

质粒 DNA 的分离、纯化和鉴定

第一节 概述

把一个有用的目的 DNA 片段通过重组 DNA 技术,送进受体细胞中去进行繁殖和表达的工具叫载体(Vector)。细菌质粒是重组 DNA 技术中常用的载体。质粒(Plasmid)是一种染色体外的稳定遗传因子,大小从 1-200kb 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。质粒主要发现于细菌、放线菌和真菌细胞中,它具有自主复制和转录能力,能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。质粒的复制和转录要依赖于宿主细胞编码的某些酶和蛋白质,如离开宿主细胞则不能存活,而宿主即使没有它们也可以正常存活。质粒的存在使宿主具有一些额外的特性,如对抗生素的抗性等。F 质粒(又称 F 因子或性质粒)、R 质粒(抗药性因子)和 Col 质粒(产大肠杆菌素因子)等都是常见的天然质粒。

质粒在细胞内的复制一般有两种类型:紧密控制型(Stringent control)和松弛控制型(Relaxed control)。前者只在细胞周期的一定阶段进行复制,当染色体不复制时,它也不能复制,通常每个细胞内只含有 1 个或多个质粒分子,如 F 因子。后者的质粒在整个细胞周期中随时可以复制,在每个细胞中有许多拷贝,一般在 20 个以上,如 Col E1 质粒。在使用蛋白质合成抑制剂-氯霉素时,细胞内蛋白质合成、染色体 DNA 复制和细胞分裂均受到抑制,紧密型质粒复制停止,而松弛型质粒继续复制,质粒拷贝数可由原来 20 多个扩增至 1000-3000 个,此时质粒 DNA 占总 DNA 的含量可由原来的 2%增加至 40-50%。

利用同一复制系统的不同质粒不能在同一宿主细胞中共同存在,当两种质粒同时导入同一细胞时,它们在复制及随后分配到子细胞的过程中彼此竞争,在一些细胞中,一种质粒占优势,而在另一些细胞中另一种质粒却占上风。当细胞生长几代后,占少数的质粒将会丢失,因而在细胞后代中只有两种质粒的一种,这种现象称质粒的不相容性(Incompatibility)。但利用不同复制系统的质粒则可以稳定地共存于同一宿主细胞中。

质粒通常含有编码某些酶的基因,其表型包括对抗生素的抗性,产生某些抗生素,降解复杂有机物,产生大肠杆菌素和肠毒素及某些限制性内切酶与修饰酶等。

质粒载体是在天然质粒的基础上为适应实验室操作而进行人工构建的。与天然质粒相比,质粒载体通常带有一个或一个以上的选择性标记基因(如抗生素抗性基因)和一个人工合成的含有多个限制性内切酶识别位点的多克隆位点序列,并去掉了大部分非必需序列,使分子量

免责声明: 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。

尽可能减少,以便于基因工程操作。大多质粒载体带有一些多用途的辅助序列,这些用途包括通过组织化学方法肉眼鉴定重组克隆、产生用于序列测定的单链 DNA、体外转录外源 DNA 序列、鉴定片段的插入方向、外源基因的大量表达等。一个理想的克隆载体大致应有下列一些特性:(1)分子量小、多拷贝、松弛控制型;(2)具有多种常用的限制性内切酶的单切点;(3)能插入较大的外源 DNA 片段;(4)具有容易操作的检测表型。常用的质粒载体大小一般在 1kb 至 10kb 之间,如 PBR322、PUC 系列、PGEM 系列和 pBluescript 简称 pBS)等。

从细菌中分离质粒 DNA 的方法都包括 3 个基本步骤:培养细菌使质粒扩增;收集和裂解细胞;分离和纯化质粒 DNA。采用溶菌酶可以破坏菌体细胞壁,十二烷基磺酸钠(SDS)和 Triton X-100 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 circularDNA, 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。

在细菌细胞内,共价闭环质粒以超螺旋形式存在。在提取质粒过程中,除了超螺旋 DNA 外,还会产生其它形式的质粒 DNA。如果质粒 DNA 两条链中有一条链发生一处或多处断裂,分子就能旋转而消除链的张力,形成松弛型的环状分子,称开环 DNA(Open circular DNA, 简称 ocDNA);如果质粒 DNA 的两条链在同一处断裂,则形成线状 DNA(Linear DNA)。当提取的质粒 DNA 电泳时,同一质粒 DNA 其超螺旋形式的泳动速度要比开环和线状分子的泳动速度快。

第二节 材料、设备及试剂

一、材料

含 pBS 的 E. coli DH5 α 或 JM 系列菌株, 1.5ml 塑料离心管(又称 eppendorf 管),离心管架。

二、设备

微量取液器(20 μ l,200 μ l,1000 μ l), 台式高速离心机,恒温振荡摇床, 高压蒸汽消毒器(灭菌锅), 涡旋振荡器, 电泳仪, 琼脂糖平板电泳装置和 恒温水浴锅等。

免责声明: 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。

三、试剂

1、LB 液体培养基(Luria-Bertani)：称取蛋白胨(Tryptone)10 g, 酵母提取物(Yeast extract) 5 g, NaCl 10 g, 溶于 800ml 去离子水中, 用 NaOH 调 pH 至 7.5, 加去离子水至总体积 1 升, 高压下蒸气灭菌 20 分钟。

2、LB 固体培养基：液体培养基中每升加 12g 琼脂粉, 高压灭菌。

3、氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)母液：配成 50mg/ml 水溶液, -20℃保存备用。

4、溶菌酶溶液：用 10mmol/L Tris-Cl(pH8.0)溶液配制成 10mg/ml, 并分装成小份(如 1.5ml)保存于-20℃, 每一小份一经使用后便予丢弃。

5、3mol/l NaAc (pH5.2)：50ml 水中溶解 40.81g NaAc·3H₂O, 用冰醋酸调 pH 至 5.2, 加水定容至 100ml, 分装后高压灭菌, 储存于 4℃冰箱。

6、溶液 I：50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris.Cl (pH8.0), 10mmol/L EDTA (pH8.0)。溶液 I 可成批配制, 每瓶 100ml, 高压灭菌 15 分钟, 储存于 4℃冰箱。

7、溶液 II：0.2 mol/L NaOH (临用前用 10mol/L NaOH 母液稀释), 1% SDS。

8、溶液 III：5 mol/L KAc 60ml, 冰醋酸 11.5ml, H₂O 28.5ml, 定容至 100ml, 并高压灭菌。溶液终浓度为: K⁺ 3mol/L, Ac⁻ 5mol/L。

9、RNA 酶 A 母液：将 RNA 酶 A 溶于 10mmol/L Tris-Cl(pH7.5), 15mmol/L NaCl 中, 配成 10mg/ml 的溶液, 于 100℃加热 15 分钟, 使混有的 DNA 酶失活。冷却后用 1.5ml eppendorf 管分装成小份保存于-20℃。

10、饱和酚：市售酚中含有醌等氧化物, 这些产物可引起磷酸二酯键的断裂及导致 RNA 和 DNA 的交联, 应在 160℃用冷凝管进行重蒸。重蒸酚加入 0.1%的 8-羟基喹啉(作为抗氧化剂), 并用等体积的 0.5mol/L Tris-Cl (pH8.0)和 0.1mol/L Tris-Cl(pH8.0)缓冲液反复抽提使之饱和并使其 pH 值达到 7.6 以上, 因为酸性条件下 DNA 会分配于有机相。

11、氯仿:按氯仿:异戊醇=24:1 体积比加入异戊醇。氯仿可使蛋白变性并有助于液相与有机相的分开, 异戊醇则可起消除抽提过程中出现的泡沫。按体积/体积=1:1 混合上述饱和酚与氯仿即得酚/氯仿(1:1)。酚和氯仿均有很强的腐蚀性, 操作时应戴手套。

12、TE 缓冲液：10 mmo/L Tris-Cl (pH8.0), 1 mmol/L EDTA (pH8.0)。高压灭菌后储存于 4℃冰箱中。

13、STET：0.1 mol/L NaCl, 10mmol/L Tris-Cl(pH8.0), 10 mmol/L EDTA (pH8.0), 5%

免责声明：以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体, 由钟鼎生物专业技术人员整理汇总, 所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明, 其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难, 钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权, 也不对其可靠性、真实性承担任何责任, 特此声明。

TritonX-100。

14、STE: 0.1mol/L NaCl, 10mmol/L Tris·Cl(pH8.0), 1mmol/L EDTA (pH8.0)。

15、电泳所用试剂: (1) TBE 缓冲液 (5×): 称取 Tris 54g, 硼酸 27.5g, 并加入 0.5M EDTA(pH8.0) 20ml, 定溶至 1000ml。 (2) 上样缓冲液 (6×): 0.25% 溴酚蓝, 40% (w/v) 蔗糖水溶液。

第三节 操作步骤

一、细菌的培养和收集

将含有质粒 pBS 的 DH5 α 菌种接种在 LB 固体培养基(含 50 μ g/ml Amp)中, 37 $^{\circ}$ C 培养 12-24 小时。用无菌牙签挑取单菌落接种到 5ml LB 液体培养基(含 50 μ g/ml Amp)中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养约 12 小时至对数生长后期。

二、质粒 DNA 少量快速提取

质粒 DNA 小量提取法对于从大量转化子中制备少量部分纯化的质粒 DNA 十分有用。这些方法共

同特点是简便、快速, 能同时处理大量试样,所得 DNA 有一定纯度,可满足限制酶切割、电泳分析的需

要。

(一)、煮沸法

- 1、将 1.5ml 培养液倒入 eppendorf 管中,4 $^{\circ}$ C 下 12000 g 离心 30 秒。
- 2、弃上清, 将管倒置于卫生纸上几分钟, 使液体流尽。
- 3、将菌体沉淀悬浮于 120ml STET 溶液中, 涡旋混匀。
- 4、加入 10ml 新配制的溶菌酶溶液(10mg/ml), 涡旋振荡 3 秒钟。
- 5、将 eppendorf 管放入沸水浴中,50 秒后立即取出。
- 6、用微量离心机 4 $^{\circ}$ C 下 12000g 离心 10 分钟。
- 7、用无菌牙签从 eppendorf 管中去除细菌碎片。
- 8、取 20ml 进行电泳检查。

[注意] 1. 对大肠杆菌可从固体培养基上挑取单个菌落直接进行煮沸法提取质粒 DNA。

2. 煮沸法中添加溶菌酶有一定限度,浓度高时,细菌裂解效果反而不好。有时不同溶菌酶也能溶

免责声明: 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体, 由钟鼎生物专业技术人员整理汇总, 所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明, 其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难, 钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权, 也不对其可靠性、真实性承担任何责任, 特此声明。

菌。

3. 提取的质粒 DNA 中会含有 RNA,但 RNA 并不干扰进一步实验,如限制性内切酶消化,亚克隆及连接反应等。

(二)、碱法

- 1、取 1.5ml 培养液倒入 1.5ml eppendorf 管中,4℃下 12000g 离心 30 秒。
- 2、弃上清,将管倒置于卫生纸上数分钟,使液体流尽。
- 3、菌体沉淀重悬浮于 100μl 溶液 I 中(需剧烈振荡),室温下放置 5-10 分钟。
- 4、加入新配制的溶液 II 200μl, 盖紧管口, 快速温和颠倒 eppendorf 管数次,以混匀内容物(千万不要振荡),冰浴 5 分钟。
- 5、加入 150μl 预冷的溶液 III,盖紧管口, 并倒置离心管, 温和振荡 10 秒,使沉淀混匀,冰浴中 5-10 分钟,4℃下 12000g 离心 5-10 分钟。
- 6、上清液移入干净 eppendorf 管中,加入等体积的酚/氯仿(1:1),振荡混匀,4℃下 12000g 离心 5 分钟。
- 7、将水相移入干净 eppendorf 管中,加入 2 倍体积的无水乙醇,振荡混匀后置于-20℃冰箱中 20 分钟, 然后 4℃下 12000g 离心 10 分钟。
- 8、弃上清,将管口敞开倒置于卫生纸上使所有液体流出,加入 1ml 70%乙醇洗沉淀一次,4℃下 12000g 离心 5-10 分钟。
- 9、吸除上清液,将管倒置于卫生纸上使液体流尽,真空干燥 10 分钟或室温干燥。
- 10、将沉淀溶于 20μl TE 缓冲液(pH8.0, 含 20μg/ml RNaseA)中, 储于-20℃冰箱中。

[注意] 1. 提取过程应尽量保持低温。

2. 提取质粒 DNA 过程中除去蛋白很重要,采用酚/氯仿去除蛋白效果较单独用酚或氯仿好,要将蛋白尽量除干净需多次抽提。

免责声明: 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体, 由钟鼎生物专业技术人员整理汇总, 所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明, 其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难, 钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权, 也不对其可靠性、真实性承担任何责任, 特此声明。

3. 沉淀 DNA 通常使用冰乙醇,在低温条件下放置时间稍长可使 DNA 沉淀完全。沉淀 DNA 也可用

异丙醇(一般使用等体积),且沉淀完全,速度快,但常把盐沉淀下来,所以多数还是用乙醇。

(三)、Wizard 少量 DNA 纯化系统

Promega 公司的 Wizard 少量 DNA 纯化系统可快速有效的抽提质粒 DNA,整个过程只需 15 分钟。

提取的质粒可直接用于 DNA 测序、酶切分析和体外转录等。

该系统中所含试剂和柱子可以用于 50 次 1-3ml 质粒培养液的分离和纯化,试剂包括 10ml 细胞

悬浮液, 10ml 细胞裂解液; 10ml 中和液, 50ml Wizard 少量 DNA 纯化树脂, 50ml 柱洗液 (使用前

加 95%乙醇至 120ml)和 50 支 Wizard 微型柱。

- 1、 1-3ml 过夜培养细胞液 4℃下 12000g 离心 1-2 分钟。
- 2、 去除上清液, 菌体细胞悬浮于 200 μ l 细胞悬浮液中,充分混合,并移入 eppendorf 管中。
- 3、 加 200 μ l 细胞裂解液, 颠倒离心管数次,直到溶液变清亮。
- 4、 加 200 μ l 中和液,颠倒离心管数次。
- 5、 4℃下 12000g 离心 5 分钟, 取上清液于新的 eppendorf 管中。
- 6、 加 1ml Wizard 少量 DNA 纯化树脂,颠倒离心管数次以充分混匀。
- 7、 取一次性注射器, 取出注塞,并使注射筒与 Wizard 微型柱连接,用移液枪将上述混合液加入注射筒中,并用注塞轻推,使混合物进入微型柱。
- 8、 将注射器与微型柱分开,取出注塞, 再将注射筒与微型柱相连,加入 2ml 柱洗液,并用注塞轻推,使柱洗液进入微型柱。
- 9、 取出微型柱置于 eppendorf 管中,离心 2 分钟以除去微型柱中的柱洗液。
- 10、 将微型柱放在一个新 eppendorf 管中,加 50 μ l TE(或水)于微型柱中,静止 1 分钟后, 4℃下 12000g 离心 20 秒。
- 11、 丢弃微型柱, 将 eppendorf 管中的质粒 DNA 贮于 4℃或-20℃冰箱。

免责声明: 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体, 由钟鼎生物专业技术人员整理汇总, 所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明, 其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难, 钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权, 也不对其可靠性、真实性承担任何责任, 特此声明。

[注意] 树脂使用前应充分混匀,如有结晶,可将树脂用 25-37℃水浴处理 10 分钟。

三、质粒 DNA 的大量提取和纯化

在制作酶谱、测定序列、制备探针等实验中需要高纯度、高浓度的质粒 DNA,为此需要大量提取

质粒 DNA。大量提取的质粒 DNA 一般需进一步纯化,常用柱层析法和氯化铯梯度离心法。

(一)、碱法

- 1、取培养至对数生长后期的含 pBS 质粒的细菌培养液 250ml, 4℃下 5000g 离心 15 分钟,弃上清,将离心管倒置使上清液全部流尽。
- 2、将细菌沉淀重新悬浮于 50ml 用冰预冷的 STE 中(此步可省略)。
- 3、同步骤 1 方法离心以收集细菌细胞。
- 4、将细菌沉淀物重新悬浮于 5ml 溶液 I 中,充分悬浮菌体细胞。
- 5、加入 12ml 新配制的溶液 II, 盖紧瓶盖,缓缓地颠倒离心管数次,以充分混匀内容物,冰浴 10 分钟。
- 6、加 9ml 用冰预冷的溶液 III, 摇动离心管数次以混匀内容物,冰上放置 15 分钟,此时应形成白色絮状沉淀。
- 7、4℃下 5000g 离心 15 分钟。
- 8、取上清液,加入 50ml RNA 酶 A(10mg/ml), 37℃水浴 20 分钟。
- 9、加入等体积的饱和酚/氯仿,振荡混匀,4℃下 12000g 离心 10 分钟。
- 10、取上层水相, 加入等体积氯仿,振荡混匀,4℃下 12000g 离心 10 分钟。
- 11、取上层水相,加入 1/5 体积的 4mol/L NaCl 和 10% PEG(分子量 6000), 冰上放置 60 分钟。
- 12、4℃下 12000g 离心 15 分钟, 沉淀用数 ml 70%冰冷乙醇洗涤, 4℃下 12000g 离心 5 分钟。
- 13、真空抽干沉淀, 溶于 500ml TE 或水中。

[注意] 1. 提取过程中应尽量保持低温。

2. 加入溶液 II 和溶液 III 后操作应混和,切忌剧烈振荡。

免责声明: 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体, 由钟鼎生物专业技术人员整理汇总, 所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明, 其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难, 钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权, 也不对其可靠性、真实性承担任何责任, 特此声明。

3. 由于 RNA 酶 A 中常存在有 DNA 酶,利用 RNA 酶耐热的特性,使用时应先对该酶液进行热处理(80℃ 1 小时),使 DNA 酶失活。

(二)、Wazard 大量 DNA 纯化系统

碱法大量提取 DNA 往往需要很长的时间.Promega 公司的 Wiazrd 大量 DNA 纯化系统既简单又快

速,只需要离心和真空抽干,这个系统可以从 500ml 培养液中在 3 小时以内获得 1mg 以上的高质量

质粒 DNA(200-20000bp)。该系统不需要酚和氯仿抽提,纯化后的 DNA 溶于水或 TE 缓冲液中,不含任

何盐份,可以直接用于 DNA 序列分析和酶切反应,也可以用于在核酸酶抑制剂(如 RNasin)存在的

条件下进行体外转录反应等。

该系统中含有的试剂和柱子可以用于 10 次 100-500ml 质粒培养液的分离和纯化,试剂包括:

150ml 细

胞悬浮液, 150ml 细胞裂解液, 150ml 中和液, 100ml Wizard 大量 DNA 纯化树脂, 125ml

Wizard

柱子洗脱溶液和 10 支 Wizard 带有存储离心管的柱子。

1、100-500ml 细胞培养液置离心管中, 22-25℃ 下 5000g 离心 10 分钟, 所得细胞沉淀充分悬浮

于细胞悬浮液中。

2、加 15ml 细胞裂解溶液并轻轻混合,可以反复倒置混合,但不能用涡旋振荡,细胞裂解完全时,

溶液会变清,这一步需要 20 分钟。

3、加 15ml 中和溶液,立即反复倒置离心管数次,并使之混匀。

4、14000g,22-25℃ 离心 15 分钟。

5、小心地将上清液吸出并移至一个新离心管中。

6、加 0.5 倍体积的异丙醇,混合均匀, 14000g 22-25℃ 下离心 15 分钟。

7、弃上清,悬浮 DNA 沉淀于 2ml TE 缓冲液中。这一步中也许有的沉淀不能溶解。

免责声明: 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体, 由钟鼎生物专业技术人员整理汇总, 所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明, 其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难, 钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权, 也不对其可靠性、真实性承担任何责任, 特此声明。

- 8、加 10ml Wizard 大量 DNA 纯化树脂溶液,并涡旋混合。
- 9、每一个样品,使用一支 Wizard 大量柱子,柱子的头插在真空器上(Promega 产品,与此配套)。
- 10、将树脂/DNA 混合液转入柱子中,真空抽取树脂/DNA 混合液。
- 11、将树脂/DNA 混合液抽干后,加 13ml 柱子洗脱溶液至离心管中,对管底部的树脂/DNA 进行洗脱(柱子一边旋转一边加入洗脱液),并加入柱子中。
- 12、真空抽干所加入的洗脱。
- 13、再加 12ml 柱子洗脱液进柱子并抽干。
- 14、加入 5ml 80%乙醇漂洗柱中的树脂,柱子真空抽干后将柱子放入用户提供的离心管中,2500rpm(1300g)离心 5 分钟。
- 15、取出柱子,真空抽干 5 分钟,再将柱子放入系统所提供的离心管中,2500rpm(1300g)离心 5 分钟。
- 16、在柱子中加入 1.5ml 65-70℃ 预热过的灭菌重蒸水或 TE,1 分钟后 2500rpm(1300g)离心柱子/离心管 5 分钟。
- 17、取出柱子,离心管中溶液即为提取的质粒 DNA,可以直接放在离心管中,盖上盖子,储存在 4℃或-20℃备用。

[注意] 1. 在使用之前,系统所提供的柱子洗脱液按 1:1 加入 125ml 95%乙醇。

2. 纯化树脂必须混匀后再用。

(三)、Sephrose 2B 柱纯化质粒 DNA

碱法提取的质粒 DNA 即使用 RNA 酶处理,仍会含有少量 RNA。当有些试验需无 RNA 污染的 DNA

制品时,则需进行进一步纯化。一般常用 Sepharose 2B 或 Sepharose 4B 进行纯化,该方法具有快速,

条件温和,重复性好,载体物质可以再利用等优点,因而已广泛用于质粒 DNA 纯化。

1、将 Sepharose 2B 经含 0.1% SDS 的 TE (pH8.0) 平衡后上柱。

免责声明: 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。

- 2、将至多 1ml 的 DNA 溶液铺在 Sepharase 2B 柱上。
- 3、待 DNA 溶液完全进入柱内后立即在柱的上部连接含有 0.1% SDS 的 TE(pH8.0)贮液瓶。
- 4、以 1ml 流出液为 1 份进行收集。
- 5、对每一管测定其 OD260 值,以确定哪些管中含有质粒 DNA。通常质粒 DNA 在柱上流出的第一个峰中。
- 6、合并所有含质粒的洗脱液,用等体积的酚/氯仿(1:1)抽提,4℃下 12000g 离心 2 分钟,将上层水相转入新管。
- 7、加入 2 倍体积的冰冷无水乙醇, -20℃下沉淀 10 分钟,然后 4℃下 12000g 离心 10 分钟,弃去上清液。
- 8、沉淀加 70%乙醇洗涤,4℃下 12000g 离心 10 分钟,弃去上清液。
- 9、沉淀真空抽干,重新溶于 TE 或无菌水中。

[注意] 在装柱过程中,要防止柱床中出现断裂或气泡现象,要使界面保持平整。对新装成的柱,应用含 0.1% SDS 的 TE 平衡,以使柱内的凝胶均匀。

思考题

1. 质粒的基本性质有哪些?
2. 质粒载体与天然质粒相比有哪些改进?
3. 在碱法提取质粒 DNA 操作过程中应注意哪些问题?

免责声明：以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体，由钟鼎生物专业技术人员整理汇总，所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明，其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难，钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权，也不对其可靠性、真实性承担任何责任，特此声明。