

一种利用碱裂解法快速筛选重组子的方法

吕新, 陈丽华, 李玥仁

(福建省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所;
精密仪器农业测试重点公共实验室 350003)

摘要: 根据碱裂解法提取质粒 DNA 的原理, 利用碱裂解法快速筛选到重组子, 该方法快速、准确, 可应用于基因克隆中的重组菌落快速检测。

关键词: 碱裂解法; 重组子; 快速; 筛选

DOI: 10.13651/j.cnki.fjnykj.2016.05.005

A rapid screening method of recombinant methods by using alkaline lysis

LV Xin, CHEN Li-hua, LI Yue-ren

(Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology of Fujian Academy of Agricultural Sciences;
Precision Instrument Key Public Laboratory for Agriculture Test, Fujian Province 350003)

Abstract: According to the principle of alkaline lysis method for extracting plasmid DNA, the recombinants were rapidly screened by using the alkaline lysis method, which is quick and accurate and can be applied in rapid detection of recombinant bacterial colonies in gene cloning.

Keywords: Alkaline lysis method; recombinant; fast; screening

收稿日期: 2016-04-25

作者简介: 吕新, 男, 1980年生, 助理研究员。

通讯作者: 李玥仁, 男, 1966年生, 研究员 (E-mail: yuereni@yeah.net)。

基金项目: 福建省公益类青年科研项目 (2014R1025-5)。

基因克隆是现代分子生物学中一种重要的技术手段。在基因克隆中, 目的基因和载体在体外连接形成重组 DNA 质粒后, 将重组 DNA 质粒和感受态大肠杆菌细胞相混合, 使重组 DNA 质粒进入大肠

果多、结果数少、饱果率不高、抗旱性中等。建议 2016 年继续进行观察试验。

3.4 汕油 52、湛油 16

荚果和籽仁产量均比对照品种减产, 但差异不显著; 单株结果数均多于对照品种, 但湛油 16 饱果率低于对照品种, 出仁率高于对照品种; 汕油 52 饱果率高于对照品种, 出仁率低于对照品种。建议 2016 年进一步观察试验。

3.5 贺花 1 号、粤油 18

荚果和籽仁产量均比对照品种减产达极显著水平。建议终止试验。

3.6 贺油 15

出仁率较高, 为 72.5%; 籽仁产量比对照品种减产不显著, 但荚果产量比对照品种减产达极显著

水平, 叶斑病发生级别较高。建议终止试验。

参考文献:

- [1] 万书波. 中国花生栽培学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003.
- [2] 陈剑洪, 陈永水, 陈双龙, 等. 花生新品种泉花 7 号的选育研究 [J]. 花生学报, 2008, 37 (3): 41-44.
- [3] 陈剑洪, 陈永水, 庄明川, 等. 花生新品种泉花 327 的选育研究 [J]. 福建农业学报, 2004, 19 (1): 16-19.
- [4] 庄伟建, 石新国, 陈华, 等. 花生新品种闽花 6 号的选育及优异性状研究 [J]. 福建农业学报, 2010, 25 (3): 303-309.
- [5] 陈永水, 陈剑洪, 腾振勇, 等. 花生新品种“泉花 6 号”的选育及栽培技术 [J]. 福建农业科技, 2009 (1): 14-16.
- [6] 陈永水, 陈剑洪, 郑旋, 等. 花生新品种“泉花 8 号”的选育 [J]. 福建农业科技, 2008 (1): 81-82.

(责任编辑: 林芸青)

杆菌中，实现重组 DNA 质粒的转化，并在含有抗生素的 LB 琼脂平板培养基上形成重组子菌落。目前，筛选重组子主要采用遗传表型检测法、限制性酶切法和菌落 PCR 法，但在实际操作中均存在不尽人意的地方。在遗传表型检测过程中， α 互补检测中必须加入的呈色底物 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -半乳糖苷 (x-gal) 和诱导剂异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 价格昂贵，大量筛选势必增加实验成本；限制性酶切法需对数 10 个菌落进行培养后提取质粒进行酶切检测，非常费力，甚至使用限制性酶切法常找不到适合用 2 种或 2 种以上限制性内切酶的缓冲液，必须分步进行酶切反应；菌落 PCR 法反应易受环境污染造成假阳性，反应条件不合适易造成假阴性，且若没有可以利用的引物，还需合成引物。鉴于上述问题，笔者在碱裂解法提取质粒 DNA 方法的基础上^[1]，研究出一种操作简便、方法快速、结果可靠的重组子快速筛选方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株与载体 pBluescriptSK (+) 质粒 (3.0 kb, Amp 抗性), DH5 α 。外源插入片段 0.7 kb 和 1.0 kb, 由福建省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所克隆完成。

1.1.2 试剂与仪器 试剂: Tris、EDTA、RNaseA、SDS、NaOH、溴酚蓝、蔗糖。仪器: 电泳仪及电源 (北京六一仪器厂)。LB 固体培养基、液体均按常规方法配制。

1.2 方 法

插入片段的连接、转化按萨姆布鲁克等^[8]的方法进行, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜, 待菌落在 LB 平板上生长至 2~3 mm 时, 按如下步骤操作: 取 8 μ L 悬浮液 (50 mmol/L Tris pH 8.0、10 mmol/L EDTA、0.1 mg/mL RNaseA、0.1% 溴酚蓝) 加入到 1.5 mL 离心管中, 再在超净台内用 10 μ L 枪头随机挑取 LB 平板上 10 个待检测菌落, 在悬浮液中用移液枪反复吹打混匀, 然后加入 8 μ L 裂解液 (200 mmol/L NaOH、0.5% SDS、20% 蔗糖), 轻柔吹打混匀, 避免产生过多气泡 (容易变得黏稠), 室温放置 3 min, 最后取 10 μ L 裂解产物, 在 1% 琼脂糖凝胶上、110 V 电压下电泳 30 min 后, 使用凝胶成像仪对琼脂糖凝胶拍照, 根据质粒 DNA 在琼脂糖凝胶电泳时迁移距离的差异, 判断是否为重组子菌落。

2 结果与分析

2.1 快速检测结果分析

待检测重组子菌落质粒 DNA 在琼脂糖电泳后显色, 可观察到 4 条不同电泳位置的 DNA 条带, 其中第 2 个条带在重组菌落与非重组菌落间存在明显的位置差异, 其他 3 个条带不存在位置差异。由于重组菌落带有 700 bp 或 1000 bp 的插入片段, 其质粒 DNA 与非重组质粒 DNA 片段相比较大, 在相同时间的琼脂糖电泳时迁移的速率较慢, 导致 2 种不同质粒 DNA 间的位置差异 (图 1、图 2)。

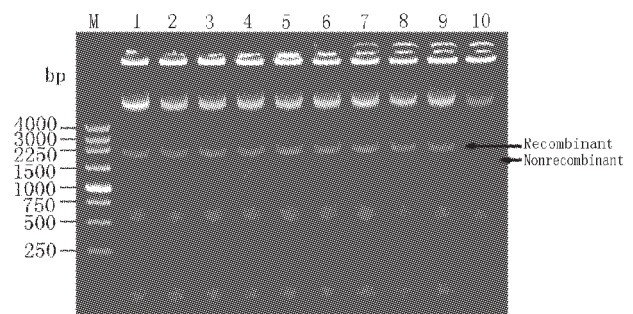


图 1 700 bp 插入片段菌落裂解电泳图

注: M 为 250 bp DNA Ladder; 1~9 为有滞后重组菌落, 10 为无滞后非重组菌落; 图 2 同。

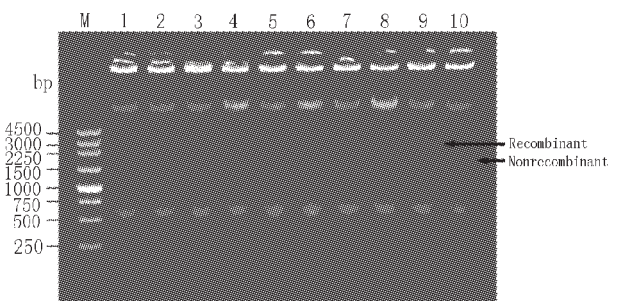


图 2 1000 bp 插入片段菌落裂解电泳图

2.2 优缺点分析

目前对于重组子菌落的筛选主要采用遗传表型检测法、限制性酶切法和菌落 PCR 法。本方法与上述 3 种方法比较, 具有如下优点: ①检测方法迅速, 只要简单 3 步, 可以在 1 h 内完成并获得结果; ②结果可靠, 根据重组质粒 DNA 与非重组质粒 DNA 片段大小差异来区分, 有效避免 PCR 法检测出现假阳性和假阴性的问题^[2]; ③操作简单, 不要求特殊仪器设备, 只需 1 个琼脂糖电泳仪即可, 一般的分子生物学研究室均具备; ④成本低廉, 不需要昂贵的 X-gal 和 IPTG 试剂^[3-7], 可大幅减少检

测成本。

但本方法也具有一定的局限性，如插入片段必须大于 200 bp，才能在 1% 琼脂糖电泳时观察到重组子质粒 DNA 与非重组质粒 DNA 之间明显的滞后现象；无法直接判断插入片段方向。

3 小结

本方法根据碱裂解法提取质粒 DNA 的原理，将待检测重组子菌落悬浮在悬浮液，在裂解液提供的碱性环境下快速裂解待检测菌落，并释放质粒 DNA。由于重组质粒 DNA 片段较大，在琼脂糖凝胶电泳时迁移速度较慢，而非重组质粒 DNA 片段较小，在琼脂糖凝胶电泳时迁移速度较快，因此可根据质粒 DNA 在琼脂糖凝胶电泳时迁移距离的差异，判断是否为重组子菌落。

悬浮液中 Tris 为质粒 DNA 释放时提供稳定的 pH 缓冲环境；EDTA 可以螯合重金属离子，并抑制 DNA 酶活性；RNaseA 可去除质粒 DNA 中的 RNA 污染；溴酚蓝在电泳检测时起条带指示作用。裂解液中 NaOH 为质粒 DNA 释放时提供碱性环境，同时 NaOH 和 SDS 能裂解菌体细胞壁、在细胞膜上穿孔，释放细胞内的质粒 DNA；蔗糖可增加比重，浓缩质粒 DNA，使点样后的质粒 DNA 能够沉于点样孔中。

此技术操作简便、方法快速，能在 1 h 内完成

待检测菌落的检测和判断，且检测过程中不需要 x-gal 和 IPTG 等昂贵试剂，结果的准确性高于 PCR 法，检测时间比常规限制性酶切法大幅减少。可应用于基因克隆中重组菌落快速检测，特别是在大量筛选重组菌落时将大幅减少筛选的时间和检测成本。

参考文献：

- [1] BIRNBOIM H C, DOLY J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1979, 7 (6): 1513-1523.
- [2] 田丽春, 黄光瑞, 陈亮, 等. 一种快捷可靠的大肠杆菌重组质粒筛选方法 [J]. *湖北大学学报: 自然科学版*, 2008 (2): 202-204.
- [3] ITOH M, CARNINCI P, NAGAOKA S, et al. Simple and rapid preparation of plasmid template by a filtration method using microtiter filter plates [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25 (6): 1315-1316.
- [4] 张桂敏, 刘振, 李春华, 等. 一种简便快速筛选重组子方法 [J]. *湖北大学学报: 自然科学版*, 2005 (3): 280-281.
- [5] 崔锦, 李林珂, 马向东. 一种简便快速筛选重组子方法 [J]. *生物技术*, 2005 (6): 46-47.
- [6] 罗文永, 陈建伟, 刘彦卓, 等. 快速鉴定阳性重组质粒方法的改进试验 [J]. *广东农业科学*, 2004 (2): 9-10.
- [7] CHOWDHURY E H, AKAIKE T. Rapid isolation of high quality, multimeric plasmid DNA using zwitterionic detergent [J]. *Journal of biotechnology*, 2005, 119 (4): 343-347.
- [8] 萨姆布鲁克, 鲁塞尔, 培堂. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.

(责任编辑: 林芸菁)

耐热基因，有望让水稻不再“中暑”

浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所研究员朱英团队在开展高温影响稻米品质的机制研究及相关耐热基因的克隆的过程中发现了水稻耐热基因。

稻米品质最直观的两大指标就是外观和口感。加工成精米之后是否颗粒透亮，煮熟之后的米饭吃起来是否软硬适中、饭香扑鼻，这主要是由稻米中淀粉的品质决定的，其中直链淀粉含量的高低则是稻米口感好坏最重要的理化指标。研究发现，我国南方广泛种植的籼稻，普遍比北方的粳稻更加耐热，籼稻基因组中存在一些可以改良粳稻对高温耐受性的遗传位点；另一方面，朱英团队通过反向遗传学方法在水稻中发现了一个调控基因，发现降低种子中这一调控基因的表达，可降低稻米在高温下的灌浆速度，维持直链淀粉合成酶活性，从而确保高温下直链淀粉含量的稳定。许多优质水稻品种都是对高温比较敏感的粳稻品种，其耐热性是一个短板。发现调控基因的功能后，就可以尝试通过基因技术，把水稻胚乳中这一基因的表达降下来，从而使优质水稻品种在一定的高温环境下也能产出优质的稻米。

(信息来源: 科技金融时报 [2016-05-17])