

### 质粒 DNA 的碱裂解法提取与纯化

细菌质粒是一类双链、闭环的 DNA，大小范围从 1kb 至 200kb 以上不等。各种质粒都是存在于细胞质中、独立于细胞染色体之外的自主复制的遗传成份，通常情况下可持续稳定地处于染色体外的游离状态，但在一定条件下也会可逆地整合到寄主染色体上，随着染色体的复制而复制，并通过细胞分裂传递到后代。

质粒已成为目前最常用的基因克隆的载体分子，重要的条件是可获得大量纯化的质粒 DNA 分子。目前已有许多方法可用于质粒 DNA 的提取，本实验采用碱裂解法提取质粒 DNA。

碱裂解法是一种应用最为广泛的制备质粒 DNA 的方法，其基本原理为：当菌体在 NaOH 和 SDS 溶液中裂解时，蛋白质与 DNA 发生变性，当加入中和液后，质粒 DNA 分子能够迅速复性，呈溶解状态，离心时留在上清中；蛋白质与染色体 DNA 不变性而呈絮状，离心时可沉淀下来。

纯化质粒 DNA 的方法通常是利用了质粒 DNA 相对较小及共价闭环两个性质。例如，氯化铯-溴化乙锭梯度平衡离心、离子交换层析、凝胶过滤层析、聚乙二醇分级沉淀等方法，但这些方法相对昂贵或费时。对于小量制备的质粒 DNA，经过苯酚、氯仿抽提，RNA 酶消化和乙醇沉淀等简单步骤去除残余蛋白质和 RNA，所得纯化的质粒 DNA 已可满足细菌转化、DNA 片段的分离和酶切、常规亚克隆及探针标记等要求，故在分子生物学实验室中常用。

#### 一、试剂准备

1. 溶液 I：50mM 葡萄糖，25mM Tris-HCl(pH 8.0)，10mM EDTA(pH 8.0)。1M Tris-HCl(pH 8.0) 12.5ml，0.5M EDTA (pH 8.0) 10ml，葡萄糖 4.730g，加 ddH<sub>2</sub>O 至 500ml。在 10 lbf/in<sup>2</sup> 高压灭菌 15min，贮存于 4℃。
2. 溶液 II：0.2N NaOH，1% SDS。2N NaOH 1ml，10%SDS 1ml，加 ddH<sub>2</sub>O 至 10ml。使用前临时配置。
3. 溶液 III：醋酸钾 (KAc) 缓冲液，pH 4.8。5M KAc 300ml，冰醋酸 57.5ml，加 ddH<sub>2</sub>O 至 500ml。4℃ 保存备用。
4. TE：10mM Tris-HCl(pH 8.0)，1mM EDTA(pH 8.0)。1M Tris-HCl (pH 8.0) 1ml，0.5M EDTA (pH 8.0) 0.2ml，加 ddH<sub>2</sub>O 至 100ml。15 lbf/in<sup>2</sup> 高压湿热灭菌 20min，4℃ 保存备用。

5. 苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1)
6. 乙醇 (无水乙醇、70%乙醇)
7. 5×TBE: Tris 碱 54g, 硼酸 27.5g, EDTA-Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 4.65g, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1000ml。15 lbf/in<sup>2</sup> 高压湿热灭菌 20min, 4℃保存备用。
8. 溴化乙锭 (EB): 10mg/ml
9. RNase A (RNA 酶 A): 不含 DNA 酶(DNase-free) RNase A 的 10mg/ml, TE 配制, 沸水加热 15min, 分装后贮存于-20℃。
10. 6×loading buffer(上样缓冲液): 0.25%溴酚蓝, 0.25%二甲苯青 FF, 40%(W/V) 蔗糖水溶液。
11. 1% 琼脂糖凝胶: 称取 1g 琼脂糖于三角烧瓶中, 加 100ml 0.5×TBE, 微波炉加热至完全溶化, 冷却至 60℃左右, 加 EB 母液 (10mg/ml) 至终浓度 0.5 μg/ml (注意: EB 为强诱变剂, 操作时带手套), 轻轻摇匀。缓缓倒入架有梳子的电泳胶板中, 勿使有气泡, 静置冷却 30min 以上, 轻轻拔出梳子, 放入电泳槽中 (电泳缓冲液 0.5×TBE), 即可上样。

## 二、操作步骤

1. 挑取 LB 固体培养基上生长的单菌落, 接种于 2.0ml LB (含相应抗生素) 液体培养基中, 37℃、250g 振荡培养过夜 (约 12-14hr)。
2. 取 1.5ml 培养物入微量离心管中, 室温离心 8000g×1min, 弃上清, 将离心管倒置, 使液体尽可能流尽。
3. 将细菌沉淀重悬于 100 μl 预冷的溶液 I 中, 剧烈振荡, 使菌体分散混匀。
4. 加 200 μl 新鲜配制的溶液 II, 颠倒数次混匀 (不要剧烈振荡), 并将离心管放置于冰上 2-3min, 使细胞膜裂解 (溶液 II 为裂解液, 故离心管中菌液逐渐变清)。
5. 加入 150 μl 预冷的溶液 III, 将管温和颠倒数次混匀, 见白色絮状沉淀, 可在冰上放置 3-5min。溶液 III 为中和溶液, 此时质粒 DNA 复性, 染色体和蛋白质不可逆变性, 形成不可溶复合物, 同时 K<sup>+</sup>使 SDS-蛋白复合物沉淀。
6. 加入 450 μl 的苯酚/氯仿/异戊醇, 振荡混匀, 4℃离心 12000g × 10min。
7. 小心移出上清于一新微量离心管中, 加入 2.5 倍体积预冷的无水乙醇, 混匀, 室温放置 2-5min, 4℃离心 12000g×15min。
8. 1ml 预冷的 70%乙醇洗涤沉淀 1-2 次, 4℃离心 8000g×7min, 弃上清, 将沉淀

在室温下晾干。

9.沉淀溶于  $20\ \mu\text{l}$  TE (含 RNase A  $20\ \mu\text{g/ml}$ ),  $37^\circ\text{C}$  水浴 30min 以降解 RNA 分子,  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。

### 三、质粒 DNA 的电泳检测

观察琼脂凝胶中 DNA 的最简单方法是利用荧光染料溴化乙锭进行染色。该物质含有一个可以嵌入 DNA 的堆积碱基之间的一个平面基团, 这个基团的固定位置及其与碱基的密切接近, 导致染料与 DNA 结合并呈现荧光, 其荧光产率比游离染料溶液有所增加。DNA 吸收  $254\text{nm}$  处的紫外辐射并传递给染料, 而被结合的染料本身则在  $302\text{nm}$  和  $366\text{nm}$  有光吸收。这两种情况下, 被吸收的能量可在可见光谱红橙区的  $590\text{nm}$  处重新发射出来。因此, 当凝胶中含有游离溴化乙锭时即可以检测到少量的 DNA。

取制备的质粒 DNA  $1-2\ \mu\text{l}$ , 加适当 loading buffer 混匀上样, 采用  $1-5\text{V/cm}$  的电压, 使 DNA 分子从负极向正极移动至合适位置, 取出凝胶置紫外灯下检测, 摄片。

### 四、注意事项

本裂解法小量制备质粒 DNA 重复性好, 一般无麻烦。若所提取质粒 DNA 不能被限制性内切酶切割, 可通过酚/氯仿再次抽提, 以清除杂质来解决问题。