



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109371011 A

(43)申请公布日 2019.02.22

(21)申请号 201811416963.4

(22)申请日 2018.11.26

(71)申请人 天津科技大学

地址 300457 天津市滨海新区经济技术开
发区第13大街9号

(72)发明人 杨洪江 张茜茜 黄志伟 张志强
李东航

(74)专利代理机构 天津盛理知识产权代理有限
公司 12209

代理人 赵瑶瑶

(51)Int.Cl.

C12N 15/10(2006.01)

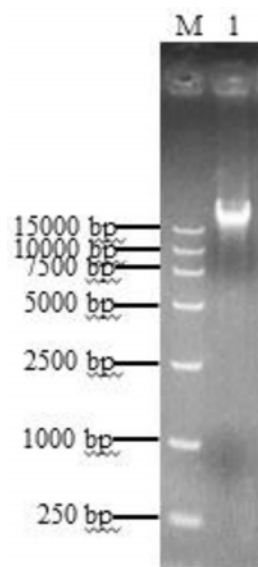
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种新的提取噬菌体基因组DNA的方法

(57)摘要

本发明提供了一种新的提取噬菌体基因组DNA的方法,包括以下步骤:噬菌体裂解液扩增后,去除细胞碎片,去除宿主菌的核酸物质,加入PEG6000使噬菌体沉降,使用TM缓冲液重悬后,不使用氯仿抽提,直接加入核酸酶,去除未除尽的宿主菌的基因组,然后使用尿素代替蛋白酶K,使外壳蛋白变性后,通过琼脂糖凝胶电泳使蛋白与基因组DNA分开,然后使用冻融回收的方法,回收噬菌体的基因组DNA。此方法操作简便,特别适用于对氯仿敏感的噬菌体,适用范围更广,大大减少实验成本,缩短提取时间。



1. 一种新的噬菌体基因组DNA的提取方法,其特征在于:浓缩噬菌体颗粒步骤中,去除细胞碎片,去除宿主菌的核酸物质,加入PEG6000使噬菌体沉降,TM缓冲液重悬噬菌体;直接采用尿素变性剂分离噬菌体基因组DNA;通过琼脂糖凝胶电泳的方法,将噬菌体基因组DNA与蛋白及其他杂质分开;采用低温冷冻含基因组DNA的凝胶,室温融化后过滤获得噬菌体基因组DNA溶液。

2. 根据权利要求1所述的新的噬菌体基因组DNA的提取方法,其特征在于:所述尿素终浓度为2-5M。

3. 根据权利要求1所述的新的噬菌体基因组DNA的提取方法,其特征在于:所述噬菌体为对氯仿敏感的噬菌体基因组DNA的提取。

4. 根据权利要求1所述的新的噬菌体基因组DNA的提取方法,其特征在于:所述对氯仿敏感的噬菌体包括铜绿假单胞菌噬菌体 ϕ H2和金黄色葡萄球菌噬菌体Z-1。

5. 根据权利要求1所述的新的噬菌体基因组DNA的提取方法,其特征在于:具体方法如下:

(1) 噬菌体的扩增:过夜培养宿主菌,体积百分比2%接种于新鲜LB培养基中,按照最佳MOI加入噬菌体,适宜温度振荡培养至宿主菌完全裂解;

(2) 宿主菌细胞碎片及基因组的去除:裂解液加入NaCl至终浓度为0.1M,混匀溶解后冰浴1h,10000r/m,离心20min,取上清加入DNase I和RNase A至终浓度为2.5 μ g/mL,混匀,37 $^{\circ}$ C静置1h;

(3) 噬菌体的浓缩:继续加入PEG6000至终浓度为10%,充分振荡溶解后,置于4 $^{\circ}$ C,过夜,10000r/m,离心20min,弃去上清,用1/50体积的TM缓冲液将沉淀重悬,不使用氯仿抽提直接加入DNase I和RNase A,终浓度为10 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C静置1h;

(4) 宿主菌基因组的去除:加入DNase I和RNase A,终浓度为10 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C静置1h;

(5) 噬菌体外壳蛋白的变性:将重悬液与10M尿素等体积混合后,通过琼脂糖凝胶电泳,将噬菌体基因组和蛋白及其他杂质分开;

(6) 噬菌体基因组的回收:紫外灯下切除含有目的基因的胶条,用滤纸吸尽凝胶琼脂表面的液体,尽量减少不含目的基因的凝胶量,尽量切碎凝胶,置于1.5mL离心管中,-80 $^{\circ}$ C放置20min,室温融化,10000r/m离心10min,将上层液和下层凝胶全部通过0.22 μ m的滤膜,收集滤液,滤液中加入等体积苯酚氯仿异戊醇=25:24:1体积比,抽提1-2次,最后用等体积氯仿抽提一次,取上清;

(7) 噬菌体基因组的保存:上清中加入1/10体积的NaAc和2倍体积的95%乙醇,混匀,-20 $^{\circ}$ C静置2h后,10000r/m,离心10min,弃去上清,沉淀加入200 μ L 70%乙醇,10000r/m离心5min,重复洗涤两次后,置于室温干燥,加入50 μ L ddH₂O,置于-20 $^{\circ}$ C保存。

一种新的提取噬菌体基因组DNA的方法

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及一种新的快速经济提取噬菌体基因组DNA的方法。

技术背景

[0002] 噬菌体被称为“细菌的天然杀手”,是一种特异性感染细菌的病毒。噬菌体在自然界中随处可见,凡是各类微生物存在的地方,都有相应种类的噬菌体存在,且其数目与宿主菌的数量成正比。噬菌体被认为是自然界中最丰富和最多样化的生物实体,其数量是细菌的10~100倍。噬菌体的结构简单,由蛋白质外壳包裹的遗传物质构成。噬菌体基因组可以由DNA或RNA组成,绝大部分的噬菌体的遗传物质为DNA,核酸的结构可以是单链或双链、闭合环状或线性分子。

[0003] 随着19世纪40年代商品化的抗生素的出现,噬菌体作为抗菌剂逐渐被人们所忽略。然而,近年来随着细菌耐药性的增强,多重耐药细菌不断出现,噬菌体作为应对难治愈的多重耐药细菌感染最有潜力的抗菌剂,越来越引起人们的关注。除了临床应用,噬菌体在基因工程方面也具有重要意义。另外,噬菌体的横向水平转移是细菌耐药的主要原因之一。细菌基因组中广泛存在着噬菌体的痕迹,显示噬菌体与细菌共同进化。噬菌体载体在文库筛选,噬菌体展示技术、分子遗传学、合成生物学等领域都有广泛的应用。

[0004] 基因组DNA提取是分子克隆研究的第一步。无论是基因组测序还是基因重组,均要求提取的基因组DNA达到一定浓度,高质量且不受宿主菌基因组污染。现有的提取方法通常分两步,即先用PEG沉淀法制备噬菌体颗粒,再从噬菌体颗粒中提取基因组DNA。大多数噬菌体能被PEG沉降后收集,但噬菌体种类繁多,生物特性差异很大,基因组DNA的提取方法缺乏广泛适用性。比如,对氯仿敏感的噬菌体在氯仿抽提时可能造成大量损失,使噬菌体数量减少,不能提取足量的基因组DNA;对温度不稳定噬菌体在加入蛋白酶K 56℃处理时,也可能会有大量的损失,使噬菌体失活,基因组降解,使得提取质量不能完全满足使用要求。

[0005] 本发明中对噬菌体基因组DNA提取的传统方法进行改进,特别适用于对氯仿敏感噬菌体的基因组的提取,使得传统方法更具有普遍适用性。

发明内容

[0006] 本发明目的是针对现有技术存在的不足,提供一种新的噬菌体DNA提取的方法,具有快速经济,节约人力物力的特点,本发明中的方法提取的基因组总量大,质量高。

[0007] 本发明提供了一种新的噬菌体基因组DNA的提取方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0008] 一种新的噬菌体基因组DNA的提取方法,其特征在于:浓缩噬菌体颗粒步骤中,去除细胞碎片,去除宿主菌的核酸物质,加入PEG6000使噬菌体沉降,TM缓冲液重悬噬菌体;直接采用尿素变性剂分离噬菌体基因组DNA;通过琼脂糖凝胶电泳的方法,将噬菌体基因组DNA与蛋白及其他杂质分开;采用低温冷冻含基因组DNA的凝胶,室温融化后过滤获得噬菌

体基因组DNA溶液。

[0009] 而且,所述的噬菌体为对氯仿敏感的铜绿假单胞菌噬菌体 ϕ H2和金黄色葡萄球菌噬菌体Z-1。

[0010] 而且,具体方法如下:

[0011] (1)噬菌体的扩增:过夜培养宿主菌,2% (V/V) 接种于新鲜LB培养基中,按照最佳MOI加入噬菌体,适宜温度振荡培养至宿主菌完全裂解;

[0012] (2)宿主菌细胞碎片及基因组的去除:裂解液加入NaCl至终浓度为0.1M,混匀溶解后冰浴1h,10000r/m,离心20min,取上清加入DNase I和RNaseA至终浓度为2.5 μ g/mL,混匀,37 $^{\circ}$ C静置1h;

[0013] (3)噬菌体的浓缩:继续加入PEG6000至终浓度为10%,充分振荡溶解后,置于4 $^{\circ}$ C,过夜,10000r/m,离心20min,弃去上清,用1/50体积的TM缓冲液将沉淀重悬,不使用氯仿抽提直接加入DNase I和RNaseA,终浓度为10 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C静置1h;

[0014] (4)宿主菌基因组的去除:加入DNase I和RNase A,终浓度为10 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C静置1h;

[0015] (5)噬菌体外壳蛋白的变性:将重悬液与10M尿素等体积混合后,通过琼脂糖凝胶电泳,将噬菌体基因组和蛋白及其他杂质分开;

[0016] (6)噬菌体基因组的回收:紫外灯下切除含有目的基因的胶条,用滤纸吸尽凝胶琼脂表面的液体,尽量减少不含目的基因的凝胶量,尽量切碎凝胶,置于1.5mL离心管中,-80 $^{\circ}$ C放置20min,室温融化,10000r/m离心10min,将上层液和下层凝胶全部通过0.22 μ m的滤膜,收集滤液,滤液中加入等体积苯酚氯仿异戊醇=25:24:1体积比,抽提1-2次,最后用等体积氯仿抽提一次,取上清;

[0017] (7)噬菌体基因组的保存:上清中加入1/10体积的NaAc和2倍体积的95%乙醇,混匀,-20 $^{\circ}$ C静置2h后,10000r/m,离心10min,弃去上清,沉淀加入200 μ L 70%乙醇,10000r/m离心5min,重复洗涤两次后,置于室温干燥,加入50 μ L ddH₂O,置于-20 $^{\circ}$ C保存。

[0018] 本发明优点和技术效果如下:

[0019] 本发明在提取过程中使用TM缓冲液重悬后,不使用氯仿抽提,直接加入核酸酶,去除未除尽的宿主菌的基因组,然后使用尿素代替蛋白酶K,使外壳蛋白变性后,通过琼脂糖凝胶电泳使蛋白与基因组DNA分开,然后使用冻融回收的方法,回收噬菌体的基因组DNA。此方法操作简便,特别适用于对氯仿敏感的噬菌体,适用范围更广,大大减少实验成本,缩短提取时间。相对于不经过氯仿抽提提取的基因组浓度比抽提后提取的基因组浓度要高很多,也体现了在抽提过程中,噬菌体损失量很大。其次,噬菌体经过氯仿抽提后,蛋白酶消化后,噬菌体基因组出现了明显的降解。对于氯仿敏感型噬菌体,不采用氯仿抽提,避免造成噬菌体大量损失,噬菌体基因组降解等情况。

附图说明

[0020] 图1噬菌体 ϕ H2基因组凝胶电泳图,注:75mL噬菌体 ϕ H2裂解液提取的基因组DNA最终溶解在50 μ L ddH₂O中,使用核酸蛋白测定仪(ThemoNanoDrop2000)测量基因组DNA纯度,浓度为42.1ng/ μ L,A260/A280=1.662,A260/A230=1.687。

[0021] 图2.氯仿抽提对噬菌体 ϕ H2基因组DNA的影响注:1号电泳孔为:氯仿抽提前;2号

电泳孔为:氯仿抽提后,加入蛋白酶K消化;3号电泳孔为:氯仿抽提后提取的噬菌体基因组;
4号电泳孔为:不经过氯仿抽提提取的噬菌体基因组

[0022] 图3:不经过氯仿处理提取噬菌体基因组,注:1号电泳孔为:TM缓冲液重悬;2号电泳孔为:加入DNase I,RNaseA消化;3号电泳孔为:加入EDTA整合核酸酶;

[0023] 图4噬菌体Z-1基因组的琼脂糖凝胶电泳图,注:75mL噬菌体Z-1裂解液提取的基因组DNA最终溶解在50 μ L ddH₂O中,使用核酸蛋白测定仪(ThermoNanoDrop 2000)测量基因组DNA纯度,浓度为20.55ng/ μ L,A260/A280=1.877,A260/A230=1.495。

[0024] 图5为噬菌体Z-1基因组提取方法中,各步骤取样后的琼脂糖凝胶电泳图,

[0025] 注:M:15kb DNAMarker

[0026] 1.裂解液

[0027] 2.DNase I和RNaseA 37 $^{\circ}$ C处理1h(DNase I和RNaseA终浓度5 μ g/mL)

[0028] 3.NaCl冰浴处理1h离心后上清(NaCl终浓度0.1M)

[0029] 4.PEG过夜沉降离心前(PEG终浓度10%)

[0030] 5.TM重悬后(75mL裂解液离心后,500 μ L TM重悬)

[0031] 6.TM重悬+核酸酶37 $^{\circ}$ C处理1h(DNaseI和RNaseA终浓度10 μ g/mL)

[0032] 7.TM重悬+EDTA+SDS后(EDTA终浓度50mM;SDS终浓度0.5%)

[0033] 图6氯仿抽提对噬菌体Z-1的影响

[0034] 注:M为15kb DNAMarker;1,2,3,4号电泳孔分别为为TM重悬后,氯仿抽提0,1,2,3次后,上清与等体积10M尿素混合后的琼脂糖凝胶电泳。

具体实施方式

[0035] 以下实施例是对本发明的进一步说明,而不是对本发明的限制。

[0036] 一种新的噬菌体基因组DNA的提取方法,浓缩噬菌体颗粒步骤中,TM缓冲液重悬后,不使用氯仿抽提,避免氯仿抽提过程中,造成噬菌体的变性丢失;不采用蛋白酶K消化外壳蛋白的方法,直接采用尿素变性剂分离噬菌体基因组DNA;通过琼脂糖凝胶电泳的方法,将噬菌体基因组DNA与蛋白及其他杂质分开;采用低温冷冻含基因组DNA的凝胶,室温融化后进一步用一次性除菌滤器获得噬菌体基因组DNA溶液。

[0037] 具体方法如下:

[0038] (1)噬菌体的扩增:过夜培养宿主菌,2% (V/V) 接种于新鲜LB培养基中,按照最佳MOI加入噬菌体,适宜温度振荡培养至宿主菌完全裂解

[0039] (2)宿主菌细胞碎片及基因组的去除:裂解液加入NaCl至终浓度为0.1M,混匀溶解后冰浴1h,10000r/m,离心20min,取上清加入DNase I和RNaseA至终浓度为2.5 μ g/mL,混匀,37 $^{\circ}$ C静置1h

[0040] (3)噬菌体的浓缩:继续加入PEG6000至终浓度为10%,充分振荡溶解后,置于4 $^{\circ}$ C,过夜,10000r/m,离心20min,弃去上清,用1/50体积的TM缓冲液将沉淀重悬,不使用氯仿抽提直接加入DNase I和RNaseA,终浓度为10 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C静置1h

[0041] (4)宿主菌基因组的去除:加入DNase I和RNase A,终浓度为10 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C静置1h

[0042] (5)噬菌体外壳蛋白的变性:将重悬液与10M尿素等体积混合后,通过琼脂糖凝胶电泳,将噬菌体基因组和蛋白及其他杂质分开

[0043] (6) 噬菌体基因组的回收:紫外灯下切除含有目的基因的胶条,用滤纸吸尽凝胶琼脂表面的液体,尽量减少不含目的基因的凝胶量,尽量切碎凝胶,置于1.5mL离心管中,-80℃放置20min,室温融化,10000r/m离心10min,将上层液和下层凝胶全部通过0.22μm的滤膜,收集滤液,滤液中加入等体积苯酚氯仿异戊醇(25:24:1)抽提1-2次,最后用等体积氯仿抽提一次,取上清

[0044] (7) 噬菌体基因组的保存:上清中加入1/10体积的NaAc和2倍体积的95%乙醇,混匀,-20℃静置2h后,10000r/m,离心10min,弃去上清,沉淀加入200μL 70%乙醇,10000r/m离心5min,重复洗涤两次后,置于室温干燥,加入50μLddH₂O,置于-20℃保存。

[0045] 实施例1

[0046] 按照上述实施方案,提取氯仿敏感型噬菌体基因组DNA,其中噬菌体名称为ΦH2,分类名称为Pseudomonas aeruginosa PA14Phage。噬菌体ΦH2裂解的宿主菌,名称为:铜绿假单胞杆菌PA14,分类名称为Pseudomonas aeruginosa。

[0047] ①采取相同的噬菌体裂解液制备方法

[0048] ②氯仿抽提对噬菌体ΦH2滴度的影响

[0049] 在噬菌体基因组提取过程中,TM缓冲液重悬后,加入氯仿抽提,去除残留的PEG6000。用双层平板法测定氯仿抽提前后的噬菌体滴度。

[0050] 氯仿抽提前,ΦH2滴度为 6×10^{11} pfu/ml,氯仿抽提后,滴度为 3.6×10^{10} pfu/ml,损失达到94%,严重影响提取的噬菌体基因组DNA的浓度。

[0051] ③氯仿抽提对噬菌体ΦH2基因组DNA的影响:

[0052] 在提取过程中,TM缓冲液重悬后,采用不加氯仿和加入氯仿抽提的方法提取基因组,结果如图1所示,相对于不经过氯仿抽提提取的基因组浓度比抽提后提取的基因组浓度要高很多,也体现了在抽提过程中,噬菌体损失量很大。其次,噬菌体经过氯仿抽提后,蛋白酶消化后,噬菌体基因组出现了明显的降解。对于氯仿敏感型噬菌体,不采用氯仿抽提,避免造成噬菌体大量损失,噬菌体基因组降解等情况。

[0053] ④在上述实施方案中,TM缓冲液重悬后,直接加入DNase I,RNase A消化,不经过氯仿处理提取噬菌体基因组,结果如图2所示:不经过氯仿处理,在用蛋白酶K消化后,没有明显的降解。采取这一方法,提取噬菌体基因组,结果如图3所示:利用核酸分析仪分析A260/A280能在1.8以上,A260/A230在2.0左右,为纯净的DNA。

[0054] 实施例2:

[0055] 提取金黄色葡萄球菌噬菌体Z-1基因组DNA

[0056] (1) 37℃过夜培养宿主菌,2% (V/V) 接种于100mL新鲜LB培养基中,按照最佳MOI加入噬菌体,30℃,220r/m振荡培养8h

[0057] (2) 加入NaCl至终浓度为0.1M,混匀溶解后冰浴1h,10000r//m,离心20min

[0058] (3) 裂解液中加入DNase I和RNase A至终浓度为5μg/mL,混匀,37℃静置1h

[0059] (4) 离心后上清转移到另一离心管中,加入PEG6000至终浓度为10%,充分振荡溶解后,置于4℃,过夜

[0060] (5) 将过夜处理液10000r/m,离心20min,弃去上清

[0061] (6) 用1/50体积的TM缓冲液将沉淀重悬,加入DNase I和RNaseA,终浓度为10μg/mL,37℃静置1h

- [0062] (7) 加入EDTA (pH=8.0) 至终浓度为50mmol/L,
- [0063] (8) 加10M尿素与噬菌体等体积混合后,通过琼脂糖凝胶电泳
- [0064] (9) 紫外灯下切除含有目的基因的胶条,用滤纸吸尽凝胶琼脂表面的液体,尽量减少不含目的基因的凝胶量,尽量切碎凝胶,置于1.5mL离心管中,-80℃放置20min,室温融化,10000r/m离心10min,
- [0065] (10) 将上层液和下层凝胶全部通过0.22μm的滤膜,收集滤液,加入等体积的苯酚氯仿异戊醇(25:24:1)混匀,8000r/m离心10min,收集上清
- [0066] (11) 上清移至新管,加等体积氯仿混匀,8000r/m离心10min
- [0067] (12) 取上清至新管,加入1/10上清体积的3M NaAc和2倍上清体积的95%乙醇,振荡,混匀,-20℃静置2h,10000r/m离心10min
- [0068] (13) 弃去上清,沉淀加入500μL 75%乙醇,10000r/m离心5min,重复洗涤两次后,置于室温干燥
- [0069] (14) 加入50μL ddH₂O,取1μLDNA溶解液检测DNA质量
- [0070] (15) DNA质量符合要求后,将DNA冷冻保存。
- [0071] 按照以下配方配置试剂:
- [0072] (1) 10mg/mL DNase I 5mL 0.3M NaCl溶液与5mL 60%甘油按照体积比1:1混合后所得溶液,溶解100mg的DNase I,配制成10mg/mL DNase I
- [0073] (2) 10mg/mL RNase A 4.5mL 10mM (pH=5.2) 醋酸钠100℃加热处理15min后加入0.5mL (1/10体积) 1M Tris-HCl (Ph=7.4) 后与5mL 60%甘油按照体积比1:1混合后所得溶液,溶解RNaseA,配制成5mg/mL RNaseA
- [0074] (3) TM缓冲液0.05M Tris-HCl (pH=7.5), 0.2%MgSO₄·7H₂O
- [0075] (4) 0.5M EDTA (pH=8.0) 溶液称取EDTA93.7g,溶于400mL双蒸水中,用NaOH调节溶液pH至8.0,定容至500mL
- [0076] (5) 10mg/mL蛋白酶K将100mg蛋白酶K加入到10mL 10mM CaCl₂溶液中,轻轻摇动,直至蛋白酶K完全溶解,分装后-20℃保存
- [0077] (6) 20%SDS溶液称取20g SDS,双蒸水定容至100mL。



图1

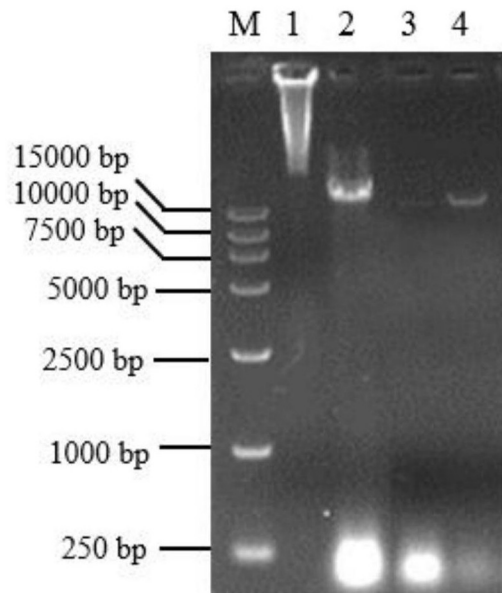


图2

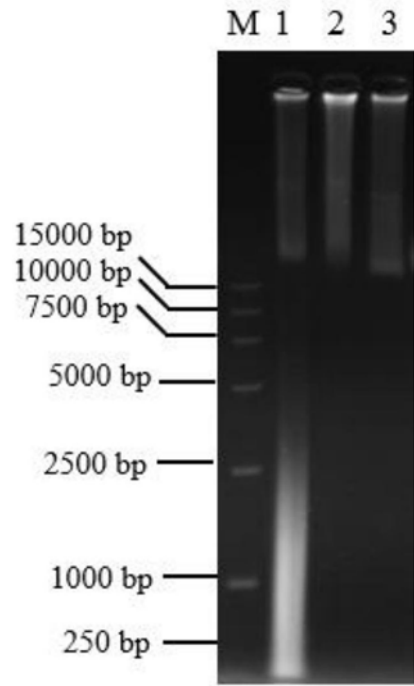


图3

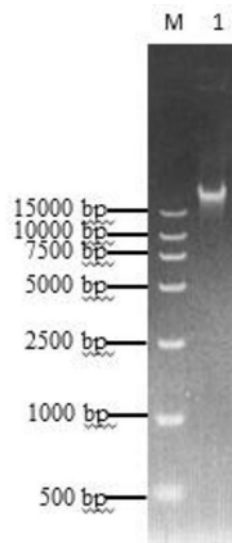


图4

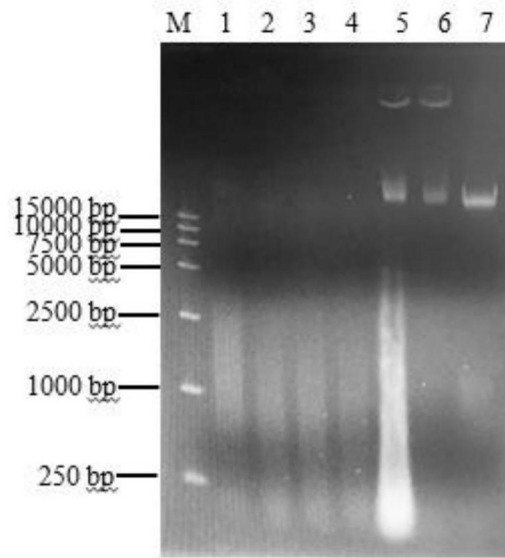


图5

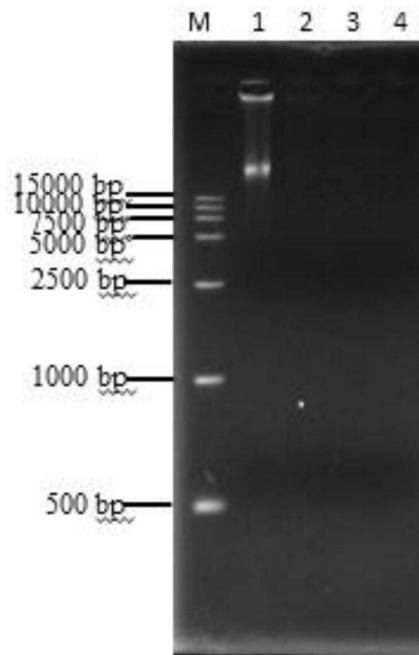


图6