

一种快速高效提取酵母质粒的方法

张怡, 刘坤, 曹鹏, 魏森, 韦丹丹, 杜建, 李鹏坤, 李成伟*

(周口师范学院 植物遗传与分子育种重点实验室, 河南 周口 466001)

摘要: 质粒提取是遗传工程操作的重要步骤。酵母细胞壁坚韧, 不易破壁, 使酵母质粒提取变得非常困难。为了获得一种快速、简便、高效、稳定的提取酵母质粒的方法, 利用琼脂糖凝胶电泳、核酸蛋白测定仪和 PCR 扩增等方法, 对玻璃珠液氮法、蜗牛酶法和试剂盒法提取的酵母质粒, 在产率、纯度和对后续实验的影响等方面进行了比较。结果表明, 与另外两种方法比较, 玻璃珠液氮法提取酵母质粒具有效率高、质量好、成本低、时间短、操作简单的优点, 可作为实验室规模化提取酵母质粒的常用方法。

关键词: 酵母菌; 质粒提取; 玻璃珠液氮法

中图分类号: Q 782 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)11—1194—05

A Fast, Efficient and Economical Method for Isolating Plasmid From Yeast

ZHANG Yi, LIU Kun, CAO Peng, WEI Sen, WEI Dan-dan, DU Jian, LI Peng-kun, LI Cheng-wei*

(Key Laboratory of Plant Genetics and Molecular Breeding, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China)

Abstract: Plasmid extraction is an important but difficult step of the genetic engineering operations, because of the yeasts cells with tough and unbreakable cell wall. For getting one fast, simple, efficient and stable method of plasmid extraction from yeasts, we employed the techniques of agarose gel electrophoresis, spectrophotometer and PCR amplification, and compared the yield, purity of plasmids which were isolated from yeasts with the methods of glass beads-liquid nitrogen, snailase and kit. The results showed that the method of glass beads-liquid nitrogen had the advantages of high efficiency, good quality, low cost, simple operation in contrast to the other two methods, and it can be used as a laboratory scale commonly method for extraction of yeast plasmid.

Keywords: yeast, plasmid extraction, glass beads-liquid nitrogen method

酵母菌是一类单细胞低等真核微生物, 易培养、繁殖快、遗传背景清楚, 不仅是一种实验室常用

的真核模式生物, 也是一种重要的工业发酵微生物^[1-2]。然而, 酵母菌作为一种单细胞真菌, 其细胞膜外有

收稿日期: 2013-05-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071807, 31272168); 周口师范学院实验室开放项目(K201337)。

作者简介: 张怡(1985—), 女, 河南汝阳人, 理学硕士, 实验师, 主要从事基因工程及植物与微生物互作研究。

E-mail: yizhang0401@sina.com

* 通信作者: 李成伟(1972—), 男, 河南民权人, 农学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事植物与病原体互作和抗性分

子育种研究。E-mail: lichengweiwau@hotmail.com

一层厚度约为 0.1~0.4 μm 的细胞壁,不少文献指出:酵母细胞的细胞壁主要成分为多糖(85%~90%)和蛋白质(10%~15%),其中多糖是由甘露聚糖、 β -葡聚糖和少量的几丁质等组成。处于细胞壁内层的 β -葡聚糖与几丁质共价相连起到细胞骨架的作用;而外层的甘露聚糖与中层蛋白质中的丝氨酸或苏氨酸以 O-糖苷键相连接,形成的甘露糖蛋白覆盖于细胞表面,给予酵母细胞一定的韧性^[3]。

酵母细胞坚韧的细胞壁致使其破壁不易,给遗传工程操作,如质粒提取带来了不少的困难。以往的机械破壁方法如研磨法^[4]、冻融法^[5]、高压均质法^[6]、超声波法^[7]等对酵母细胞的细胞壁破壁效果不理想,并且有些方法还有可能破坏胞内生物大分子物质的活性;珠磨机法的破壁效果良好,但其所需设备需要进口,价格昂贵^[8];蜗牛酶法通过多种酶的协同作用对酵母细胞壁起到了较好的裂解作用^[9],但该方法操作时间较长,步骤较为繁琐,并且提取的质量相对不高;而近期发展起来的超高压破壁法对实验的条件及设备有很高的要求,难于大范围推广,不适合于实验室应用^[10];商品化的试剂盒成本高,实验步骤繁琐,且提取质量一般。基于以上的原因,作者在玻璃珠法的基础上建立了一种快速高效、操作简便、效果良好的提取酵母质粒的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 仪器设备 灭菌锅:江阴滨江医疗设备有限公司的 11J-939 产品;紫外凝胶成像系统:上海天能 Tanon-2500 产品;核酸蛋白测定仪:艾本德公司的 BioPhotometer plus 产品;离心机:Eptisa microfrige-BL。

1.1.2 试剂 玻璃珠:美国 Biospec 公司,0.5 mm;液氮;酿酒酵母菌(含有 pGBKT7-Avr3a 质粒的 Y187);蜗牛酶:北京拜尔迪生物科技有限公司;DL15000Marker、Taq 酶、dNTP:日本 Takara 公司。YPD 培养基:yeast extract 1%,peptone 2%,D-dextrose 2%,高压灭菌;酵母破壁缓冲液(buffer1):2% Triton X-100,1% SDS,100 mmol/L NaCl,10 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0),1 mmol/L Na₂EDTA。裂解液(1 mL):20 μL TritonX-100,100 μL 10 g/dL SDS,100 μL 1 mol/L NaCl,10 μL 1 mol/L Tris,2 μL

0.5 mol/L EDTA,用灭菌水补足,过滤除菌。

1.2 方法

1.2.1 酵母细胞的培养 把保存的酵母菌液接种到装有 400 mL YPD 液体培养基的 1 L 锥形瓶中,置于恒温振荡培养箱中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 16 h。将扩大培养液以体积分数 10%接种到新的 YPD 液态培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 36 h,作为提取质粒菌液备用。

1.2.2 玻璃珠液氮法 将待提取酵母菌液 10 mL 13 000 r/min 离心 1 min,弃上清液,加入 1.2 mL buffer1,漩涡振荡使悬浮;将悬浮液分装到事先准备好的盛有玻璃珠的 1.5 mL EP 管中(玻璃珠装到 EP 管 0.5 刻度线处,大约 0.3 g),每管 200 μL ,涡旋振荡 5 min;液氮冻存 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 沸水煮沸 1 min,反复冻融 3~5 次;12 000 r/min 离心 2 min,取大约 200 μL 上清液到新 EP 管中。加入 0.1 倍体积的 3 mol/L 的 NaAc 约 20 μL ,混匀;加入大于 2 倍体积的无水乙醇约 500 μL ,混匀,-80 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min;13 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 70%的无水乙醇洗涤沉淀两次,吹干沉淀,用 25 μL TE (10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,pH 8.0)溶解质粒;加入 0.5 μL 10 mg/mL 的 RNaseA,37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min,冷却后-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。此方法记为方法 I,提取三个样品比较分析。

1.2.3 试剂盒法 取 10 mL 酵母菌液,参照试剂盒的说明书进行操作,最后用 25 μL TE 溶解质粒,以便于和其他方法比较。此方法记为方法 II,提取三个样品比较分析。

1.2.4 蜗牛酶法 取 10 mL 酵母菌液,用灭菌水洗涤两次;加入 600 μL 裂解液,每 10 mL 菌液加 100 mg 蜗牛酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 消化过夜;加入饱和酚 450 μL ,氯仿/异戊醇(24:1) 150 μL ,轻轻颠倒混匀使溶液成为乳状,并保持 10 min,3 000 r/min 离心 10 min;吸取上清液,用氯仿/异戊醇(体积比 24:1)450 μL 再抽提 1 次,10 000 r/min 离心 5 min;取上清液加入异丙醇 800 μL ,-20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min;10 000 r/min 离心 5 min,沉淀物用 70%乙醇洗两次,自然干燥后溶于 25 μL TE 缓冲液;加入 0.5 μL 10 mg/mL 的 RNaseA,37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min,自然冷却后-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。此方法记为方法 III,提取三个样品比较分析。

1.2.5 提取酵母质粒产率及质量分析 用 1.0 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测三种方法提取的酵母质粒的

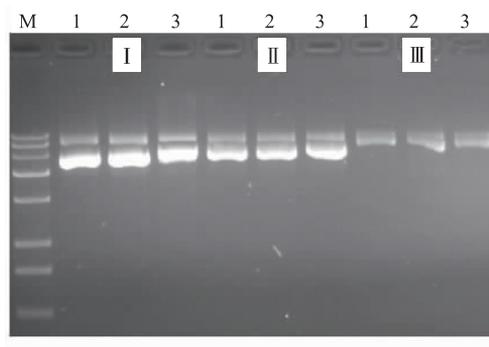
大小、降解情况和浓度。取 4 μL 质粒与 2 μL 上样缓冲液混合后点入 1.0 g/dL 琼脂糖凝胶电泳,以 DL15 000 为 marker,4 V/cm 电泳 20 min,凝胶成像系统拍照。同时取 1 μL 质粒,用分光光度计和核酸蛋白测定仪测定三种方法提取酵母质粒的 OD 值及 $A_{260/280}$ 值,根据 OD 值计算质粒的产率。

1.2.6 提取酵母质粒的 PCR 检测 根据酵母质粒的目的基因序列设计特异扩增的引物,对所提取的酵母质粒进行 PCR 检测,引物序列分别为 F(5'-ATCGCTCTGGCAATTATGCT-3')、R(5'-CTAATATCCAGTGAGCCCCA-3'),引物合成由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。PCR 反应混合液总体积为 20 μL : 酵母质粒 1 μL , 上下游引物分别为 1.5 μL , dNTP 2 μL (各 2.5 mmol/L), *Taq* 0.5 μL (5 U/ μL), 10 \times PCR Buffer 2 μL , ddH₂O 11.5 μL 。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s;52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1.0 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像系统观察拍照。

2 结果与分析

2.1 质粒的产率

在采取不同的方法提取酵母质粒时,其产率不相同。从质粒电泳条带亮度可以大致判断质粒产率的高低。作者用的 3 种方法中,玻璃珠液氮法提取的质粒其电泳条带明显亮于其它方法提取质粒的电泳条带,见图 1,说明玻璃珠液氮法提取质粒的产率最高。该检测结果得到了分光光度计检测结果的证实,见表 1。通过对比分光光度计检测得到的 3 种提取酵母质粒方法的产率可以看出,玻璃珠液氮法提取质粒产率最高,试剂盒法其次,蜗牛酶法效果最差,玻璃珠液氮法提取质粒产率的平均值比试剂盒法提取质粒产率的平均值高出 1 倍多,比蜗牛酶法提取质粒产率的平均值高出 5 倍多。方差分析 (SSR) 检验表明,三种方法差异极显著。由图 1 可以看出,玻璃珠液氮法提取的酵母质粒呈现两条清晰的电泳条带,基本无降解现象;而用蜗牛酶法提取的酵母质粒电泳条带清晰度较低;试剂盒法提取的酵母质粒虽然条带清晰,但是产率不高。由此可以看出;对于提取酵母细胞的质粒,玻璃珠液氮法的提取效果较好。



I~III 和 1~3 分别代表文中 3 种方法的 3 个质粒样品, M 为 DL15000 DNA marker

图 1 用 3 种方法提取的酵母质粒的琼脂糖凝胶电泳检测结果
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis profiles of yeast plasmid extracted with three methods

表 1 用分光光度计计算的 3 种提取酵母质粒方法的产率
Table 1 Yield of yeast plasmid extracted with three methods estimated by spectrophotometer

(ng/mL)

样品	I	II	III
1	2365.0	1093.5	390.5
2	2274.0	1124.0	374.5
3	2428.0	987.5	405.0
平均值	2355.7A	1068.3B	390.0C

I~III 和 1~3 分别代表文中 3 种方法的 3 个质粒样品, 大写字母表示 $\alpha=0.01$ 的极显著水平

2.2 质粒的质量

从琼脂糖凝胶电泳检测结果来看,3 种方法提取的质粒基本上都有 2 条高相对分子质量条带,说明 3 种方法都能够提取相对完整的质粒,且质粒以两种形式存在。用分光光度计检测质粒的纯度,高纯度 DNA 的 $A_{260/280}$ 比值应在 1.8~2.0 之间。当 $A_{260/280}<1.8$ 时,DNA 样品中可能存在蛋白质污染;当 $A_{260/280}>2.0$ 时,DNA 样品中 RNA 的含量较高^[11]。从表 2 可以看出,不同方法提取的质粒在纯度上有一定差异。从 $A_{260/280}$ 检测值可以看出,玻璃珠液氮法提取的酵母质粒质量较好,用试剂盒提取的 DNA 质量较差,蜗牛酶法提取质粒的 RNA 含量较高 ($A_{260/280}>2.0$),试剂盒提取的质粒含有蛋白质杂质(酵母质粒样品 $A_{260/280}<1.8$)。由此可见,3 种提取方法中采用玻璃珠液氮法提取的质粒质量最高。

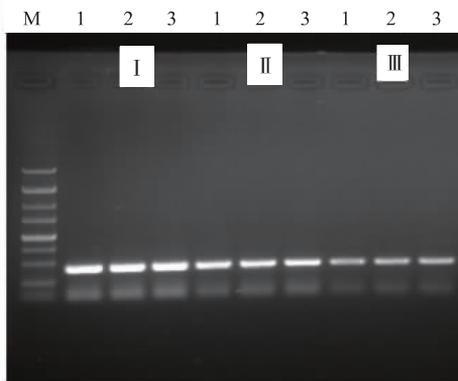
表 2 用 3 种方法提取酵母质粒的纯度

Table 2 Purity of plasmid extracted with three methods

样品	$A_{260/280}$		
	I	II	III
1	1.84	1.82	2.03
2	1.81	1.73	2.24
3	1.79	1.68	2.17
平均值	1.81	1.74	2.15

I-III 和 1-3 分别代表文中 3 种方法的 3 个质粒样品

PCR 扩增对质粒模板的质量要求较高,因此 PCR 扩增成功率成为评判 DNA 质量的重要依据之一。从图 2 可以看出,以 3 种方法提取的质粒为模板进行的 PCR 扩增,均获得了较清晰的扩增图谱。相比而言,以玻璃珠液氮法提取的酵母质粒为模板进行的 PCR 扩增条带清晰,浓度最大,其它两种方法的浓度略低于玻璃珠液氮法。综上比较,玻璃珠液氮法是一种比较好的提取酵母质粒的方法。



I-III 和 1-3 分别代表文中 3 种方法的 3 个质粒样品, M 为 DL5000 DNA marker

图 2 用 3 种方法提取的酵母质粒的 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis profiles of PCR products (plasmid was extracted with three methods)

3 结 语

自从 Fields 等 1989 年建立酵母双杂交技术以来^[12],双杂交技术发展迅速,酵母双杂交已成为研究蛋白质相互作用的一种重要的方法。当筛选得到相

互作用的阳性菌株后,为了进行下一步的验证,必须提取相应酵母菌的质粒。此外,分子生物学中不少实验也需要提取酵母细胞质粒,质粒质量将决定后续实验的成败。相对于大肠杆菌,酵母细胞壁较厚,且酵母质粒的拷贝数少,因此,酵母质粒的提取就成为影响一些分子生物学实验的限制性步骤。

通过比较三种提取酵母质粒的方法表明:蜗牛酶法和试剂盒法用时较长且步骤繁琐,并且提取质量一般;而玻璃珠液氮法是最好的一种,提取质粒浓度大,纯度相对较高,质粒也没有断裂现象。经分析认为,之所以玻璃珠液氮法提取的酵母质粒效率、纯度都比较高,可能是因为采用玻璃珠涡旋振荡和液氮反复冻融混合对酵母细胞进行破壁,首先玻璃珠机械振荡对酵母细胞初步破壁,然后液氮的冻结进一步破坏细胞膜的疏水键,增加其亲水性和通透性,同时在解冻的过程中细胞内水的结晶使细胞内外产生溶液浓度差,产生渗透压,并且细胞内形成的冰晶也会破坏细胞壁,使其对细胞壁的裂解较为充分,且不破坏其内部的生物大分子物质的活性,从而得到高质量、高纯度的酵母质粒。后续试验考虑对不同提取方法的酵母细胞破壁效果进行扫描电子显微镜的观察,在直观上对破壁效果进行验证。

另外,在实际中不仅要考虑实验的结果,且实验的成本也是需要考的因素之一。本研究中所用玻璃珠(454 g)920 元一瓶,试剂盒(50 次)2 057 元,蜗牛酶 350 元一瓶(10 g),液氮每升 8 元(本地价格),其余试剂按国产试剂价格计算,经过核算,由于玻璃珠可以回收灭菌重复利用,玻璃珠液氮法提取酵母质粒的成本最低,单个样品约为 1.7 元;试剂盒法提取酵母质粒的成本最贵,单个样品约 42 元;蜗牛酶法其次,约为单个样品 4.2 元。由此表明,综合实验费用和酵母质粒的提取效率可以得出,玻璃珠液氮法不仅提取酵母质粒效果好,而且可以显著降低实验成本。

本研究在玻璃珠法的基础上进行改进、创新,建立了玻璃珠液氮这种高效、低廉、快速的提取酵母质粒的方法,可以作为实验室大规模提取酵母质粒的常规方法推广应用。

参考文献:

[1] Theis J F, Dershowitz A, Irene C, et al. Identification of mutations that decrease the stability of a fragment of *S. cerevisiae*

- chromosome III lacking efficient replicators[J]. **Genetics**, 2007, 177(3):1445-1458.
- [2] 史锋, 黄宇啸, 李永富. 酿酒酵母抗氧化相关基因突变体对黄曲霉毒素 b1 的清除作用[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(5):39-42.
SHI Feng, HUANG Yu-xiao, LI Yong-fu. Detoxification of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* mutants of anti-oxidative relating genes[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(5):39-42. (in Chinese)
- [3] 刘晓永, 王强, 胡永金. 用微珠涡流法破壁酵母细胞[J]. 吉首大学学报:自然科学版, 2006, 27(6):110-113.
LIU Xiao-yong, WANG Qiang, HU Yong-jin. Disruption of the yeast cell walls by vortex-mini-bead disruption method[J]. **Journal of Jishou University: Natural Science Edition**, 2006, 27(6):110-113. (in Chinese)
- [4] 万其兵, 刘丽丽, 杨秀英. 真菌细胞破壁方法的研究[J]. 天津师范大学学报:自然科学版, 2004, 24(4):38-40.
WAN Qi-bing, LIU Li-li, YANG Xiu-ying. Study on the methods of breaking wall of fungus cell[J]. **Journal of Tianjin Normal University: Natural Science Edition**, 2004, 24(4):38-40. (in Chinese)
- [5] 蔡俊. 啤酒废酵母细胞壁破壁研究[J]. 酿酒, 2001, 28(4):104-105.
CAI Jun. The research of breaking the waste beer yeast cellswall[J]. **Liquor Making**, 2001, 28(4):104-105. (in Chinese)
- [6] 孙海翔, 尹卓容, 马美范. 高压均质破碎啤酒酵母细胞壁的研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(2):66-67.
SUN Hai-xiang, YIN Zhuo-rong, MA Mei-fan. Study on the cell wall breaking of brewer's yeast by high-pressure homogenization[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2002, 23(2):66-67. (in Chinese)
- [7] WASE D A J, PATEL Y R. Effect of cell volume of disintegration by ultrasonics [J]. **Chem Tech Biotechnol**, 1985, 35B:165-173.
- [8] Dallies N, Francois J, Paquet V. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Yeast**, 1998, 14(14):1297-1306.
- [9] Ezeronye O U, Okerentugba P O. Optimum conditions for yeast protoplast release and regeneration in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* using gut enzymes of the giant African snail *Achatina achatina* [J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2001, 32(3):190-193.
- [10] Chilton P, Isaacs N S, Mackey B, et al. The effects of high hydrostatic pressure on bacteria [J]. **High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology**, 1997, 229:225-228.
- [11] 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 等. 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法[J]. 实验室研究与探讨, 2009, 28(9):14-16.
LI Rong-hua, XIA Yan-shi, LIU Shun-zhi, et al. CTAB-improved method of DNA extraction in plant [J]. **Research and Exploration in Laboratory**, 2009, 28(9):14-16. (in Chinese)
- [12] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein to protein interactions[J]. **Nature**, 1989, 340(6230):245-246.

科技信息

美国 FDA 就食品接触制品中物质法定限量的信息提交程序征求意见

食品伙伴网讯 据美国联邦公报消息, 10月23日美国 FDA 发布通知, 就提议的食品接触制品中物质法定限量的信息提交程序征求意见。征求意见截止 2013 年 11 月 22 日。

为确保食品接触制品的物质符合限量标准, 申请者需向 FDA 提交以下信息: 1. 该物质的化学成分; 2. 该物质使用条件的详细说明; 3. 请求豁免作为食品添加剂监管依据的清晰表述; 4. FDA 用于评估该物质每日膳食浓度的数据; 5. 搜索该物质及相关物质毒理学数据的文献结果; 6. 该物质使用引起的环境影响信息。

食品接触物质的法定限量程序, 相比上市前通知程序, 具有一个优势。FDA 豁免的物质不限于提交豁免申请的生产商或供应商。其他的生产商或供应商只要使用条件符合豁免要求, 也可在食品接触制品中使用该豁免物质。因此, FDA 和生产商或供应商的整体负担都会降低, 生产商或供应商不需准备类似的提交申请, FDA 也不需审核类似的提交申请。

[信息来源] 食品伙伴网. 美国 FDA 就食品接触制品中物质法定限量的信息提交程序征求意见 [EB/OL]. (2013-10-25). <http://news.foodmate.net/2013/10/246788.html>