

## 质粒抽提

质粒存在于许多细菌以及酵母菌等生物中，是细胞染色体外能够自主复制的很小的环状 DNA 分子。从细菌中分离质粒 DNA 的方法包括 3 个基本步骤：培养细菌使质粒扩增；收集和裂解细菌；分离和纯化质粒 DNA。采用强碱液、加热或溶菌酶（主要针对革兰氏阳性细菌）可以破坏菌体细胞壁，十二烷基磺酸钠（SDS）和 TritonX-100（一般很少使用）可使细胞膜裂解。经溶菌酶和 SDS 或 Triton X-100 处理后，细菌染色体 DNA 会缠绕附着在细胞碎片上，同时由于细菌染色体 DNA 比质粒大得多，易受机械力和核酸酶等的作用而被切断成不同大小的线性片段。当用强热或酸、碱处理时，细菌的线性染色体 DNA 变性，而共价闭合环状 DNA (Covalently closed circular DNA，简称 cccDNA) 的两条链不会相互分开。当外界条件恢复正常时，线状染色体 DNA 片段难以复性，而是与变性的蛋白质和细胞碎片缠绕在一起，而质粒 DNA 双链又恢复原状，重新形成天然的超螺旋分子，并以溶解状态存在于液相中。

质粒抽提最常用的方法是碱裂解法，它具有得率高、适用面广、快速和纯度高等特点。当然，碱裂解法也有缺陷：容易导致不可逆的变性。要降低不可逆的变性，就要控制好碱裂解的时间。碱裂解法抽提质粒需要用到以下三种溶液：

### 溶液 I

50 mmol/L 葡萄糖，25 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0)，10 mmol/L EDTA (pH 8.0)，在 15 psi 压力下蒸汽灭菌 15 min，4°C 保存。

### 溶液 II

0.2 mmol/L NaOH (从 10 mmol/L 贮存液中现用现稀释)，10 g/L SDS (室温保存)。

### 溶液 III

5 mol/L 乙酸钾 60.0 mL，冰乙酸 11.5 mL，无菌水 28.5 mL，4°C 保存，使用时置于冰浴中。

### 碱裂解法小提质粒具体操作

(1) 柱平衡：向吸附柱中加入 500  $\mu$ l 平衡 Buffer，12000 rpm 离心 30-60 s，倒掉收集管中的废液；

注：吸附柱平衡后可最大限度激活硅基质膜，提高质粒的得率；吸附柱平衡后应立即使用，长时间放置会影响其吸附效果。

(2) 收菌：将过夜培养的菌液用 8000 g，2-3 min 低温离心，吸弃液体培养基；

注：高拷贝的质粒，需要 5-15 mL 的培养菌液；低拷贝的质粒，则需要 15-30 mL 的培养菌液；残留的液体培养基过多会影响细菌的裂解效果，应尽可能吸干培养基。

(3) 向离心管中加入 250  $\mu$ l 溶液 I (加入 RNase A)，吹匀菌沉淀并将悬液转移至新 1.5 mL EP 管中；

注：菌体悬浮不完全会导致裂解不完全，质粒提取量和纯度会降低。

（4）向 EP 管中加入 250  $\mu$ l 溶液II（裂解 Buffer），温和翻转 EP 管 6-10 次，使菌体充分裂解，液体变得澄清浓稠（开盖拉丝）；

注：所用时间不宜超过 5 min，以免质粒被破坏；切勿剧烈震荡；液体未变得澄清，则表明裂解不充分，可适当减少菌体量或增大 Buffer 使用量；若溶液II出现浑浊，可 37  $^{\circ}$ C 水浴几分钟，待液体恢复澄清即可使用。

（5）向 EP 管中加入 350  $\mu$ l 溶液III，温和翻转 EP 管 6-10 次，此时可观察到管内出现白色絮状沉淀，12000 rpm 室温离心 10 min；

注：若上清中仍有少量白色絮状物，可再次离心 2-3 min 直至液体澄清。

（6）将离心后上清转移至吸附柱中，12000 rpm 离心 30-60 s，倒掉收集管中的废液；

（7）可选：向吸附柱中加入 500  $\mu$ l Buffer PD（富含蛋白酶），12000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液；

注：此步对富含内源核酸酶的宿主菌（endA+）是必须的，对于 endA-宿主菌可省略。

（8）向吸附柱中加入 600  $\mu$ l Wash Buffer（加入无水乙醇），12000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液；

（9）重复步骤 8 一次；

（10）将吸附柱和收集管放回离心机中，12000 rpm 空转离心 2 min；

注：此步骤非常关键，乙醇是否去除干净会影响后续的洗脱效率以及 PCR 等效果。

（11）将吸附柱转移至新的 1.5 mL EP 管中，拿到超净工作台中开盖鼓风吹 5-10 min；

（12）向吸附柱膜的中央滴加 40-50  $\mu$ l 预热 Elution Buffer 或者 DD 水，关盖静置 3-5 min，12000 rpm 离心 2 min；

注：洗脱 Buffer 预热后效果更好；可以根据质粒的拷贝数、宿主菌等因素调整洗脱 Buffer 的添加量。

（13）离心后将 EP 管内的液体重新滴加至吸附柱膜上，12000 rpm 离心 1 min；

（14）做好标记，取 2  $\mu$ l 质粒跑 1%琼脂糖凝胶电泳检测验证；

（15）提取出的质粒-20 $^{\circ}$ C保存。

### 抽提质粒的常见问题

#### 1. 提不出质粒或者质粒提取量很少

(1) 菌体中无质粒：有些质粒本身不能在某些菌种中稳定存在，经多次转接后有可能造成质粒丢失。例如柯斯质粒在大肠杆菌中保存不稳定，因此不要频繁转接，每次接种时应接种单菌落。另外，检查筛选用抗生素使用浓度是否正确。

- (2) 质粒拷贝数低：由于使用低拷贝数载体引起的质粒 DNA 提取量低，可更换具有相同功能的高拷贝数载体。
- (3) 菌种老化：若是甘油保藏菌，需要在活化后再培养摇菌；建议涂布平板培养后，重新挑选新菌落进行液体培养。
- (4) 吸附柱过载：不同产品中吸附柱吸附能力不同，如果需要提取的质粒量很大，请分多次提取。若用富集培养基，例如 TB 或者 2×YT，菌液体积必须减少；若质粒或宿主菌是非常高的拷贝数或生长率，则需调整 LB 培养液体积。
- (5) 碱裂解不充分：使用过多的菌体培养液，会导致菌体裂解不充分，可减少菌体用量或增加溶液 I、II、III 的用量。对低拷贝数质粒提取时，可加倍使用溶液 I、II、III，有助于增加质粒提取量和质粒质量。
- (6) 溶液使用不当：溶液 II 和 III 在温度较低时可能出现浑浊，应置于 37 °C 保温片刻直至溶解为清亮的溶液，才能使用。
- (7) 洗脱液加入位置不正确：洗脱液应加在硅胶膜中心部位，以确保洗脱液会完全覆盖硅胶膜的表面，达到最大洗脱效率。
- (8) 洗脱液不合适：DNA 只在低盐溶液中才能被洗脱，pH 洗脱效率取决于 pH 值。最大洗脱效率在 pH 7.0-8.5 之间。当用水洗脱时确保其 pH 值在此范围内，如果 pH 过低可能导致洗脱量低。洗脱缓冲液加热至 60 °C 后使用有利于提高洗脱效率。
- (9) 洗脱体积太小：洗脱体积对回收率有一定影响。随着洗脱体积的增大回收率增高，但产品浓度降低。为了得到较高的回收率可以增大洗脱体积。
- (10) 洗脱时间过短：洗脱时间对回收率也会有一定的影响。洗脱时放置 1 min 可达到较好的效果。

(11) 乙醇残留：漂洗液洗涤后应离心尽量去除残留液体，树脂型试剂盒漂洗后应晾干树脂，再加入洗脱缓冲液。

(12) 质粒未全部溶解：洗脱溶解质粒时，可适当加温或延长溶解时间。

## 2、质粒纯度不高

(1) 混有蛋白质：不要过多使用菌体。溶液 I、II、III 处理并离心后，溶液应为澄清的，如果还混有微小蛋白质悬浮物，可再次离心去除后再进行下一步骤。

(2) 混有 RNA：RNaseA 处理不彻底，请减少菌体用量或加入溶液 III 后室温放置一段时间。如果溶液 I 已保存 6 个月以上，要及时向 I 中添加 RNase A。

(3) 混有基因组 DNA：加入溶液 II、III 后应温和混匀，若剧烈震荡，可能把基因组 DNA 剪切成碎片混在质粒中。如果加入溶液 II 后过于黏稠，无法温和混匀，请减少菌体用量。细菌培养不要超过 16 h，时间过长会导致细胞和 DNA 的降解。

(4) 溶液 III 加入时间过长：溶液 III 加入后，放置时间不要过长，否则有可能产生小片段 DNA 污染。

(5) 宿主菌含大量核酸酶：宿主菌含大量核酸酶，在质粒提取中降解质粒 DNA，影响提取质粒 DNA 的完整性，最好选用不含核酸酶的大肠杆菌宿主菌，例如 DH5 $\alpha$  和 TOP10。

(6) 裂解时间过长：加入溶液 II 后裂解时间不宜超过 5 min。

(7) 质粒的二聚体和多聚体形式：是质粒复制过程中形成的，与宿主菌相关，电泳可检测出。

## 3、质粒浓度的检测

DNA 纯度的判断大多根据 OD260/OD280 的比值检测，符合要求、纯度高的 DNA 样品其 OD260/OD280 在 1.8-2.0 之间，低于此范围表明蛋白质含量超标，高于此范围表明样品中含有 RNA。

DNA 的纯度也可以根据 OD260/OD230 的比值判断，OD230 主要评估样品中是否存在一些有机污染物，如碳水化合物，多肽，苯酚等。纯度较高的 DNA 样品 OD260/OD230 的比值在 2.0-2.5 之间，比值小于 2.0 则表示存在有机物污染，比如乙醇或者酚类残留。如果遇到此种情况，可以再沉淀一次，然后重复乙醇洗涤的过程。

AtaGenix

The end



### • 一站式蛋白抗体发现服务

重组蛋白 · 抗体 · 噬菌体文库 · 诊断原料

—— 武汉国家生物产业基地 · 光谷抗体发现与筛选公共服务平台 ——

科学探索的世界充满挑战，AtaGenix致敬每一位拓荒者，  
更致力于成为始终值得您信赖的科研合作伙伴！