

# 一种新型超高结合力的质粒提取技术

## 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。在实验室中大多用到强碱裂解细胞，再通过酚氯仿抽提、硅胶柱吸附等纯化方式进行纯化。在提取中大量或超大量质粒时，这些纯化方法各有优缺点。酚氯仿抽提可以通过不断扩大菌液用量增加质粒的产量，但酚氯仿是有毒性的化学物品，且得到的质粒 DNA 纯度较低。硅胶柱吸附纯化方式可以避免使用酚氯仿，但硅胶膜对质粒有一定的吸附上限，提取中大量的质粒时需要用到大柱子，成本较高，且对仪器的要求也比较高，难以满足广大用户的需求。

Magen 公司的质粒提取系列采用改性的硅胶膜为基质，这种改性硅胶膜的核酸结合能力是一般硅胶膜的 20-50 倍，可快速简易地从菌液量提取微量至超大量的质粒 DNA，为质粒 DNA 制备提供了另一种性价比更高的产品。BigBind 系列产品包括：

产品名称	菌液最大用量	结合力	洗脱体积
P111	10ml	100 ug	30-100 ul
P1112	20ml	300 ug	50-200 ul
P1113	100ml	1 mg	0.5 ml
P1114	300ml	3 mg	1 ml
P1116	500mL	5 mg	2 ml
P1117	1000mL	10 mg	10 ml

## 实验方法

选择以下不同拷贝数，不同片段大小质粒载体进行实验。3KB 质粒 PSP65 Vector (Promega), 3KB pGEM Teasy (promega), 5KB pEGF-N1 Vector (Invitrogen), 8KB 质粒, 10KB 质粒以及 12KB 质粒。先用常规质粒提取试剂盒 HiPure Plasmid Micro Kit 检测每 ml 菌液中质粒的含量，然后用 BigBind 大量、超大量以及宏量试剂盒进行提取，提取后用 NanoDrop 2000 对质粒进行定量，再进行酶切和测序分析。

## 实验结果

**1. 不同载体的质粒产量：** 取 1mL 不同载体细菌培养液，按照 Magen 经典质粒小提试剂盒 HiPure Plasmid Micro kit(P1001C) 试剂盒操作，50ul Elution Buffer 洗脱，用 NanoDrop 2000 测 OD 值，计算出 1ml 菌液中质粒含量，计算其它产品的效率。

载体	浓度 µg/µl	A260	A280	260/ 280	产量 µg
PSP65	0.1625	3.25	1.796	1.81	8.1
PEGM-T easy	0.1136	2.27	1.176	1.93	5.5
PEGF-N1	0.2430	4.86	2.685	1.81	12.2
8K	0.1198	2.40	1.295	1.85	5.9
10K	0.0801	1.60	0.880	1.82	4.0
12K, pRU1156	0.0907	1.81	0.932	1.95	4.5

## 2. HiPure Plasmid EF Midi Kit(P1113)提取的结果：

取 100ml 不同载体的细菌培养液(每一种载体两个平行)，按照 BigBind Plasmid Midi kit 说明书操作，最后用 400ul Elution Buffer 洗脱出质粒 DNA。纯化的质粒 DNA 用 NanoDrop 2000 测 OD 值，其结果如下。

载体	浓度 µg/µl	A260	A280	260/ 280	产量 mg
PSP65	1.97	39.39	21.76	1.81	0.79
	1.878	37.56	20.30	1.85	0.75
PEGF-N1	2.827	56.55	31.42	1.8	1.13
	2.847	56.95	31.46	1.81	1.14
8K	1.125	22.5	12.36	1.82	0.45
	1.153	23.06	12.53	1.84	0.46
10K	0.979	19.58	10.58	1.85	0.39
	0.936	18.72	10.29	1.82	0.37

## 3. HiPure Plasmid EF Mega Kit(P1116)提取的结果：

取 500mL 不同载体细菌培养液，按 Plasmid Mega Kit 说明书操作，最后用 3ml Elution Buffer 洗脱出质粒 DNA，洗脱后体积为 2.5ml。纯化的质粒 DNA 用 NanoDrop 2000 测 OD 值结果如下。

载体	浓度 µg/µl	A260	A280	260/ 280	产量 mg
PSP65	1.54	30.8	16.13	1.91	3.85
PEGM-T easy	0.944	18.88	9.83	1.92	2.36
PEGF-N1	1.9424	38.85	20.23	1.92	4.856
pRU1156	0.7224	14.45	7.45	1.94	1.806

## 4. HiPure Plasmid EF Giga Kit(P1117)提取的结果：

取 1L 不同载体细菌培养液，按照 Plasmid Giga Kit 进行操作，最后用 10ml Elution Buffer 洗脱质粒 DNA。纯化的质粒 DNA 用 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher) 测 OD 值，结果如下。

载体	浓度 µg/µl	A260	A280	260/ 280	产量 mg
PSP65	0.833	16.67	8.74	1.91	7.5
PEGM-T easy	0.489	9.78	5.12	1.91	4.4
PEGF-N1	1.539	30.78	16.03	1.92	13.9
pRU1156	0.544	10.88	5.67	1.92	4.9

## 5. 不同菌液得到的质粒产量的比较。

为进一步说明，菌液扩大用量时，质粒的获得产量是否有损失，我们将得到的产量进行了比较，见下图。

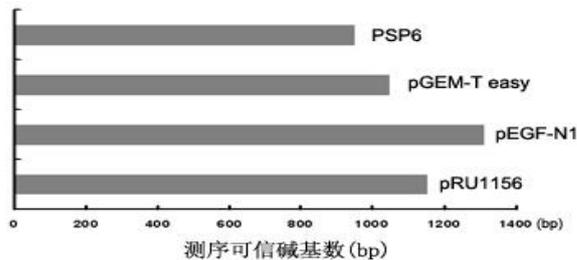
载体类型	平均每 ml 菌液用量的质粒产量 (µg)			
	常规提取	Midi Kit	Mega Kit	Giga Kit
PSP65	8.1	7.8	7.7	7.5
PEGM-T easy	5.5	/	4.7	4.4
PEGF-N1	12.2	11.5	9.71	13.9
8K	5.9	4.5	/	/
10K	4.0	3.8	/	/
pRU1156	4.5	/	3.6	4.9

## 6: 质粒的下游应用

**6.1. 酶切及电泳结果。**取上述提取得到的质粒 DNA，分别使用 EcoR I 和 Hind III (NEB) 进行单酶切。然后取酶切产物直接上样于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析，结果如下。由电泳可知，使用 BigBind Plasmid Kits 试剂盒提取得到的质粒 DNA 可直接用于酶切，酶切效果良好。



**6.2. 测序结果：**取上述提取得到的质粒 DNA，使用 ABI 3730 进行测序分析，可信的测序长段结果如下。由测序结果表明，使用 BigBind Plasmid Kits 提取得到的质粒 DNA 可直接用于测序，测序效果良好。



**6.3. 细胞转染效果** 取上述提取得到的质粒 DNA 用于细胞转染，结果表明使用该方法得到的质粒 DNA 可直接用于细胞转染（数据未显示）。使用内毒素检测试剂盒(鲎试剂动态浊度法)测量表明，该方法得到的质粒中内毒素含量是 <10EU/ug 质粒，而采用常规的方法提取的质粒中内毒素含量则 >100EU/ug 质粒 DNA。这说明 BigBind Kits 系列可高效去除内毒素。(结果未显示)

## 相关问题回答

### 1、为什么提取不到质粒或质粒得率较低

答：影响质粒产量的原因有许多。最为主要因素就是质粒的拷贝数。举例，同样属于高拷贝数的质粒载体如 pET 系列与 pEGF-N1 的产量就差异很大。如 pET-15b, 0.5L 菌液能得到约 1mg 质粒 DNA, pEGF-N1, 0.5L 菌液能得到约 4.5mg 的质粒 DNA, 产量差异达 4.5 倍。若是低拷贝数的质粒差异可能会达至 100-200 倍。其次是培养条件也是引起质粒产量的下降。菌株的不正确活化或不正确的扩大培养都会引起产量的明显下降。

### 2、为什么超大量、宏量提取时，裂解和中和如此重要？

答：影响质粒产量的另一个重要因素就是裂解和中和。由于超大量和宏量提取时，菌体用量很大，裂解和中和就会变得难于进行。加入 Solution I 时一定要充分重悬，加入 Solution II 时，颠倒次数要增加并室温静置 2-3 分钟，才能让细菌充分裂解，避免使溶液中出现结团的现象。加入 Solution III 时，颠倒次数也要增加，颠倒的力度也要比小量提取时大一些，以确保充分的中和。不充分的中和或裂解会直接影响到产量和纯度。

### 3、为什么中和后，离心时无法完全去除杂质？

答：由于菌液用量大，杂质多。离心后有些杂质无法贴紧管壁或会漂浮到溶液表面，转移上清液时就会转移到一些杂质和碎片。可进一步离心，或用滤纸过滤去除这些杂质，以得到澄清的上清液，保证纯度。

### 4、该试剂盒同一般的硅胶柱试剂盒有什么差别吗？

答：该试剂盒采用改良的硅胶膜和独特的溶液体系，这种改良硅胶膜的结合力是普通硅胶膜的 20-50 倍。