行大分子量 DNA 电泳分离。电泳前凝胶块在 50 倍体积的 TE 溶液中于 4℃浸泡 1 h,取出后塞入点样孔并用熔化的琼脂糖封住。对未经酶切的大分子量 DNA,电泳条件为:0.6% Chromosomal Grade 琼脂糖凝胶, $1\times$ TAE, 14℃, Block 1: 2 V/cm, 106°, 脉冲交变时间 20 ~ 40.4 min, 线形递增, 脉冲时间为 19.3 h; Block 2: 6 V/cm, 120°, 脉冲交变时间 133.51 ~ 136.25 s, 线形递增, 脉冲时间为 9.4 h。经限制性内切酶消化后的脉冲电泳条件为: 0.8% PFC 琼脂糖凝胶, $1\times$ TAE, 14℃, 6 V/cm, 120°, 脉冲交变时间 0.33 ~ 31.57 s, 线形递增, 脉冲时间为 10.35 h。

2 结果和讨论

2.1 提高节旋藻 DNA 得率的措施

节旋藻藻丝表面结构的最外层是多糖成分的胶质鞘(Sheath),其内侧是肽聚糖成分的细胞壁,再向内侧是包被着原生质的细胞膜,其中胶质鞘在维持藻丝形态、保护内部细胞等方面发挥着重要作用。Robinson 等发现具胶质鞘的节旋藻细胞可耐受浓度达 2 mg/mL 溶菌酶的处理;另外,我们也曾尝试采用反复冻融或煮沸裂解的方式来破碎节旋藻细胞,但发现即使在 SDS 或 CTAB 等表面活性剂存在的情况下,细胞裂解程度也十分有限。因此为提高 DNA 得率,在本实验的两种 DNA 制备方案中分别采取了两种不同的细胞破碎方法:常规法提取节旋藻 DNA 时采用液氮冷冻研磨的物理破碎方法;而包埋法制备大分子量 DNA 时,根据 Robinson 等用 KCl 和 EDTA 溶液洗鞘制备节旋藻原生质体的方法,先用适当浓度的 NaCl 溶液洗涤藻丝除去胶质鞘,包埋后再用溶菌酶和 CTAB 破壁、破膜。结果表明这两种方法均可较彻底地裂解节旋藻细胞,从而有效地提高 DNA 得率。本实验中采用常规制备方案进行了 3 次提取实验,从每克鲜藻中提取的 DNA 量分别为 161 μ g、188 μ g 和 143 μ g, DNA 平均得率为 164 μ g/g 鲜藻。在包埋法制备 DNA 实验中,凝胶块最初为深墨绿色,经过一系列提取步骤后胶块基本透明,色素完全溶出,表明胶质鞘洗脱后细胞裂解彻底,凝胶块中的 DNA 已基本游离。本实验中,我们用 10 mL 藻液制备了 10 块凝胶块,每一凝胶块中含有 1.5 ~ 2 μ g DNA。

2.2 DNA 降解的防护与 DNA 纯化

节旋藻不存在核膜,细胞壁和细胞膜破裂即意味着胞内的核酸物质将直接受到外界环境的影响。由于节旋藻具有很高的胞内和胞外核酸酶活性,因此破膜后 DNA 的有效保护,是成功获得大分子 DNA 的关键之一。同时,节旋藻成分较为复杂:富含蛋白质,可达干质量的 70%;含有多种多糖成分;节旋藻的色素是由藻胆蛋白和叶绿素等组成,成分多样。这些成分是否能得到有效去除,将直接影响到后续的 DNA 操作。

针对节旋藻胞内、胞外核酸酶活性高这一特性,我们采用了洗涤藻丝或洗脱胶质鞘来降低胞外核酸酶活性,在抑制核酸酶活性的温度下(如液氮下研磨及 65℃温育裂解)进行操作,以及适当提高溶液中 EDTA 浓度(50 ~ 500 mmol/L)以整合核酸酶发挥活性必需的二价金属离子等措施。鉴于 EDTA 浓度的提高以及节旋藻自身蛋白质含量丰富,在实验方案中我们

使用了较高浓度的 Proteinase K,这有利于较彻底地消化蛋白质。节旋藻细胞内色素含量高且成分多样,β-巯基乙醇被用做还原剂以防止这些多酚类物质被氧化为醌类,其用量也较高;同时还使用了聚乙烯吡咯烷酮来去除多酚类物质。作为表面活性剂的 CTAB 在本实验中一方面被用做裂解细胞膜,另一方面在适当的离子强度下 CATB 可与 DNA 形成沉淀复合物,从而将 DNA 与节旋藻中大量的多糖成分分离。

2.3 常规方法制备的 DNA 分子量与纯度

常规方案制备 DNA 的电泳结果表明其分子量约 50 kb(图 1)。纯度检测分别采用比色法和酶切验证。测定了三次提取实验得到的 DNA 样品的在 OD₂₃₀、OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的均值为 1.83,而 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 3 次平均值为 1.96,说明所制备 DNA 纯度较高;限制性酶切验证 DNA 纯度实验选用了 13 种限制性内切酶,其中 3 种酶识别位点为 4 个碱基,其余为 6 个碱基。完全酶切结果表明所制备的 DNA 对所选用的 13 种限制性内切酶均十分敏感(图 1)。

2.4 包埋法制备 DNA 的部分酶切

不论是构建 BAC 或 YAC 文库还是脉冲电场凝胶电泳进行基因分型研究,重复性良好的酶切可用于验证所制备 DNA 的质量。图 2 是包埋于琼脂糖凝胶中的节旋藻高分子量 DNA 用不同量的限制性内切酶 *Bam*HI 消化 1 h 电泳结果示意图。其中未经过酶切 DNA(泳道 2)的分子量可达数百 kb,而随着限制性酶量的增加,DNA 降解程度上升,显示采用本方法制备的包埋于琼脂糖凝胶中的 DNA 具备良好的可酶切性。

另外,我们还将上述两种方法分别用于极大节旋藻(*A. maxima*)、颤藻(*Cyclostationa* sp.)和盐泽螺旋藻(*Spirulina subsalsa*)高分子量 DNA 的制备,均取得了较好的效果(实验数据未显示),表明本文所描述的两种 DNA 制备方法对其它丝状蓝藻也有一定的适用性。

参考文献

- 1 Zhang X C. Large scale cultivation of *Spirulina* in China, today and tomorrow. *Biosystem Studies*, 1998, 1(2): 66 - 73
- 2 Vachhani A K, Vonshak A. Genetics of *Spirulina*. In: Vonshak. *Spirulina platensis (Arthrospira)*: Physiology, Cell Biology and Biotechnology. London: Taylor and Francis, 1997. 67 - 77



图 2 琼脂糖包埋方法制备 DNA 及限制性酶切电泳图谱

Fig.2 High molecular weight (HMW) DNAs and its partial digestion.

1. Lambda DNA ladder; 2. HMW DNA; 3. 2.0 unit; 4. 4.0 unit; 5. 8.0 unit.

- 3 Marmur J. A procedure for the isolation deoxyribonucleic acid from microorganism. *Journal of Molecular Biology*, 1961(3): 208 ~ 218
- 4 Kawata Y, Yano S, Kojima H. Efficient library construction with a TA vector and its application to cloning of the phytoene synthase gene from the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Curr Microbio*, 1998(37): 289 ~ 291
- 5 Kawata Y, Yano S, et al. Preparation of genomic library using a TA vector. *Prep Biochem Biotechnol*, 1999, 29(1): 91 - 100
- 6 Williams J G K. Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Method Enzymology*, 1988 (167): 766 - 778
- 7 Sahgar Maroof M A, Soliman K M, et al. Ribosomal DNAspace length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984(81): 8 014 - 8 018
- 8 Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 1984 (37): 67 ~ 75

研究报告 *REPORTS*

TWO PROTOCOLS FOR PREPARATION OF HIGH MOLECULAR WEIGHT DNA FROM *Athrospira* (*Spirulina*)

MAO Yun-Xiang ZHANG Bao-Hong YANG Guang-Pin ZHANG Xue-Cheng

(College of Marine Life Sciences , Ocean University of Qingdao , Qingdao , 266003)

Received: Mar., 23, 2001

Key Words: *Athrospira*, High molecular weight DNA, Pulse field gel electrophoresis

Abstract

Simple and high efficiency methods for DNA preparation are the base for the molecular genetics research. Here, for the first time, two protocols were designed for preparing the high weight molecular DNA from *Athrospira* based on its structural and biochemical characters. The first protocol can be used for routine and large-scale DNA preparation, by which the molecular weight of DNA is more than 50 kb. The DNA of *Athrospira* prepared by this protocol can be used for constructing plasmid library, Southern blotting and PCR experimenting. By the second protocol, large DNA fragments over several hundred of kilobase pairs can be obtained by the pulse field gel electrophoresis, which can be used for constructing (phage library, cosmid library and bacterial artificial chromosome (BAC) library, and thereby for constructing physical map and positional clone gene of *Athrospira*.

(本文编辑:张培新)