

三甲基月桂基硫酸钠 (TLS) 在 蓝细菌核酸提取中的作用*

吴晓强 邱泽生 祁岩 印莉萍 向丽云

(北京师范大学生物系, 北京 100037)

仇媛媛 施定基

(中国科学院植物研究所, 北京 100044)

提 要

本文首次把三甲基月桂基硫酸钠 (TLS) 应用于蓝细菌(蓝藻)总核酸的提取。在用溶菌酶破坏满江红鱼腥藻的细胞壁后,再用 TLS 分别取代常用法^[1]中的各种试剂,即: Triton X-100, Sarkosyl, 蛋白酶 K, 总核酸产率分别是常用法的 98.9%, 47.3%, 103.8%。用 TLS 取代蛋白酶 K 处理不同生长期的满江红鱼腥藻,总核酸产率随生长期延长而降低。TLS 取代蛋白酶 K 提取的 DNA 和常用法提取的 DNA, 都能被限制性内切酶 EcoR I 水解。用光学显微镜观察到,满江红鱼腥藻经 TLS 处理后,丝状体断裂,细胞破裂成碎片。在扫描电子显微镜下,未经 TLS 处理的细胞表面光滑平整,而经 TLS 处理的细胞表面有鳞片状突起、皱褶、凹陷,甚至穿孔。

关键词 TLS, DNA, 满江红鱼腥藻

三甲基月桂基硫酸钠(简称 TLS)是一种蛋白质增溶剂,能有效地裂解动物和微生物的细胞。有报道指出,用 TLS 裂解血细胞,提取的核酸产率高、纯度高^[2]。本研究试图把 TLS 应用于蓝细菌,比较 TLS 分别取代常用法中的 Triton X-100, Sarkosyl, 蛋白酶 K 对核酸产率和纯度的影响。比较常用法、TLS 取代蛋白酶 K 和常用法加 TLS** 处理不同生长期的满江红鱼腥藻对核酸产率的影响。用光学显微镜和扫描电子显微镜 (SEM) 观察比较满江红鱼腥藻受 TLS 处理前后的变化。为检验提取的核酸纯度,作了限制性核酸内切酶 EcoR I 水解和电泳分析。

材 料 和 方 法

1. 蓝细菌的培养和收集 满江红鱼腥藻 (*Anabaena azollae* 或 *Anabaena* sp. stra-

* 本研究得到汤佩松、陶隆飞、赵微平等教授的关心和指导,特致谢意。北京农业大学生物学院沈代伟,北京师范大学生物系倪东海,中国科学院植物研究所宋晖参加了部分工作。

本研究由中国科学院院长特别基金资助。

1989年10月20日收到。

** 菌体先按常用法处理后,再把离心沉淀的菌体用 TLS 处理。

in 2B) 由美国 Newton 博士惠赠。把这种蓝细菌培养在 BG-11 无氮培养液中^[11], 置于 Gallenamp 照光冷却旋转保温箱中, 光强 3 000lx, 温度 28℃, 振荡频率 130—140 次/min。培养物分别在对数生长期前期(3d), 中期(7d)和后期(13d)用 1.5ml 指形管收集, 10 000r/min, 5min, 离心沉淀。沉淀的菌糊用 TE 缓冲液 (50mM Tris-HCl/1mm EDTA, pH8.0) 洗一次, 新鲜菌糊直接用于提取核酸, 或 -20℃ 保存备用。

2. TLS 和酶对蓝细菌的处理 TLS 处理参照罗格等的方法^[4], 0.1 g 蓝细菌菌糊加入 100 μ l 1% TLS, 在 50℃ 保温 1h。溶菌酶和蛋白酶 K 处理按常用方法进行^[8]。

3. 总核酸的提取 把离心沉淀的蓝细菌菌糊按 Maniatis 等所述方法处理^[8], 提取的核酸用 Shimadzu UV-265 型分光光度计测定光密度, 按公式计算总核酸产率^[12]。

4. 限制性核酸内切酶 EcoR I 水解及其电泳分析 将提取的总核酸用 RNase 纯化后^[7], 再用限制性内切酶 EcoR I 处理, 水解产物按 Maniatis 等所述方法作凝胶电泳分析^[8]。

5. 光学显微镜观察 蓝细菌用溶菌酶处理, 再用常用法或 TLS 取代蛋白酶 K 处理前后, 取样置于 Olympus BH 型光学显微镜下观察, 并用 Olympus PM-6 型相机照相。

6. 扫描电子显微镜观察 用 TLS 和各种酶处理后的蓝细菌按施定基等所述方法处理^[10], 置于 Hitachi H-600 和 KAKA 两种电子显微镜下观察。

7. 试剂来源 TLS 和限制性核酸内切酶 EcoR I 来自中国医科院协和医科大学。溶菌酶是西德 Merck 公司产品。蛋白酶 K 为西德 Boehringer 公司产品。Sarkosyl 来自美国 Sigma 公司。Triton X-100 是上海化学试剂厂产品。RNase 为华美生物工程公司洛阳化学试剂厂产品。

结果和讨论

1. TLS 分别取代 Triton X-100, Sarkosyl, 蛋白酶 K 处理满江红鱼腥藻

表 1 列出了满江红鱼腥藻用溶菌酶处理后, 再用 TLS 分别取代 Triton X-100, Sarkosyl, 蛋白酶 K 处理, 对总核酸产率 (RNA + DNA) 和核酸纯度的影响。

表 1 表明, TLS 取代常用法中的 Triton X-100 或蛋白酶 K 后, 其总核酸产率和核酸纯度与常用法接近, 而 TLS 取代 Sarkosyl 总核酸产率只有常用法的 47.3%, 核酸纯度也降低较多。

TLS 可以取代 Triton X-100, 可能因为它们在破坏细胞膜使内容物外逸方面的作用相似。已经知道 Triton X-100 和 TLS 都是去垢剂, 也叫表面活性剂。Triton X-100 是非离子型的^[13], 它对蛋白质有乳化, 分散和增溶的作用, 可以使细胞膜蛋白溶解, 原生质逸出, 从而达到提取核酸的目的。TLS 是阴离子型的, 它的作用可能类似于十二烷基硫酸钠 (SDS), 即可促进核蛋白体解体释放核酸, 并对核酸酶、对核酸的降解有一定的抑制作用^[12]。TLS 还可以取代蛋白酶 K, 蛋白酶 K 是一种蛋白质水解酶, 它可以水解细胞膜蛋白和核蛋白, 暴露出核酸, 特别是它在阴离子去垢剂 SDS (或类似的去垢剂, 如 TLS) 和核酸酶抑制剂乙二胺四乙酸 (EDTA, 可螯合核酸酶的激活剂 Mg^{++} 、 Ca^{++} 等二价金

表 1 TLS 分别取代 Triton X-100, Sarkosyl, 蛋白酶 K 对总核酸产率和核酸纯度的影响

Tab. 1 Effects on the productivity of total nucleic acids and their purity with TLS replacing Triton X-100, Sarkosyl, proteinase K, in standard method respectively.

处 理 Treatment	总核酸产率 (mg 核酸/g 鲜菌糊) Productivity of total nucleic acids (mg NA/g fresh wt. of cells)	核酸纯度 A260/280
常用法 ^[8] Standard method	0.370±0.062(100) ^①	1.65±0.146
TLS 取代 Triton X-100 TLS replacing Triton X-100	0.366±0.111(98.9)	1.69±0.130
TLS 取代 Sarkosyl TLS replacing Sarkosyl	0.175±0.125(47.30)	1.34±0.236
TLS 取代蛋白酶 K TLS replacing proteinase K	0.384±0.127(103.78)	1.67±0.140

① 括号内的数字是与常用法产率比较的百分比。

满江红鱼腥藻是培养 3d 后收集的。

The values in the brackets were expressed as percentages of the productivity of standard method.

Anabaena azollae was the 3-day old culture.

属离子, 使酶钝化)存在的条件下, 仍表现出很高的活力^[7], 保证了提取的核酸产率高、纯度高、分子量大。所以, 蛋白酶 K 是通过降解蛋白质, 而 TLS 使蛋白质变性, 它们都能破碎细胞而有利于提取核酸。从表 1 还看出 TLS 取代 Sarkosyl 的效果不好, 因为 Sarkosyl 是两性表面活性剂^[11], 它在水溶液中亲水基团带阴阳两种电荷, 而细胞膜磷脂双分子层中的磷酸电离, 使整个细胞膜表面带阴电。当 Sarkosyl 与细胞膜接触时, 其亲水基阳离子由于静电吸引与磷酸结合, 而其疏水基钻入膜内的脂质疏水部分, 以致使细胞膜渗透性发生改变, 内容物外逸, 然后 Sarkosyl 可随意进入细胞, 引起核蛋白变性释放核酸^[12]。而 TLS 是阴离子型去垢剂, 在水溶液中电离出阴离子而与带负电的细胞膜排斥, 所以对细胞膜的破坏作用比 Sarkosyl 差, 总核酸产率也低。

2. TLS 处理不同生长期的满江红鱼腥藻

表 2 列出了 TLS 对不同生长期的满江红鱼腥藻的作用结果。

虽然 TLS 对蓝细菌细胞有较强的裂解作用, 但这种作用可随蓝细菌的生长期长短而不同。表 2 的数据表明, 蓝细菌生长期越长, 用 TLS 处理提高总核酸产率的效果越明显。培养 3d 后收集的蓝细菌经常用法提取后, 再用 TLS 处理, 可提高总核酸产率 75%; TLS 可提高培养 8d 的蓝细菌的总核酸产率 164.2%; 而对培养 12d 的菌体, TLS 可提高总核酸产率 470.6%。这种差别反映了不同生长期的蓝细菌的细胞壁结构有变化。用 H₂O 代替 TLS, 增加量少。

用常用法 TLS 取代蛋白酶 K 处理不同生长期的满江红鱼腥藻, 其总核酸产率的变化见表 3。

从表 3 可看出, 用常用法处理对数生长期前期(3d), 中期(7d), 后期(13d)的满江红鱼腥藻, 其总核酸产率变化不大, 但有波动现象, 这可能与不同生长期、培养条件引起核酸代谢变化有关。用 TLS 取代蛋白酶 K 处理不同生长期的满江红鱼腥藻, 总核酸产率随

表 2 三甲基月桂基硫酸钠 (TLS) 处理不同生长期的满江红鱼腥藻对总核酸产率的影响

Tab. 2 Influence of growth phase on the productivity of total nucleic acids extracted from *Anabaena azollae* by TLS.

生 长 期 Growth phase	总核酸产率 (mg 核酸/g 鲜菌糊) Productivity of total nucleic acids (mgNA/g fresh wt. of cells)		
	常用法处理 Standard method	TLS 处理* TLS method	总和 Total
培养 3 天后收集 3-day old culture	1.44(57.14%)	1.08(42.8%)	2.52(100%)
培养 8 天后收集 8-day old culture	0.274(37.85%)	0.45(62.15%)	0.724(100%)
培养 12 天后收集 12-day old culture	0.357(17.50%)	1.68(82.5%)	2.04(100%)

* 菌体先按常用法处理后,再把离心沉淀物用 TLS 处理。

* The cyanobacterial cells were treated with standard method first, then centrifugated, and finally the pellets were treated with TLS.

表 3 常用法、TLS 取代蛋白酶 K 处理不同生长期满江红鱼腥藻对总核酸产率的影响

Tab. 3 Influence of growth phase on the productivity of total nucleic acids extracted by standard method or by TLS replacing proteinase K.

生 长 期 Growth phase	总核酸产率 (mg 核酸/g 鲜菌糊) Productivity of total nucleic acids (mg NA/g fresh wt. of cells)	
	常 用 法 Standard method	TLS 取代蛋白酶 K TLS replacing proteinase K
培养 3 天后收集 3-day old culture	0.448±0.034	0.430±0.040
培养 7 天后收集 7-day old culture	0.450±0.055	0.276±0.139
培养 13 天后收集 13-day old culture	0.450±0.172	0.287±0.136

生长期延长而降低,这可能与不同生长期的细胞壁结构有关。对数生长期前期细胞壁的肽聚糖层不完善,有利于溶菌酶的降解作用,随生长期延长细胞壁逐渐完善,而且在细胞生长过程中细胞壁能保持完整性和稳定性^[6],所以细胞壁对溶菌酶的敏感程度降低,总核酸产率也降低。

3. 限制性核酸内切酶水解及电泳分析

为了检验常用法、TLS 取代蛋白酶 K 处理后提取的核酸纯度,选取了限制性核酸内切酶 EcoR I 来切割从满江红鱼腥藻提取的 DNA^[12]。四种处理的 DNA 都停留在点样槽附近(图版 I:1),未经 EcoR I 处理的电泳图, DNA 也都停留在点样槽附近(图版 I:1, 2),但常用法提取的 DNA 混有较多的 RNA。用常用法(n和m道)、TLS 取代蛋白酶 K(l和k道)提取的核酸经 RNase 纯化后,用限制性内切酶 EcoR I 处理的电泳图(图版 I:3)。可见,经 EcoR I 处理后,两种方法提取的 DNA 都被降解为大小不等的片段。这与 Plasinski 等的结果^[9]一致。

4. 光学显微镜的观察

满江红鱼腥藻用溶菌酶处理、再用常用法或 TLS 取代蛋白酶 K 处理前后的裂解情况表明, 未经任何处理的满江红鱼腥藻是细胞连成串的丝状体。用溶菌酶处理后, 长丝状体断裂成含 5 至 8 个细胞的短链, 部分细胞的细胞壁溶解, 形成原生质球, 也有极少数原生质球破裂成碎片(图版 I:4)。再用常用法(图版 I:5)、TLS 取代蛋白酶 K(图版 I:6)处理, 大部分细胞碎裂成碎片, 只有少部分原生质球残存。

5. 扫描电子显微镜观察

为了进一步了解 TLS 作用于蓝细菌的机理, 用扫描电镜观察了满江红鱼腥藻细胞表面的变化。图版 I:7 和 8 是未经 TLS 处理的满江红鱼腥藻细胞, 可以看到其表面平整光滑。但是经 TLS 处理后, 细胞表面产生了鳞片状突起, 皱褶、凹陷、甚至穿孔(图版 I:9, 10)。用其他酶处理蓝细菌后, 也可以观察到细胞表面产生皱褶和凹陷(未发表), 但受损程度不如 TLS 处理的严重。

至今, 我们尚未见到关于 TLS 处理满江红鱼腥藻及其它蓝细菌的文献; 而关于它作用于其它生物材料的研究, 在国内外也刚开始不久。根据上述所得结果, 提取满江红鱼腥藻核酸时, 可用 TLS 取代常用法中的 Triton X-100, 蛋白酶 K, 但不能取代 Sarkosyl。不同生长期的满江红鱼腥藻用常用法处理后, 再用 TLS 处理, 又能提取出较多核酸, 表明 TLS 对不同生长期的蓝细菌都是有效的。光学显微镜和扫描电镜的观察表明, TLS 引起蓝细菌丝状体断裂, 细胞破裂成碎片, 细胞壁发生鳞片状突起、皱褶、凹陷, 甚至穿孔, 这可能因为 TLS 不仅损伤了蓝细菌细胞壁的外层, 也穿透了其内层, 从而有利于细胞内含物外流, 最终明显提高总核酸产率。

用 TLS 取代蛋白酶 K 处理满江红鱼腥藻, 不仅提取的总核酸产率高, 而且核酸纯度也高。凝胶电泳图谱表明, TLS 取代蛋白酶 K 提取的核酸能被限制性核酸内切酶 EcoR I 水解, 说明 TLS 能有效地去除与核酸结合的蛋白质。

总之, TLS 处理满江红鱼腥藻的结果表明, TLS 不仅对细胞壁有效, 而且对细胞膜、细胞内成分也有效, 从而提高了核酸的产率和纯度。

参 考 文 献

- [1] 上海植物生理学会, 1985. 植物生理学实验手册, 上海科学技术出版社, 45—46。
- [2] 余 贇, 1983. 医学微生物学, 人民卫生出版社, 99 页。
- [3] 苏拨贤, 1986. 生物化学制备技术, 科学出版社, 127 页。
- [4] 沈 岩等, 1989. 利用 TLS 提取染色体 DNA, 生物化学与生物物理进展, 16: 221—223。
- [5] 高仲江等译(藤本武彦著), 1989. 新表面活性剂入门, 化学工业出版社, 29—48。
- [6] 程皆能, 1987. 微生物生理学, 复旦大学出版社, 20—21 页, 197 页。
- [7] 蔡良琬, 1987. 核酸研究技术(上册), 科学出版社, 3—4 页, 95—97 页。
- [8] Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., 1982. Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
- [9] Plazinski, J., Franche, C., Liu, C.-C., Lin, T., Shaw, W., Gunning, B. E. S. and Rolfe, B. G., 1988. Taxonomic status of *Anabaena azollae*: an overview, *Plant and Soil* 108: 185—190.
- [10] Shi, D.-J., Brouers, M., Hall, D. O. and Robins, R. J., 1987. The effects of immobilization on the biochemical, physiological and morphological features of *Anabaena azollae*, *Planta* 172: 298—308.

- [11] Stanier, R. Y. and Cohen-Bazire, G., 1977. Phototrophic prokaryotes: the Cyanobacteria. *Ann Rev. Microbiol.* 31: 225—274.
- [12] Davis, R., Roth, J. and Botstein, D., 1980. A Manual for Genetic Engineering. Advanced Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

THE APPLICATION AND FUNCTION OF TRIMETHYLAURYL-SODIUM SULFATE IN THE EXTRACTION OF NUCLEIC ACIDS FROM *ANABAENA AZOLLAE*

Wu Xiaoqiang Qiu Zesheng Qi Yan Yin Liping Xiang Liyun

(Department of Biology, Beijing Teacher's College, Beijing 100037)

Qiu Yuanyuan and Shi Dinji

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044)

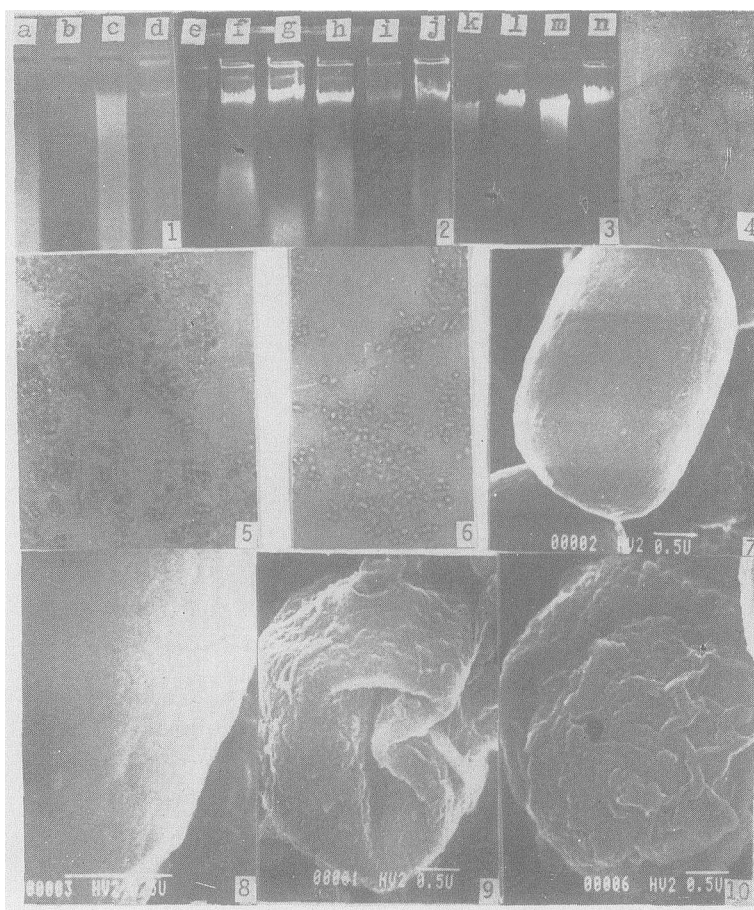
Abstract

In this work trimethylaurylsodium sulfate(TLS) was used as a novel reagent for extraction of total cellular nucleic acids from the cyanobacterium, *Anabaena azollae*. It is found that TLS can replace Triton X-100 and proteinase K, but can not take the place of Sarkosyl in standard method. Compared with the standard method, the productivity of total nucleic acids from the cells was 98.9%, 103.8% and 47.3% respectively. When TLS replaced Triton X-100, proteinase K or Sarkosyl. The effect of TLS varied with the growth phase of the cyanobacterium.

The test of restriction endonuclease digestion by EcoR I indicated that DNA extracted and purified by the method of TLS replacing proteinase K was sensitive to cleavage.

After treated with lysozyme, the filaments broke down into singular cells. Then after treated with TLS, the debris of broken cells were observed under an optical microscope. Also scale-like degradation and perforation were found on the wrinkled cell surface of *Anabaena azollae* from observations using SEM.

Key words TLS, DNA, *Anabaena azollae*



1.常用法(d道), TLS 分别取代 Triton X-100(c道), Sarkosyl(b道), 蛋白酶 K(a道) 提取的核酸; 2.常用法(j, h和f道)、TLS 取代蛋白酶 K(i, g和e道) 提取的核酸。i和j是培养3d材料, h和g:7d, f和e:13d; 3.常用法(n和m道), TLS 取代蛋白酶 K(l和k道) 提取的核酸, 经 RNase 纯化后, EcoR I 水解(k和m)的凝胶电泳图谱; 4.光学显微镜下, 经溶菌酶处理的前期满江红鱼腥藻($\times 400$); 5.溶菌酶处理后, 常用法处理的前期满江红鱼腥藻($\times 400$); 6.溶菌酶处理后, 再用 TLS 取代蛋白酶 K 处理的前期满江红鱼腥藻($\times 400$); 7, 8.未处理的蓝细菌细胞, 其表面光滑; 9, 10. TLS 处理后的蓝细菌细胞, 其表面出现了皱褶和凹陷(9)以及鳞片状突起和穿孔(10)

1. Agrose gel electrophoresis of DNA extracted by TLS replacing proteinase K(a), Sarkosyl(b), and Triton X-100(c) respectively, or by standard method(d); 2. DNA extracted by TLS replacing proteinase K(e, g, i) and by standard method(f, h, j). DNA in lane i and j is extracted from 3-day old culture of cyanobacteria, in g and h is 7d, and in e and f is 13d; 3. DNA extracted by TLS replacing proteinase K(k and l) and by standard method(m and n) were digested by EcoR I(k and m); 4. Cyanobacterial cells treated with lysozyme for 1 hour, $\times 400$; 5. with standard methods, $\times 400$; 6. with TLS replacing proteinase K in standard method, $\times 400$; 7, 8. Untreated cyanobacterial cell with smooth surface; 9, 10. Cyanobacterial cell treated by TLS with wrinkled surface in which scale-like degradation and even perforation are found