

# 高纯度质粒DNA规模化生产流程的建立和改进

李刚刚, 刘耘, 曹以诚

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006)

**摘要:** 通过对质粒提取过程进行分析, 探讨质粒提取过程中的影响因素, 分析影响质粒质量的因素, 以及优化提取工艺流程, 并建立质控标准来控制质粒提取过程中带来质量和数量损失, 从而制备出高纯度的质粒 DNA。温度诱导可以增加质粒 DNA 的产量, 在大肠杆菌对数生长期进行温度诱导, 从 37~43 °C, 每间隔 1 °C 进行诱导, 结果表明经 42 °C 诱导 12 h, 质粒 DNA 的产量可以增加 66% 以上, 为降低成本, 大规模生产重组质粒提供良好保障。另外对碱裂解粗提质粒的方法和流程进行改进, 采取 LiCl 去除细胞碎片和杂蛋白; PEG8000 沉淀质粒 DNA 从而去除经 RNAase 消化的 RNA; 之后利用少量的酚氯仿混合液去除蛋白质; 不仅蛋白质, RNA 去除干净, 而且在实验时间安排上以及试剂使用量上进行控制, 达到了贵重试剂使用量少, 去除杂质干净的效果, 更为后续的精提做好准备。利用凝胶层析, 亲和层析, 阴离子交换层析依次去除残余在质粒 DNA 中的蛋白质、RNA、非超螺旋 DNA 以及内毒素, 达到了制备高纯度质粒 DNA 要求, 并且达到了可以在动物实验中进行转染的质量要求。

**关键词:** 高纯度质粒 DNA; 规模化生产流程; 提取; 纯化; 层析技术

**中图分类号:** Q523; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2008)05-0433-06

## Foundation and Development of a Large-scale Production Procedure for High-purity Plasmid DNA

LI Gang-gang, LIU Yun, CAO Yi-cheng

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** The influential factors in the plasmid DNA extraction on the quality of the plasmid DNA was investigated, the extraction conditions of plasmid DNA were optimized and the quality-controlling standards were set in order to produce the high-purity plasmid DNA. Effect of temperature inducement on the production of plasmid DNA was studied by increasing the temperature from 37 °C to 43 °C at intervals of 1 °C. After 12 hours of cultivation at 42 °C, the plasmid yield was significantly increased by 66%, which demonstrated that the new method could be used for economically preparation of recombinant plasmids. Moreover, the standard alkaline lysis method for preparation of plasmid DNAs was modified and the optimized procedure was as follows: removing the cell fragments and the epactal proteins by LiCl; precipitating the plasmid DNA by PEG8000 to wipe off the digested RNA; and removing the reliquus protein by Phe-nol-CH<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>. In order to obtain the high-purity plasmid DNA, the crude plasmid DNA was further purified by different kinds of chromatography.

**Key words:** high-purity plasmid DNA; large-scale production procedure; extraction; purified; chromatography technology

质粒(Plasmid)是一种染色体外稳定的遗传因子, 大小从 1 kb~200 kb 不等, 为双链、闭环的 DNA 分子, 并以超螺旋状态存在于宿主细胞中。因为质粒在子代细胞中保持恒定的拷贝数, 并表达所携带的遗传信息, 所以常用于携带外源基因并导入宿主细胞表达出目标蛋白<sup>[1]</sup>。质粒 DNA 在转染细胞时效率较低, 而且用于基因治疗和核酸疫苗的质粒 DNA 的需求量日益增加, 因而工业化制备药用级质粒 DNA 的生产工艺逐渐受到关注<sup>[2]</sup>。质粒 DNA 是一种基因运载工具,

收稿日期: 2008-01-29

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划项目(N090412015); 国家自然科学基金项目(2005DKA64001); 广东省科技攻关计划重大项目(200521-E4023)

在分子生物学中有着极为广泛的应用前景, 而质粒 DNA 的分离提取是分子生物学试验中最基本的工作。质粒 DNA 的提取效率和纯度直接影响到分子生物学试验的成功与否, 比如酶切、连接、转染以及医学实验要求等。从细菌中分离质粒 DNA 的方法一般都包括 3 个基本步骤: (1) 培养细菌使质粒扩增; (2) 收集和裂解细菌; (3) 分离和纯化质粒 DNA<sup>[3]</sup>。然而, 现有的重组质粒制备方法的成本普遍较高, 尤其是重组菌的碱裂解所用溶液的体积较大、成本较高, 之后的纯化损失严重, 效果不理想。本研究在建立重组大肠杆菌温度诱导下的高密度发酵工艺的基础上, 通过对碱裂解后纯化的步骤和方法的改进, 建立了性

价比较高的纯化方法,为核酸疫苗或基因治疗重组质粒在兽医临床上的应用打下了坚实的基础。在综合评价了规模化生产流程后,对诸如碱裂解后去除蛋白质和 RNA。进行了流程上和试剂用量上的改进,通过比较不同方法提取到质粒 DNA 纯度和质量以及试剂成本的多少作为切入点,从而确定出一种适宜常规实验室提取质粒 DNA 的科学合理的方法。比如裂解后利用异丙醇沉淀缩小溶液体积,随后利用 LiCl 沉淀细胞碎片和杂蛋白,取得了良好的效果,同时还可以进行 RNA 的酶解,并用 PEG8000 沉淀质粒 DNA 以去除,对常规方法而言,减少了饱和酚和氯仿的利用,以及更好的去除裂解后的小分子 RNA<sup>[4-5]</sup>。但是大规模制备药用级的质粒 DNA,用常规的试剂提取方法再去去除杂质方面还远远不够,因而采取了凝胶层析,亲和层析,离子交换层析三种不同原理层析介质对质粒 DNA 进行纯化,摸索各种原理层析介质最佳洗脱条件。依据每种方法去除污染物能力、质粒 DNA 回收率大小、对质粒 DNA 构型影响,得到优化的生产质粒 DNA 工艺。纯化次序为:凝胶层析(Sephacryl S4 FF),亲和层析(Plasmid Select),和离子交换层析(SouresQ 30),最后进行超滤浓缩达到药用剂量<sup>[6]</sup>。内毒素的去除是整个质粒 DNA 纯化工艺的瓶颈之一,原因在于内毒素与质粒 DNA 相比,分子量和电荷密度很接近。内毒素的分子量从数十万到数千万,带有大量的负电荷,这就意味着,使用目前大规模制备药用质粒使用的 DNA 分子筛和亲和层析技术很难将内毒素降到很低的水平。为了解决此难题,引入了阴离子交换层析来去除内毒素,得到了明显的效果。但是离子交换层析得到的样品含有较高的盐,通过超滤来更换合适的缓冲液进一步去除污染物。整体的设计和实验的连贯性以及流程的合理性,保证能在很短时间内制备出高纯度的质粒 DNA,使得制备的质粒 DNA 的质量达到了临床应用标准。而其生产工艺简单、产率高,并建立了 DNA 疫苗质量检测平台,适合于大规模生产,对于 DNA 疫苗工业化生产具有重要的现实意义<sup>[7]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大肠杆菌 GT116(携带 pVAX 质粒);LB 培养基(进口 Oxiod 公司胰蛋白胨和酵母粉配制的 M6 标准的 LB 培养液):胰蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5 g/L,NaCl 10 g/L;溶液 I:400 g 葡萄糖 22 μL,1 mol/L Tris-Cl(pH 8.0) 25 μL,0.5 mol/L EDTA 20 μL,无菌水 633 μL。溶液 II:10 mol/L NaOH 20 μL,100 g/L

SDS 100 μL,无菌水 880 μL,现用现配。溶液 III:3 mol/L KAc-HAc pH 4.8。TE:10 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0),1 mmol/L EDTA(pH 8.0)。MarkerDL2000, Wide range marker 等均购自 TAKARA 生物技术有限公司;5 mol/L LiCl、RNA 酶、PEG 配制:1.6 mol/L NaCl(含 13% PEG 8000):NaCl 9.4 g,PEG 8000 13 g,加蒸馏水定容至 100 mL,高压蒸汽灭菌 20 min;酚、酚:氯仿:异戊醇(25:24:1);Buffer A:(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 mol/L,Tris 100 mmol/L,EDTA 10 mmol/L(0.5 mol/L EDTA 储液稀释);浓盐酸调 pH 7.0。普通滤纸过滤;Buffer B:NaCl 1.4 mol/L,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 mol/L,Tris 100 mmol/L,EDTA 10 mmol/L(0.5 mol/L EDTA 储液稀释),浓盐酸调 pH 7.0。普通滤纸过滤;Buffer C:NaCl 0.4 mol/L,Tris 100 mmol/L,EDTA 10 mmol/L(0.5 mol/L EDTA 储液稀释),浓盐酸调 pH 7.0。普通滤纸过滤;Buffer D:1 mol/L NaCl,100 mmol/L Tris,10 mmol/L EDTA(0.5 mol/L EDTA 储液稀释);浓盐酸调 pH 7.0,普通滤纸过滤。

### 1.2 仪器设备

紫外分光光度仪:优尼科公司;凝胶电泳系统、凝胶成像系统、层析仪:Bio-RAD 公司;Sephacryl S4 层析柱、Plasmidselect 层析柱、SOURCE 30Q 层析柱:Amersham 公司;超高速离心机:日立电器公司。

### 1.3 菌体的培养和鉴定

重组菌生长曲线的绘制,分别将 pVAX 大肠杆菌(GT116),单菌落划线接种含 50 μg/mL 卡那霉素的 3 mL 标准 LB 液体培养基,37 °C 培养,每隔 1 h 无菌取样 1 次,测量 OD<sub>600</sub> 值,并绘制细菌生长曲线。用接种针将 pVAX 转化过的大肠杆菌单菌落接种到 3 mL LB 培养液中;37 °C,8 h 培养后,取 2 mL 倒入 20 mL LB 培养液中;37 °C,培养 8 h 后,取 21 mL 倒入 480 mL 的 LB 培养液。分别接种 8 个 500 mL LB 培养液的摇瓶,放入温度为 36~38 °C 的 8 个温度梯度的摇床,培养 12 h。第 1、2 次接种剩余的 1 mL 菌液用分光光度计 OD<sub>600</sub> 检测其是否在对数生长期,取裂解前的菌液各 1 mL 测定在 OD<sub>600</sub> 下菌液的浓度,并用小量质粒抽提方法抽提后用凝胶图像分析系统(Quality One)进行核酸定量分析,以三次重复试验结果的平均值为依据,比较温度差异间的菌体质量和收获质粒差异,并得出初步结果。

### 1.4 菌体的裂解和粗提质粒

将细菌培养物置于冰浴 10 min,4 °C 下 8000 r/min 离心 15 min,收集获得细菌培养物沉淀,弃上清液,倒置离心管使上清液全部流尽。将所得沉淀重悬于 10

mL 冰预冷的 Solution I 中, 旋涡振荡 (务必要使细菌在 Solution I 中完全分散)。加入 20 mL 新鲜配制的 Solution II, 边加边缓慢旋转离心管, 盖紧管口, 旋转离心管数次, 以充分混匀内容物, 冰浴放置 5 min (应确保离心管的整个内表面均与 Solution II 接触, 不要振荡)。加入 15 mL 冰预冷的 Solution III, 盖紧管口, 缓慢旋转离心管数次以使细菌裂解物分散均匀, 冰浴 10 min, 4 °C, 12000 r/min 离心 10 min。上清液加入 0.6 倍体积的异丙醇, 充分混匀, -20 °C 放置 60 min 以上。室温下, 12000 r/min 离心 10 min 收集 DNA 沉淀 (如在 4 °C 离心, 盐也会发生沉淀)。小心弃去上清液, 倒置离心管以使所有液体流出, 加入 3 mL TE (pH 8.0) 溶解沉淀。加入 3 mL 冰预冷的 5 mol/L LiCl 溶液, 充分混匀, 室温放置 5 min 以上, 4 °C, 12000 r/min 离心 10 min, 将上清液转移到一新 50 mL 离心管中, 加入 6 mL 异丙醇, 充分混匀, 室温放置 10 min 以上<sup>[4]</sup>。室温下, 12000 r/min 离心 10 min, 小心弃去上清液, 沉淀用 70% 冷乙醇洗涤并干燥。先后分两次共加入 700  $\mu$ L 含 RNase TE (pH 8.0) 溶解质粒 DNA, 将之移入 1.5 mL 离心管中, 37 °C 水浴 30 min 除去 RNA。加入 700  $\mu$ L 含 13% (m/v) PEG 8000 的 1.6 mol/L NaCl, 充分混匀, 静置过夜。4 °C, 12000 r/min 离心 10 min, 小心弃去上清液<sup>[5]</sup>。加入 400  $\mu$ L TE (pH 8.0) 溶解核酸沉淀, 用等体积酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 抽提一次, 12000 r/min 离心 5 min, 取上层水相。将上层水相移入一个新的 1.5 mL 离心管中, 加入 0.1 倍体积 3 mol/L NaAC (pH 5.2) 及 2 倍体积冷无水乙醇, 混匀后 -20 °C 静置 10 min 以上。4 °C, 12000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 沉淀用 70% 冷乙醇洗涤并干燥, 核酸沉淀溶于 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O (或 TE pH 8.0) 中, 定量 DNA 浓度为 10 mg/mL, 保存于 -20 °C 备用。

### 1.5 柱层析纯化粗制质粒 DNA

本实验室的 Amersham 柱层析体系共有 3 道层析柱, 粗提的质粒 DNA 经过第一道层析柱后去除 RNA, 经过第二道层析柱后剩下超螺旋 DNA, 第三道层析柱去除内毒素。经此层析体系纯化过后的质粒可以用于药物实验<sup>[6]</sup>。步骤如下: 柱 1 (sepharose 4 fast flow, 柱内孔直径 2.5×80 cm), 设置 260 nm 和 280 nm 两个检测波长, 收集阈值 0.02 AU。600 mL buffer A 平衡柱, 流速 4 mL/min; 上样, 上样量以 1 L 菌液的提取物为宜。洗脱, Buffer A 洗 600 mL, 流速 4 mL/min。收集 260 nm 第一峰流出物, 该峰出峰时间约为 20 min, 第二峰流出物为 RNA。

柱 2 (plasmidselect, 柱内孔直径 1.6×20 cm), 设

置 260 nm 和 280 nm 两个检测波长, 收集阈值 0.05 AU。90 mL buffer A 平衡柱, 流速 6 mL/min; 上样, 以 4 mL/min 流速泵入不多于 3 次的柱 1 收集物; 洗柱, 60 mL buffer A 洗柱, 流速 4 mL/min; 洗脱; 150 mL buffer B 洗脱, 流速 4 mL/min, 收集 260 nm 峰流出物, 该峰出峰时间约为 5 min。

柱 3 (SOURCE 30Q, 柱内孔直径 1.6×20 cm), 设置 260 nm 和 280 nm 两个检测波长, 收集阈值 0.08 AU。90 mL buffer C 平衡柱, 流速 6 mL/min; 上样, 柱 2 收集物加入 4 倍体积的去离子水稀释, 充分混匀, 以 4 mL/min 流速泵入柱 3; 洗柱, 60 mL buffer C 洗柱, 流速 4 mL/min; 梯度洗脱, 设置 buffer C 百分比从 100% 到 0%, buffer D 百分比从 0% 到 100%, 洗脱体积 150 mL, 流速 4 mL/min。收集 260 nm 峰流出物, 该峰出峰时间约为 12 min。将纯化后的质粒加 2 倍无水乙醇沉淀后, 溶解于 -20 °C TE 中。然后用透析袋除盐保存。

### 1.6 质粒浓度和纯度鉴定

抽提方法抽提后用凝胶图像分析系统 (Quality One) 进行核酸定量分析, 与 marker 进行比较得出质粒浓度, 以三次重复试验结果的平均值为依据, 比较温度差异间的菌体质量和收获质粒差异, 并得出初步结果。紫外分光光度计下 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub> 的值, 并计算相应的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>, 评价其相应的纯度, 利用 OD<sub>260</sub> 计算出相应的浓度, 并比较不同温度诱导的质粒的产量差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 生长曲线的绘制

将 pVAX 转化 GT116 接种于标准 LB 培养基, 37 °C 振荡培养, 每隔 1 h 无菌取样 1 次, 测量 OD<sub>600</sub> 并绘制生长曲线, 结果表明细菌在标准 LB 培养基中培养 5~6 h 时进入对数生长中期。

### 2.2 温度诱导对质粒产量的影响

根据 pVAX 转化的大肠杆菌 GT116 在 M6 培养基中的生长曲线, 在对数生长中期时, 分别取部分培养物在 37~43 °C 继续培养, 其余在 37 °C 继续培养, 12 h 后各取 1 mL 培养物, 碱裂解法提取质粒 DNA 并进行定量分析。三次重复试验的结果表明, 与未进行温度转换 (继续在 37 °C 下培养) 相比, 经温度诱导后, 大肠杆菌的质粒产量均有所提高, 其中 42 °C 约提高 66%, 其他温度均小于在该温度下诱导的菌体产量和质粒产量 (表 1)。

分别将 pVAX 转化的大肠杆菌 GT116 在标准培

培养基中培养至对数生长中期,取部分培养物在 42 °C 继续培养,12 h 后,分别取 1 mL 培养物提取质粒 DNA,经琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶图像分析系统对质粒 DNA 进行定量分析。三次重复试验的结果显示,在 37 °C 培养条件下,大肠杆菌的质粒产量比其他温度诱导的低;而经高于 37 °C 诱导后,质粒产量均有所提高,且 42 °C 诱导的质粒产量比 37 °C 竟高出 2 倍以上(图 1)。

表1 重组菌(GT116)温度诱导的质粒产量比较分析

Table 1 Influence of temperature inducing on the plasmid yield

诱导温度	37 °C	38 °C	39 °C	40 °C
菌体OD <sub>600</sub>	2.17±0.11	2.41±0.17	2.38±0.21	2.74±0.13
质粒产量/(mg/L)	2.93±0.05	3.51±0.01	3.84±0.07	4.21±0.06
诱导温度	41 °C	42 °C	43 °C	
菌体OD <sub>600</sub>	2.81±0.12	2.97±0.23	2.94±0.20	
质粒产量/(mg/L)	4.34±0.10	4.87±0.07	4.65±0.14	

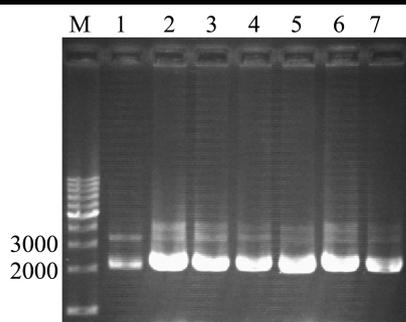


图1 不同温度诱导大肠杆菌质粒电泳结果。

Fig.1 Electrophoretogram of *E.coli* plasmid with different temperature inducing

注: M: Marker; 1: 37 °C 培养; 2: 38 °C 培养; 3: 39 °C 培养; 4: 40 °C 培养; 5: 41 °C 培养; 6: 42 °C 培养; 7: 43 °C 培养。

Note: M:Marker; 1:37 °C cultured;2:38 °C cultured; 3:39 °C cultured; 4:40 °C cultured; 5:41 °C cultured; 6:42 °C cultured; 7:43 °C cultured.

### 2.3 粗提过程的各个步骤和结果

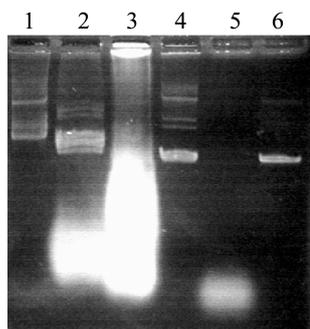


图2 碱裂解后初步纯化各步骤的电泳结果

Fig.2 Electrophoretogram of primary of purifying the plasmid

注: 1.为小提质粒对照; 2.为溶液三之后的大提样品; 3.为 3-LiCl 沉淀产物; 4.为除去 RNA 后样品; 5.为 PEG8000 沉淀后的上清液; 6.为纯化后的最终产物。

Note: 1:Control of small-scale extraction plasmid; 2:The sample of large-scale extraction plasmid; 3:The sediment by LiCl ; 4:The sample after removing the RNA; 5:The supernatant after PEG8000 precipitating; 6:The final product.

泳道 1 为经过 RNAase 酶解过的小提质粒对照; 泳道 2 为裂解后的上清液取 1 μL 点样结果,可以看出质粒状态良好,超螺旋丰富; 泳道 3 为经过 LiCl 沉淀出的细胞碎片,以及杂蛋白和 RNA 的复合物,可以明显的显示出除去了大量的杂质,而且沉淀物中不含质粒 DNA; 泳道 4 是经过加入 RNAase 酶解后的上清液,可以显著的显示出 RNA 均被讲解,而且只剩下少量细胞碎片和蛋白的残余; 泳道 5 为经过 PEG8000 沉淀的上清液,其中小分子 RNA 被沉淀出来,尽管之前被降解而没有被 EB 染色,但是由于上清液浓度极高,点样后的小分子 RNA 依然可以看出来还有很多,说明改沉淀方法用于 RNA 的清除比较有效; 泳道 6 是经过酚氯仿抽提过的,基本上不含 RNA,而且,泳道相对干净,超螺旋比例很高,证实短时间酚氯仿抽提对质粒质量影响不大,有利于更进一步的纯化(图 2)。

### 2.4 柱层析结果

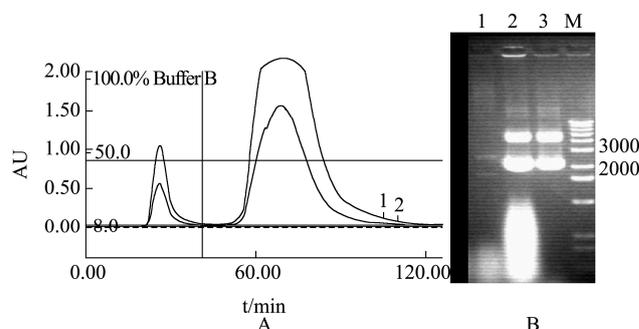


图3 Sepharose 4FF 凝胶层析纯化结果

Fig.3 Purification of plasmids by Sepharose 4FF molecular sieve chromatography

注: A:凝胶层析的峰图; B: 收集峰的电泳结果, 1: 第二个收集峰; 2: 样品; 3: 第一个收集峰; M:marker

Note: A : Molecular sieve chromatographic profile ; B: Electrophoretic profile; 1: peak 2 of Fig 1 A; 2 :lysed sample; 3: peak 2 of Fig 1 A; M:Marker.

经过初步纯化后,取 1 L 粗提质粒进样,约在 17 min 左右开始出峰,峰高 1.1 AU,之后约在第 57 min 出现第二个峰。前一个峰是质粒 DNA 峰,约收集到 100 mL 流出物,核算出大约有 3.8 mg 质粒(可见图

3A)。将第一个峰的收集物,和第二个峰的收集物和样品对照可见(图3, B);泳道1为第二个峰收集物,泳道2为样品,泳道3为第一个峰收集物,可以明显的看出RNA被分离出来,而质粒DNA则被保留下来,很好的分离了小分子化合物和RNA,而质粒DNA基本保持不变。

经过凝胶层析柱后的样品直接上样,经洗柱洗去为共价结合的非超螺旋DNA以及少量杂质,然后洗脱,约在12min后可以看到出现一个很陡的峰,但是缓慢下降的过程,在洗脱过程中,有部分质粒会损失,所以该峰的面积小于柱1的第一个峰,而且在之后用NaOH再生的时候,有部分DNA被冲出,也证实了亲和层析对出去非超螺旋质粒DNA有很好的效果(图4A);泳道1为柱1的第一个峰收集物,可以看到质粒中含有大量的非超螺旋DNA,泳道2可以看到非超螺旋的量明显减少,只剩微量残余,去除效果明显。

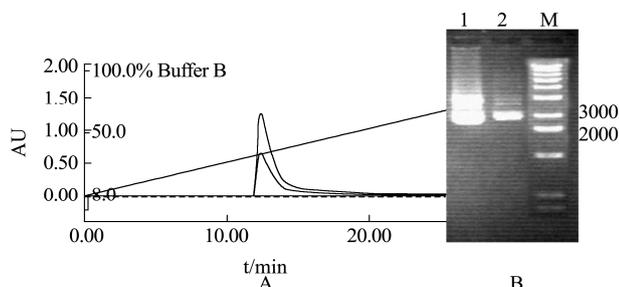


图4 Plasmid Select 亲和层析纯化结果

Fig.4 Purification of plasmids by affinity chromatography

Plasmid Select

注: A-亲和层析峰图; B-峰收集物电泳结果; 1-样品; 2-峰收集物; M-Marker.

Note: A-Affinity chromatographic profile; B-Electrophoretic profile; 1-condensed flowfraction; 2-plasmids; M-Marker.

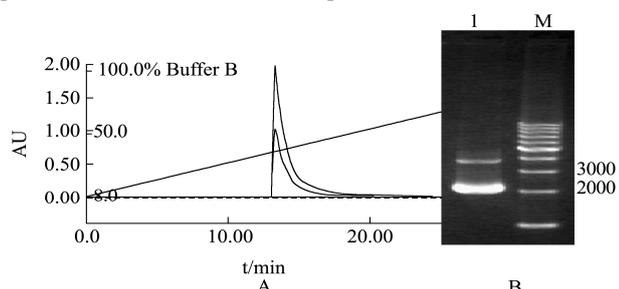


图5 SOURCE 30Q 离子交换纯化结果

Fig.5 Purification of plasmids by SOURCE 30Q anion exchange chromatography

注: A-离子交换层析峰图; B-质粒电泳结果, 1-质粒; M-Marker.

Note: A-Anion exchange chromatographic profile; B-Electrophoretic profile; 1-plasmids; M-Marker.

亲和层析后的峰收集物经过稀释4倍后上样,洗柱时不同于亲和层析,没有明显的峰,但是可以看到OD<sub>260</sub>和OD<sub>280</sub>均有明显的变化。洗脱是利用盐离子浓度的变化,对阴离子吸附能力的置换洗脱下质粒DNA,当达到某一浓度时,质粒DNA立刻洗脱下来,峰高,而且陡降,峰的面积和亲和层析峰面积相一致。泳道1可以看出质粒相当干净,纯度很高,但是由于在高盐浓度下的质粒DNA,出现了少量开环的质粒DNA。

3 讨论

质粒的生产成本是限制动物核酸疫苗应用的主要瓶颈之一,不仅与质粒自身的结构及复制特点有关,还与大肠杆菌的培养基及培养条件有关<sup>[7]</sup>。为了降低重组质粒的生产成本,必须提高质粒产量和试剂的消耗量。在含葡萄糖的培养基和在无补料系统的摇床培养条件下,因细菌利用葡萄糖产生乙酸,导致细菌生长和质粒复制的抑制,而添加磷酸盐和镁盐可以达到稳定pH和质粒的目的,具体表现在细菌的生长密度和质粒的产量较高。在细菌生长的对数中期,将培养温度由37℃转换到42℃,能明显提高质粒的产量,其可能原因是在较高温度下,虽然宿主菌的蛋白合成及生长受到一定抑制,但质粒仍能继续复制,充分保证了质粒复制的比速率与宿主菌的比速率相当。另外在42℃下,质粒复制起始引物RNA II的空间结构发生改变,产生一定的RNA I抗性,因此能提高质粒的拷贝数<sup>[8]</sup>。

大肠杆菌质粒DNA的提取和检测在分子生物学中是常见的实验,常规的碱裂解法提取质粒DNA产物中常带有影响下游实验的大量蛋白质, RNA和盐等污染物,提取的程序比较复杂,所使用的试剂对人体有害,并且得率相对较低,实验结果也很不稳定<sup>[9-11]</sup>。本实验的创新点在于结合了常规碱裂解法和简单纯化质粒的优点,在工程菌生长至对数期中期时通过温度诱导抑制细菌蛋白质的合成,但不影响松弛型质粒DNA的复制,为质粒DNA的提取过程中蛋白质的去除提供了方便,还可以达到提高质粒DNA产量的目的,由于细菌长期受到抑制使裂解液中的黏稠度显著降低,通过变温比处理黏稠的裂解液更方便。碱裂解法提取质粒过程中,为了减少质粒DNA的降解,选用异丙醇代替无水乙醇作为质粒DNA的沉淀剂,有利于细菌质粒的沉淀,并缩短了实验时间<sup>[5]</sup>。同时利用LiCl剂,可降低RNA的溶解度,并剥离染色体上的蛋白质,因此,质粒粗提物中的高分子质量RNA

和蛋白质可在高浓度 LiCl 和 NH<sub>4</sub>AC 溶液中形成沉淀,从而可通过离心加以分离<sup>[4]</sup>。用 LiCl 溶液处理 DNA 溶液,可以沉淀大量的 RNA,减少或不用 RNA 酶的消化时间,并简化操作流程,使提取时间缩短,并且在操作过程中缩小试剂使用体积。通过 PEG8000 沉淀 DNA 从而去除 RNase 酶解过后的小分子 RNA,使用酚、氯仿等对人体有害的试剂也最小量化,使试验本身对操作者的危害得以降低,从而建立了一套完整、便捷、质粒 DNA 得率和纯度高、且相对比较安全的大肠菌质粒 DNA 的提取方法<sup>[4,5]</sup>。

通过对不同层析原理分离质粒 DNA 的比较,组合优化纯化步骤,层析次序为凝胶层析、亲和层析、离子交换层析<sup>[6,7]</sup>。优化的质粒 DNA 纯化工艺重复性好,回收率高,适合于大规模生产。可以根据与其相应检测方法检测终产品的纯度、分子量、残余蛋白量、残余基因组 DNA 量、内毒素含量等各项指标符合质粒 DNA 药用标准在后续的检测方面做更多更详细的工作<sup>[12]</sup>。

## 参考文献

- [1] Ausubel F M. Short protocols in molecular biology [M]. Beijing: Science Press, 1999 : 17-19
- [2] Kowalczyk D W, Ertl H C J. Immune responses to DNAvaccines[J]. Cell and Molecular Life Sciences, 1999, 55 (5) :751-770
- [3] Zhijun Wang, Guowei Le, Yonghui Shi, et al. Studies on recovery plasmid DNA from *E.coli* by heat treatment[J]. Process Biochemistry, 2002, 38: 199-206
- [4] HEM , WILDEA , KADERBHAIMA. A simple single step procedure for small scale preparation of Escherichia coli plasmids [J]. Nucleic Acids Research , 1990 , 18 : 1660
- [5] Sambrook J , Russell DW. Molecular Cloning:A LaboratoryM annual(3rd)[M].USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [6] Ferreira GM,Monterio GA ,Prazeres DM, et al. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications[J].Trends Biotechnol,2000,18(9):380-388
- [7] Murphy JC, Fox GE , Willson RC.Enhancement of anion-exchange chromatography of DNA using compaction agents[J].J Chromatography A ,2003 ,984 (2) :215-221
- [8] Lahijani R, Hulley G, Soriano G, et al. High-yield production of pBR322 derived plasmids intended for human gene therapy by employing a temperature controllable point mutation[J]. Hum Gene Ther, 1996, 7 (16) : 1971-1980
- [9] Flores S ,De Anda Herrera R , Gosset G, et al.Growth-rate recovery of E.coli culture carrying a multicopy plasmid ,by engineering of the pentose-phosphate pathway[J].Biotechnol Bioeng , 2004 , 87(4) :485-494
- [10] Afeyan N B, Regnier F E, Dean R C. US patent: B01D015P08, 5 ,019 ,270. 1991205228
- [11] Weaver Jr L E, Carta G. Biotechnol Progr, 1996, 12 (3) : 342- 355
- [12] Horn N, Marquet M, Meek J. Special issues for DNA vaccines.In: Sofer G, Zabriskie DW, editors. Biopharmaceutical processvalidation. New York: Marcel Dekker,2000. 329-345
- [5] ANKIA M. WAGNER and EUGENE T. CLOETE.16S rRNA Sequence Analysis of Bacteria Present in Foaming Activated Sludge [J]. System. Appl. Microbiol. 2002, 25, 434-439
- [6] Chun J,Goodfellow M.Int J Syst Bacteriol,1995,45,240-245
- [7] 郭崇志.Clustal W-蛋白质与核酸序列分析软件[J].生物技术通报,2000,11(2):146-150
- [8] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F etal. The Clustal X windows interface:flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucl Acid Res. 1997, 25(23): 4876-4882
- [9] Castresana J, Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylgenetic Analysis [J]. Molecular Biology and Evolution, 2000, 17(6): 540- 542
- [10] Felsenstein J, PHYLIP: Phylogeny Inference Package (Version 3.2) [J]. Cladistics, 1989, 5(3): 164-166
- [11] Felsenstein J, PHYLIP: Phylogeny inference Package and Manual,3.5c [D]. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA, 1993.
- [12] Vandeppeer Y, De Wachter R, TREECON for windows:a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft windows environment[J]. Comput. Applic. Biosci. 1994, 10(8): 569-570
- [13] 宋铁英,包晓东,宋亚娜,等.生防菌 BC2000、BC2001 的 16S rRNA PCR-RFLP 图谱分析[J].福建农业学报.2003,18(4): 264-267

(上接第 427 页)