

快速高纯的质粒 DNA 中大量抽提

简介

提取质粒是分子生物学和基因工程研究中最基本最常用的一项技术。目前商品化的试剂盒以及常用的质粒提取技术都是结合了经典的碱裂解法。这主要是因为碱裂解法能高效地区分质粒 DNA 和基因组 DNA。碱裂解法处理细菌培养液时，在中和步骤时会产生大量的蛋白质，染色体 DNA 以及 SDS-K 等沉淀。传统的方法是通过离心沉淀去除这些杂质，来得到澄清的上清液。在质粒中大量抽提时，由于溶液体积大，需要大型高速的离心机，限制了某些实验室的应用。此外大量的杂质很难通过离心去除干净，离心后总是在溶液的表层飘浮一层杂质，或沉淀不紧密，转移上清液会带入一些沉淀物至上清液，这些漂浮的沉淀物含有大量的蛋白质和基因组 DNA，会影响到质粒的纯度和产量。Magen 公司的 HiPure Plasmid Midi&Maxi Kits 系列采用硅胶柱纯化技术，并采用注射器式的过滤器过滤去除碱裂解形成的沉淀物。过滤器中含有多层过滤膜，可层层过滤得到澄清的滤液，然后再过柱纯化质粒 DNA。使用该方法得到的质粒纯度更高，稳定更好。该系列包括：

产品名称	菌液用量	处理时间
HiPure Plasmid Midi Kit	30-50ml	<1 小时
HiPure Plasmid Maxi Kit	50-250ml	<1 小时

实验结果

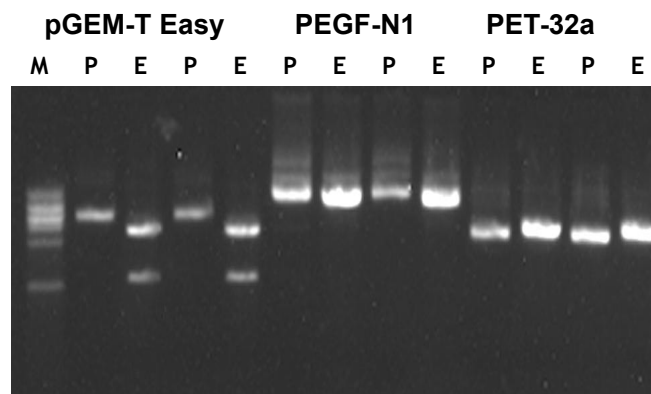
1. 质粒 DNA 产量及纯度

取 50ml(中量)或 200ml(大量)不同载体的细菌培养液，每一份重复 2 次，按照 HiPure Plasmid Midi Kit 或 HiPure Plasmid Maxi Kit 说明书进行操作。得到的 DNA 用紫外分光光度计测量产量和纯度，结果如下。由数据可知，使用该方法得到质粒的 OD260/280 在 1.80-1.89，OD260/230 在 1.96-2.25，质粒纯度高，盐度低。

Kits	Vector	Yield/μg	A _{260/280}	A _{260/230}
HiPure Plasmid Midi Kit	Psp65	160	1.82	1.92
	Psp65	168	1.83	1.91
	PEGF	259	1.86	1.96
	PEGF	280	1.85	1.96
	PET-32a	158	1.86	2.12
	PET-32a	139	1.84	2.23
	pGEM-T	140	1.83	2.25
	pGEM-T	149	1.81	2.21
	pSP65	701	1.83	1.99
HiPure Plasmid Maxi Kit	pSP65	753	1.81	1.92
	PEFG	1000	1.80	1.96
	PEFG	1024	1.81	1.99
	PET-32a	612	1.89	2.02
	PET-32a	601	1.81	2.24
	pGEM-T	650	1.85	2.22
	pGEM-T	635	1.89	1.96

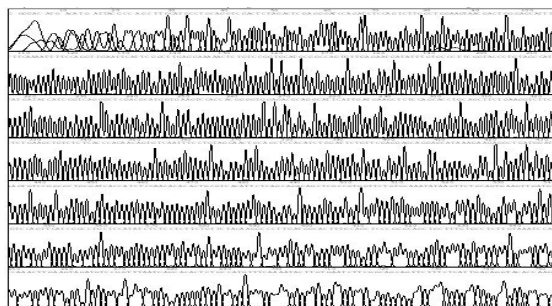
2. 纯化的质粒酶切效果

取纯化的质粒 DNA，用 EcoR I 酶切 30 分钟后，取原始质粒和酶切产物上样于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析结果。结果表明，HiPure Plasmid Maxi Kit 纯化得到的 DNA 完整性好，并可直接用于酶切。



3. 质粒测序效果

取纯化的质粒 DNA，用 ABI 3730 DNA 测序仪进行测序。结果如下。最终可信测序长度约为 1300bp，截取部分测序图如下：



4. 过滤器的使用方法

详细使用方法参见说明书。