

文章编号: 1674-7054(2017)02-0232-04

噬菌体基因组 DNA 快速提取方法

刘秋婷^{1,2}, 田雨顺^{1,2}, 云龙^{1,2}, 罗鹏¹, 胡超群¹

(1. 中国科学院南海海洋研究所/中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室/广东省应用海洋生物学重点实验室, 广州 510301; 2. 中国科学院大学, 北京 101408)

摘要: 针对传统噬菌体基因组 DNA 的提取方法缺乏广泛适用性, 并且提取中用到酚/氯仿抽提, 操作步骤繁琐, 会对操作人员身体造成一定程度的损伤等不足, 笔者建立了 1 种噬菌体基因组 DNA 快速提取方法。其提取的主要步骤包括宿主核酸降解、噬菌体粒子沉淀、噬菌体 DNA 释放、杂质去除、DNA 吸附、DNA 清洗和 DNA 洗脱等。结果表明, 通过此法能快速提取以溶藻弧菌、大肠杆菌和阴沟肠杆菌为宿主菌的多种噬菌体基因组 DNA, 最快可以在 2 h 内完成, 而且提取的产量和纯度均较高, DNA 浓度超过 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $OD_{260/280}$ 达到 1.8 以上, 提取产物不受宿主菌基因组 DNA 污染, 可用于下游的实验分析。

关键词: 噬菌体基因组 DNA; 快速提取方法; 核酸降解; 噬菌体粒子沉淀

中图分类号: Q 78

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2017.02.018

噬菌体是一类以细菌为宿主的病毒, 通常存在于充满细菌群落的地方, 如: 河水、泥土和动物的内脏。噬菌体被认为是地球上含量最丰富的生物种类^[1], 只含有 DNA 或 RNA 1 种遗传物质, 绝大部分噬菌体的遗传物质是 DNA。近 20 年来, 随着分子生物学技术的进步, 噬菌体的研究变得越来越热门, 主要表现在以下几个方面: 第 1, 细菌的耐药问题日趋严重, 采用噬菌体治疗疾病的方法再次受到研究者广泛关注^[2]; 第 2, 通过微生物基因组测序技术, 人们发现细菌基因组中广泛存在着噬菌体的痕迹, 显示出噬菌体在细菌基因组进化中扮演非常重要的角色; 第 3, 一些严重威胁人类健康的致病株的致病性都与前噬菌体有关^[3]; 第 4, 噬菌体在细菌分型、检测、噬菌体展示、细菌重组工程以及发展新的遗传学操作工具领域具有广泛的应用^[4-7]。提取噬菌体基因组 DNA 是基于分子技术研究噬菌体的基础; 此外, 提取高质量、具有一定浓度并且不受宿主菌核酸污染的噬菌体基因组 DNA 已经成为噬菌体基因组测序要求中关键的一项。然而, 目前还没有可广泛使用的细菌噬菌体基因组 DNA 提取方法, 但在微生物领域对于通用的细菌噬菌体基因组 DNA 快速提取方法存在强烈需求。通用且快速的细菌噬菌体基因组 DNA 提取方法的出现必将大大减少技术人员的操作时间, 加快相关领域的研究进程。因此, 笔者建立了 1 种通用的快速噬菌体基因组 DNA 提取方法, 利用此方法获得了较高浓度和纯度的噬菌体基因组 DNA。

1 材料与方法

1.1 细菌及噬菌体 溶藻弧菌噬菌体 Φ PE333、大肠杆菌噬菌体 Φ P1655 和阴沟肠杆菌噬菌体 Φ PZJ02 分别分离自广东省阳江市、广州市。宿主菌溶藻弧菌 E06333、大肠杆菌 1723 和阴沟肠杆菌 ZJ02 为笔者实验室分离保存。

1.2 试剂 DNase I、RNase A、聚乙二醇(PEG-8000)、EDTA、十二烷基磺酸钠、蛋白酶 K、NaCl、异硫氰酸

收稿日期: 2017-01-20

修回日期: 2017-02-25

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31370149)

作者简介: 刘秋婷(1992-), 女, 中国科学院大学南海海洋研究所 2014 级硕士研究生, E-mail: liuqiuting66@163.com

通信作者: 罗鹏(1977-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 海洋细菌分子遗传学, E-mail: luopeng@scsio.ac.cn

胍、Tris-Cl 等试剂均购自上海生工; LB 培养基购于 Amresco 公司, 琼脂糖购于西班牙 Biowest 公司, DNA 吸附柱购自广州诺晶生物技术有限公司, 其余试剂购于 TaKaRa 公司。

1.3 主要仪器 摇床(上海智城分析仪器制造有限公司)、水浴锅(金坛市科析仪器有限公司)、离心机(Thermo)、移液枪(Eppendorf)、电泳仪(北京六一仪器厂)、NanoDrop 2000(Thermo)。

1.4 噬菌体基因组 DNA 提取 (1) 37 °C 过夜培养宿主菌 2% (V/V) 接种于新鲜 LB 培养基中, 再加入 2% (V/V) 相应的噬菌体 Φ PE333、 Φ P1655 或 Φ PZJ02 液, 37 °C 振荡培养 5 h (转速 220 r · min⁻¹); (2) 分别取 10 mL 培养液, 加入 1% 氯仿 (V/V), 混合, 4 °C 10 000 g 离心 10 min, 取上清; (3) 宿主菌核酸降解: 0.45 μ m 滤膜过滤上清, 滤液中分别加入 20 μ L DNase I (20 g · L⁻¹) 及 RNase A (10 g · L⁻¹), 上下颠倒混匀, 37 °C 温育 30 min; (4) 噬菌体粒子沉淀: 加入 10 mL PEG-8000 (400 g · L⁻¹), 轻柔上下混合, 冰上放置 60 min (或 4 °C 过夜放置), 4 °C 10 000 g 离心 10 min, 得到噬菌体粒子沉淀; (5) 噬菌体蛋白结构破坏和水解: 向沉淀中分别依次加入 500 μ L 裂解缓冲液 [NaCl 5.8 g · L⁻¹, MgSO₄ 1.23 g · L⁻¹, Tris-Cl 50 mL · L⁻¹ (1 mol · L⁻¹, pH8.0), EDTA 100 mL · L⁻¹ (0.05 mol · L⁻¹)], 100 μ L SDS 溶液 (20%) 和 3 μ L 蛋白酶 K (25 g · L⁻¹), 50 °C 温育 30 min; (6) 杂质去除: 加入 200 mL NaCl (6 mol · L⁻¹), 轻柔混匀 6 次, 12 000 g 离心 10 min, 取上清; (7) DNA 结合: 加入上清 50% 体积的结合缓冲液 (6 mol · L⁻¹ 异硫氰酸胍, 100 mM Tris, pH6.4), 上下轻轻颠倒混匀 8 次; (8) DNA 吸附: 取 DNA 吸附柱放置在新的离心管中, 将上述步骤 (7) 中的混合液移入 DNA 吸附柱中, 12 000 g 离心 1 min, 弃过滤液; (9) DNA 清洗: 向 DNA 吸附柱中加入 700 mL 漂洗缓冲液 [10 mM Tris-Cl (pH8.0) 与无水乙醇按 1 : 4 (V/V) 比例混合], 12 000 g 离心 1 min, 弃去过滤液; 重复本操作 1 次, 将 DNA 吸附柱置于干净的操作台上, 室温放置 5 min; (10) DNA 洗脱: 将 DNA 吸附柱转移至 1 支新离心管中, 加入 100 μ L Tris-Cl (10 mmol · L⁻¹ Tris, pH8.0) 于 DNA 吸附柱的膜中央, 室温放置 1 min; 12 000 g 离心 1 min, 取洗脱液即得到噬菌体基因组 DNA。

1.5 噬菌体基因组 DNA 纯度检测 对上述提取的噬菌体基因组 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测: 取 5 μ L DNA 原液, 加入 1 μ L 的 DNA 上样缓冲液, 进行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 使用凝胶成像系统观察并拍照记录, 检测 DNA 的完整性, 根据分子质量标准判断 DNA 分子大小^[8]。采用 NanoDrop 2000 (Thermo) 分别测定提取的噬菌体 DNA 浓度以及 OD_{260/280} 值, 样品上样量 2 μ L。

1.6 宿主菌基因组 DNA 污染检测 采用高灵敏度的 PCR 方法检测所提取的噬菌体基因组 DNA 中是否存在宿主基因污染, 以细菌看家基因 *gyrB* 作为靶基因, 引物序列如下:

gyrB-UF: AAGTCATCATGACCGTTCTGCA YGCNGGNGNAARTTYGA; *gyrB*-UR: AGCAGGGTACGGAT-CTGCCAGCCRTCNACRTCNGCRTCNGTCAT (划线部分为人工添加的 5' 端接头, 方便测序)^[9]。

PCR 扩增程序: 94 °C 4 min; 94 °C 20 s, 58 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。PCR 扩增产物采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 噬菌体基因组 DNA 浓度及纯度检测结果 提取的噬菌体 Φ PE333 基因组 DNA 的浓度为 128 ng · μ L⁻¹, OD_{260/280} = 1.85; 噬菌体 Φ P1655 基因组 DNA 的浓度为 105 ng · μ L⁻¹, OD_{260/280} = 1.86; 噬菌体 Φ PZJ02 基因组 DNA 的浓度为 233 ng · μ L⁻¹, OD_{260/280} = 1.80。结果表明, 3 种噬菌体基因组 DNA 的浓度均达到 100 ng · μ L⁻¹ 以上, DNA 纯度高, 可以满足下游实验需求。对所提取的噬菌体基因组 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1。由图 1 可知, 3 种噬菌体基因组 DNA 的片段集中在 15 Kb 左右的位置, 无明显的 RNA 污染, 表明提取成功。

2.2 宿主菌基因组 DNA 污染检测结果 琼脂糖凝胶电泳检测 *gyrB* 基因 PCR 扩增结果见图 2。由图 2 可见, 以提取的噬菌体基因组 DNA 为模板的 PCR 产物电泳检测均无条带, 而以细菌基因组 DNA 为模板的阳性对照则呈现预期大小的条带。表明提取样品中不存在宿主基因组 DNA 污染。

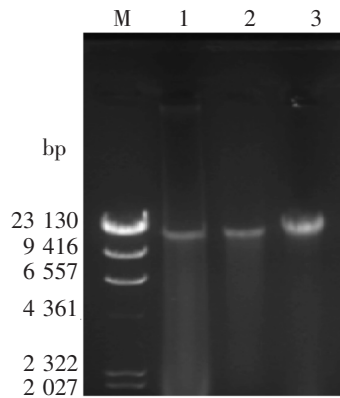


图 1 噬菌体 ΦPE333, ΦP1655 和 ΦPZJ02

基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

M: DNA Marker (λ hind III); 1. 噬菌体 ΦPE333 基因组 DNA; 2. 噬菌体 ΦP1655 基因组 DNA; 3. 噬菌体 ΦPZJ02 基因组 DNA

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNAs of bacteriophages ΦPE333, ΦP1655 and ΦPZJ02

M: DNA Marker (λ hind III)

1. Genomic DNA of bacteriophage ΦPE333; 2. Genomic DNA of bacteriophage ΦP1655; 3. Genomic DNA of bacteriophage ΦPZJ02

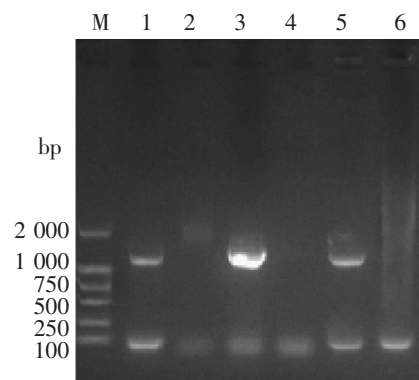


图 2 噬菌体基因组 DNA 污染 PCR 检测电泳图

M: DNA Marker (DL2000); 1. 溶藻弧菌 E06333; 3. 大肠杆菌 1723; 4. 噬菌体 ΦP1655; 5. 阴沟肠杆菌 ZJ02; 6. 噬菌体 ΦPZJ02

Fig.2 Gel electrophoresis of PCR products of contaminated genomic DNAs of bacteriophages

M: DNA Marker (DL2000)

1. *Vibrio alginolyticus* strain E06333; 3. *Escherichia coli* strain 1723; 4. Bacteriophage ΦP1655; 5. *Enterobacter cloacae* strain ΦPZJ02; 6. Bacteriophage ΦPZJ02

3 讨论

目前,仅有少量文献报道噬菌体基因组 DNA 的提取方法^[10-11],这些方法均针对特定的某一种噬菌体,缺乏广泛适用性,并且提取中用到酚/氯仿抽提,操作步骤繁琐,会对操作人员身体造成一定程度的损伤。本研究仅在初期辅助细菌细胞裂解释放噬菌体粒子时加入微量的氯仿,操作简便,危害性小。在噬菌体粒子破解前,加入 DNase I 和 RNase A 能消化宿主菌的 DNA 和 RNA,有效地避免宿主菌 DNA 和 RNA 污染,进而可避免由宿主基因组污染而造成的噬菌体测序序列的错误拼读。此外,采用 PEG-8000 对裂解液进行噬菌体沉淀避免了 CsCl 密度梯度离心法^[12]要求昂贵仪器(超速离心机)、操作时间长的缺点。DNA 回收纯化操作过程中,本实验充分利用高盐、低 pH 值状态下,硅胶膜专一性吸附 DNA,低盐状态下, DNA 从硅胶膜上洗脱下来的特性,进行 DNA 的纯化和回收。比传统的苯酚氯仿抽提加乙醇沉淀法方便、快捷,而且安全、无毒、无污染,符合现今噬菌体基因组 DNA 提取的商业化发展趋势。本方法从噬菌体颗粒到获取噬菌体基因组 DNA 整个过程仅需 2 h,简便、省时、高效,且对于 3 种不同来源的噬菌体基因组 DNA 均取得良好的提取效果。DNA 浓度达到 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 以上, $OD_{260/280}$ 达到 1.8 以上,并且以细菌保守的看家基因 *gyrB* 为靶基因的 PCR 检测表明提取的噬菌体 DNA 中无宿主 DNA 污染。结果表明,通过此方法提取的噬菌体基因 DNA 质量高。笔者对利用该提取方法获得的 3 种噬菌体基因组 DNA 进行了高通量测序,目前已经获得其全基因组序列。

参考文献:

- [1] 张永雨,黄春晓,杨军,等.海洋微生物与噬菌体间的相互关系[J].科学通报,2011,56(14):1071-1079.
- [2] 陈晓春,王继文,曹永长,等.噬菌体在疾病治疗方面的应用及研究[J].动物医学进展,2005,26(1):32-35.
- [3] 黎庶,胡福泉.前噬菌体[J].微生物学通报,2009,36(3):432-438.
- [4] 江艳华,姚琳,王鹏,等.噬菌体及其裂解酶在食源性致病菌检测和控制中的应用[J].微生物学通报,2011,38(10):1561-1571.
- [5] 张亚旭. DNA 重组技术的研究综述[J].生物技术进展,2012,2(1):57-63.
- [6] 樊祥宇,谢建平.分枝杆菌噬菌体重组系统及其应用[J].中国生物工程杂志,2012,32(9):101-106.

- [7] 白光兴, 孙志伟, 俞炜源, 等. 大肠杆菌重组工程[J]. 生物技术通讯, 2003, 5: 410–412.
- [8] 王雪兵, 于旭东, 朱会军, 等. 巢蕨基因组 DNA 提取与 RAPD 反应体系优化[J]. 热带生物学报, 2012, 3(4): 379–386.
- [9] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyr B* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(3): 1104–1109.
- [10] 徐海, 王义伟, 陈瑾. T7 噬菌体 DNA 的提取及其反向遗传拯救方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(2): 355–358.
- [11] 徐建兰, 吕合义, 张澄波, 等. λ 噬菌体 DNA 快速提取法[J]. 首都医科大学学报, 1998, 19(3): 254–255.
- [12] Carlson K. Bacteriophages: Biology and Applications[M]. New York: CRC press, 2005: 428.

Development of a Rapid Method for Extraction of Genomic DNAs of Bacteriophages

LIU Qiuting^{1,2}, TIAN Yushun^{1,2}, YUN Long^{1,2}, LUO Peng¹, HU Chaoqun¹

(1. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences (CAS) / Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, CAS/ Guangdong Key Laboratory of Applied Marine Biology, Guangzhou, Guangdong 510301, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China)

Abstract: Molecular biological research on bacteriophages is primarily based on genomic DNA extraction. The traditional DNA extraction for bacteriophages is complicated in operation and the use of phenol and chloroform in the DNA extraction is harmful to operator. A new rapid method for bacteriophage genome DNA extraction was developed. Procedures in the method includes nucleic acid degradation of host strains, bacteriophage precipitation, bacteriophage DNA release, impurity removal, DNA adsorption, DNA washing, and DNA elution. The results indicated that bacteriophage genomic DNAs, the host strains of which are *Vibrio alginolyticus*, *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae*, respectively, were extracted in two hours at the soonest, with the yield and purity of genomic DNAs being up to $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ and 1.8 ($OD_{260/280}$), respectively. This extraction method can prevent the DNA contamination from the host strains, and thus the extracted genomic DNA of bacteriophages can be used in further experiments.

Keywords: bacteriophage genomic DNA; rapid extraction; nucleic acid degradation; bacteriophage precipitation