

实验一 质粒DNA的制备

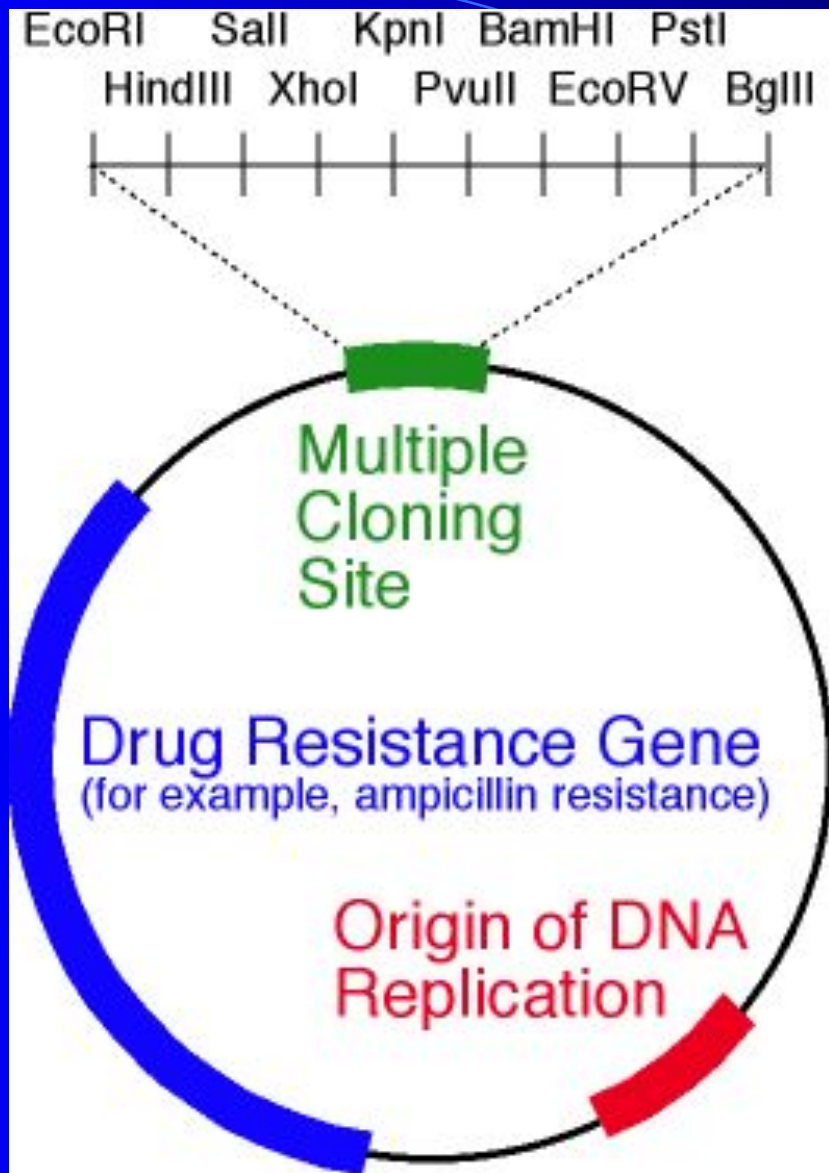
1. 实验目的
2. 实验原理
3. 实验仪器、材料与试剂
4. 实验步骤
5. 实验结果及讨论

实验目的

- 了解质粒提取的几种方法和原理
- 掌握碱裂解法提取质粒的原理和方法

实验原理

- 质粒是一种细菌染色体外的稳定遗传因子，具有自主复制能力，**双链共价闭合环状**，具有超螺旋结构的小型DNA分子，分子量一般为1-100kb。
- 在细菌细胞内，质粒以**超螺旋**形式存在，提取质粒的过程中还会出现松弛型环状质粒（开环DNA）和线性DNA。电泳时超螺旋质粒、线性DNA、开环质粒泳动速度依次降低



结构的三大要素：

- 多克隆位点 (multiple cloning site , MCS)
- 选择标记（耐药性，LacZ）
- 独立的复制单位

种类：

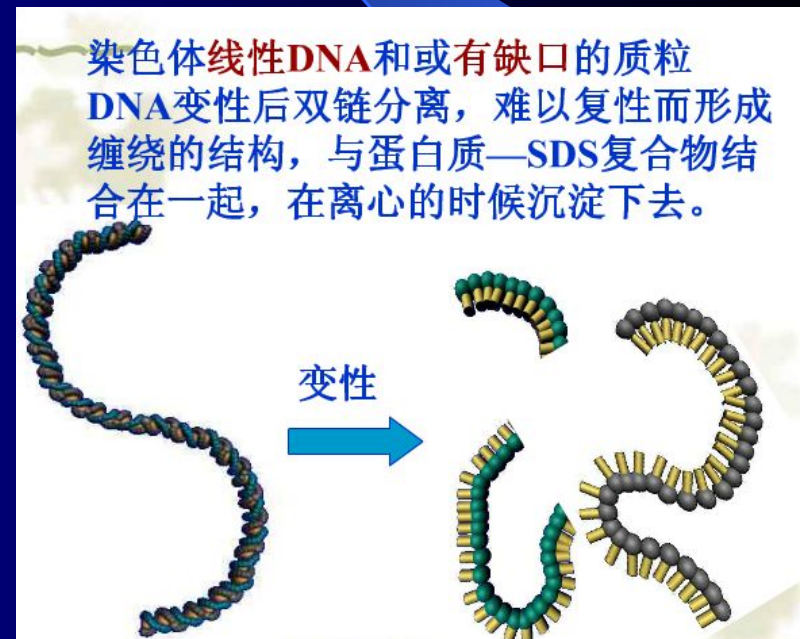
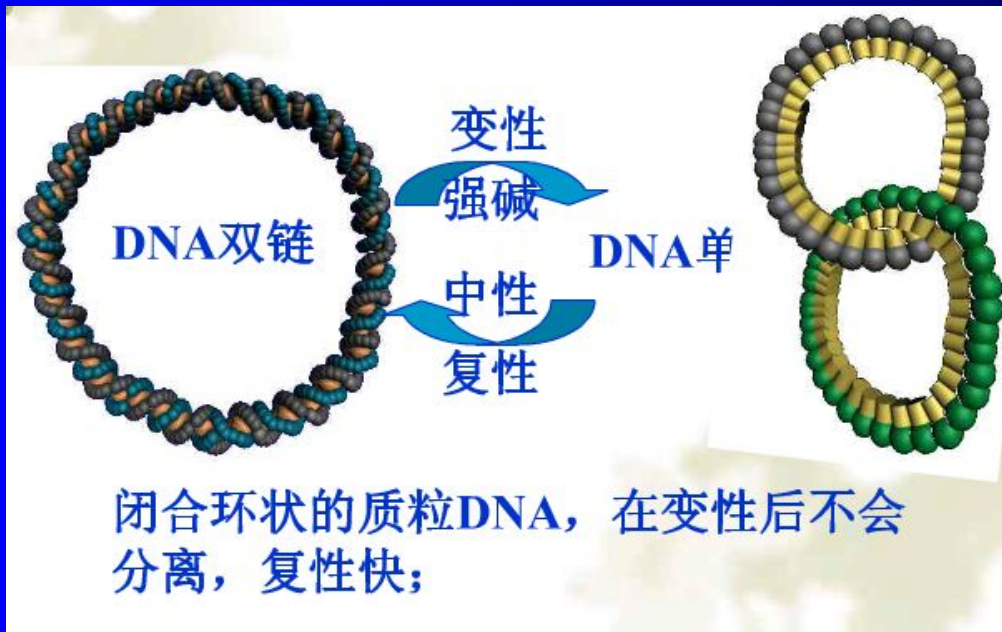
- 质粒
- 噬菌体
- 酵母人工染色体（YAC）
- 逆转录病毒载体

质粒的小量制备方法比较

种类	原理	优点	缺点
碱裂解法	碱裂解	收获率高，适用于多数菌株	溶液 II 现配现用
煮沸法	溶菌酶、Triton X 100 加热100℃	<15kb质粒有效，可大量制备	对可以大量释放碳水化合物的大肠杆菌不适用；对表达限制酶A（endA+）菌株不适用
SDS裂解法	溶菌酶， SDS	温和，适用于大质粒提取（>15kb）	产量低
试剂盒法	碱裂解法和离心吸附柱提纯	便捷、提取的质粒比较纯	价格相对较贵

碱裂解法实验原理

碱性条件（pH 12.5）下，线性染色体DNA的双螺旋结构解开而变性，质粒DNA的氢键虽然断裂但两条互补链彼此缠绕，紧密结合在一起。当加入乙酸钾恢复至中性时，染色体DNA分子难以复性，而质粒DNA分子很快复性，离心时染色体DNA与细胞碎片一起被沉淀出来，而质粒DNA则留在上清液中。



用异丙醇或乙醇沉淀后洗涤，可得到较纯的质粒DNA。

实验仪器、材料与试剂

(一) 仪器

1. 恒温摇床
2. 超净工作台
3. 高压灭菌锅
4. 高速台式离心机
5. 微量取液器

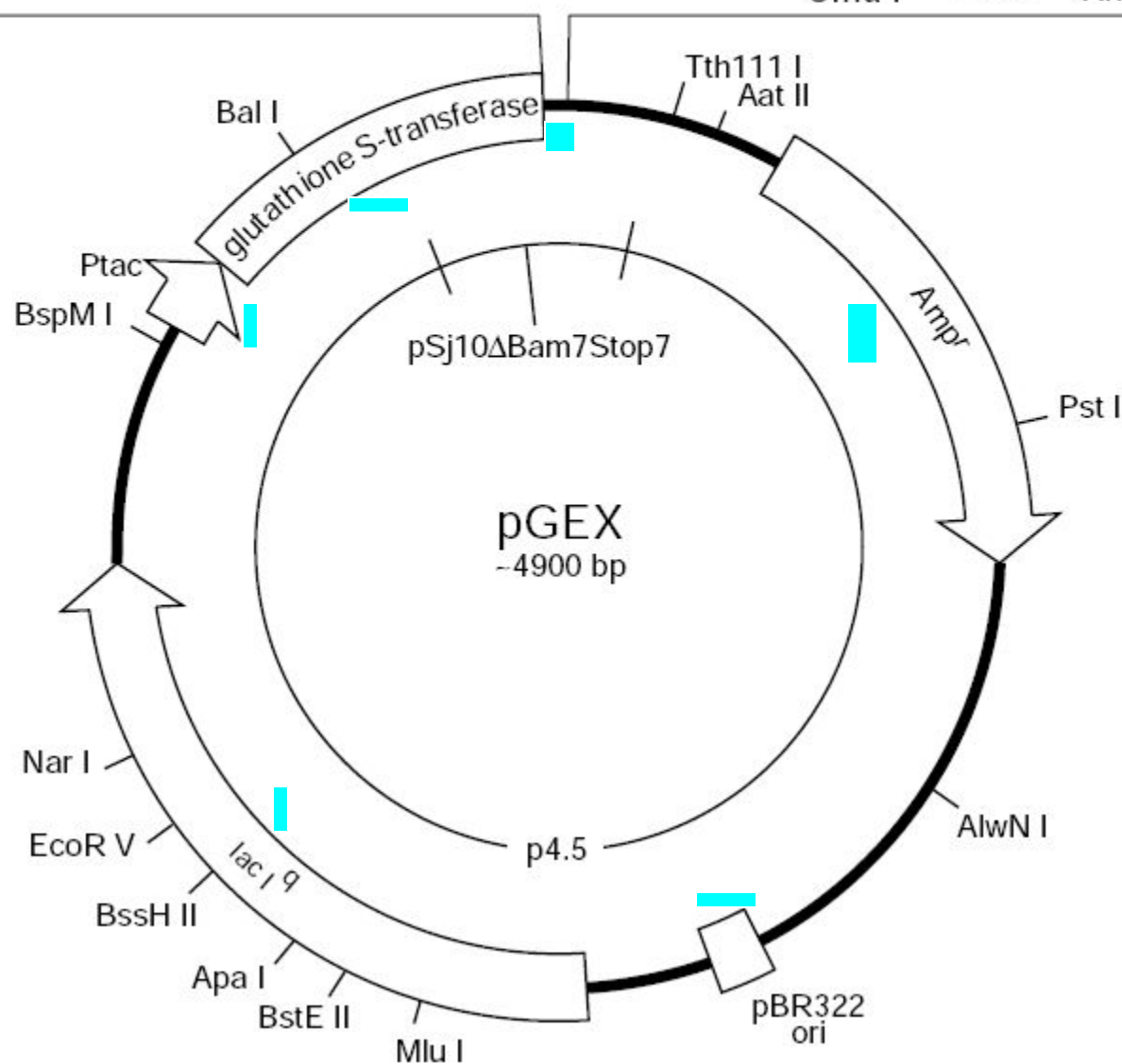
(二) 材料

- 含pGEX-5p-1质粒的大肠杆菌 DH 5 α 。

pGEX-6P-1 (27-4597-01)

PreScission™ Protease

Leu	Glu	Val	Leu	Phe	Gln	Gly	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Glu	Phe	Pro	Gly	Arg	Leu	Glu	Arg	Pro	His
CTG	GAA	GTT	CTG	TTC	CAG	GGG	CCC	CTG	GGA	TCC	CCG	GAA	TTC	CCG	GGT	CGA	CTC	GAG	CGG	CCG	CAT
								BamH I		EcoR I		Sma I		Sal I		Xho I		Not I			



(三) 试剂

- **LB液体培养基 (1L)**

胰蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, NaCl 10g

加去离子水至800ml 搅拌, 使溶质完全溶解, 用NaOH 调节pH值至7.0, 加入去离子水至总体积为1升, 高压蒸汽灭菌20分钟。

- **LB固体培养基 (1L)**

在上述LB液体培养基 (1L) 中加入琼脂粉15g。

- **Solution I :**

50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris·Cl (pH 8.0) , 10 mmol/L EDTA (pH8.0); 高压灭菌后, 4℃保存备用。

- **Solution II (现用现配制):**

0.2 mol/L NaOH : 现配现用, 冬季有结晶, 融化后使用
1% SDS

- **Solution III** (100 ml)

5mol/L KAc 60 ml

冰醋酸 11.5 ml

水 28.5 ml

配制成的溶液III含3 mol/L钾盐、5 mol/L醋酸 (pH 4.8)。

- **胰RNA酶**

将胰RNA酶 (RNA 酶 A) 溶于10 mmol/L Tris.Cl (pH 7.5)、15 mmol/L NaCl 中，配成10 mg/ml的浓度，于100℃加热15分钟，缓慢冷却至室温，分装成小份保存于-20℃。

- **苯酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1)**，乙醇，70%乙醇。

- 转化：将质粒通过42 °C热激的方法转入大肠杆菌感受态细胞DH5 α 中，在含有LB的固体培养基中划线，挑单克隆摇菌。
- 菌液的活化：若有甘油冻纯菌，可直接按照1:100比例接入新鲜的LB培养基中，加入相应的抗生素活化12 h备用。

实验流程

1.5ml 含有质粒的菌液



8000g离心1min, 收集菌体

菌体沉淀



加入冰预冷溶液 I 100 μ l 重悬沉淀 (充分混匀, 或者影响质粒量)

悬液



加入新配制溶液 II 200 μ l, 颠倒混匀 (轻柔), 室温裂解3-5 min

裂解液



加入冰预冷溶液III 150 μ l, 迅速混匀。12000g 离心10 min, 取上清液

上清液



加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1), 振荡混匀, 离心12000g, 离心 10min, 取上清液。

上清液

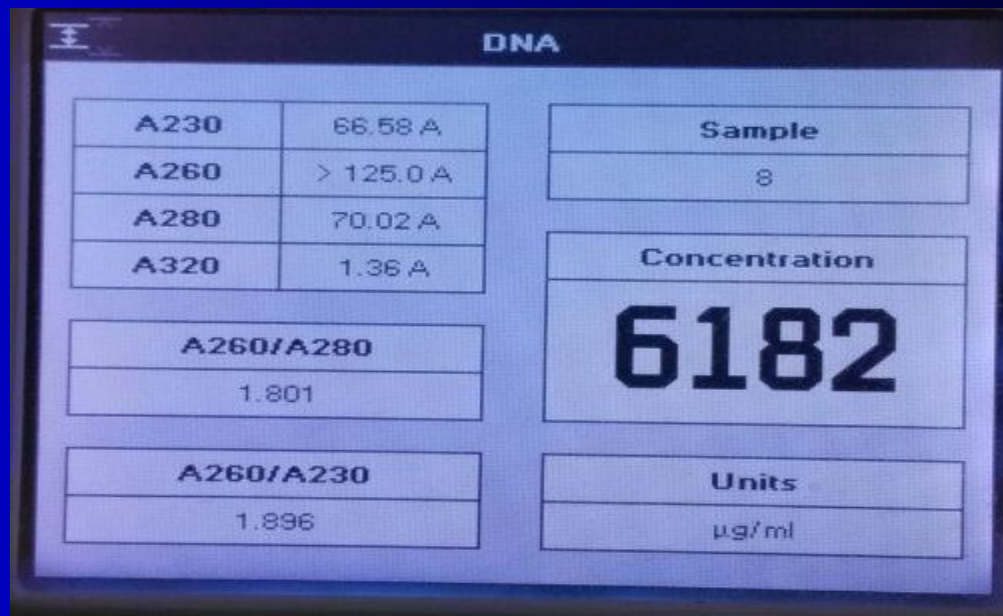


加入2.5倍体积预冷的无水乙醇, 混匀, 室温放置2-5min, 离心12000g, 10min, 小心吸除上清, 70%乙醇1 ml洗涤一次, 晾干, 加入50 μ l 含有去DNAase的RNA酶A (20 μ g/ml)的去离子水, 混匀, -20 $^{\circ}$ C放置待检测

质粒溶液

检测

质粒 marker



实验中各试剂的用途（掌握）

- **Solution I** 中加入50 mmol/L葡萄糖， 10 mmol/L EDTA (pH8.0) 的作用分别是什么？
- **Solution II** 中1% SDS的作用是什么？
- **Solution III** 中5mol/L Kac缓冲液的作用是什么？

实验讨论

- 碱法提取质粒是实验室最常用的质粒提取方法之一，提取量较大，便于操作。
- 如有蛋白质残留，哪些措施可以尽量降低蛋白污染？
- 加入溶液Ⅱ和溶液Ⅲ时间过长分别会有什么影响？
- 质粒测浓度时OD260/OD280读值在什么范围内最佳？超出范围的原因有哪些？