

# 简易高效的质粒制备方法

## 简介

提取质粒是分子生物学和基因工程研究中最常见的流程，随着生物学研究的发展，质粒提取向着更快更安全的方向发展。Magen 公司采用硅胶柱纯化技术，为质粒的提取提供了多种多样的解决方案，以满足科研工作者的需求。Hipure Plasmid Micro Kit(P1001C)采用小型硅胶柱纯化方式，可让科研工作者在 20 分钟内完成多个质粒的小量提取工作，纯化的质粒可满足测序，酶切，标记等各种用途，从而大大提高研究效率。为进一步验证该产品的可靠性，我们对试剂盒的最高结合力，稳定性以及各种下游应用都进行的实验研究。

## 实验方法:

操作步骤按试剂盒说明书进行。

### 1、最高结合力实验:

分别使用 1ml、2ml、3ml、4ml、5ml 携带 PEGF-N1 (Invitrogen)质粒载体的菌液进行抽提实验，检测其吸附能力。

### 2、稳定性

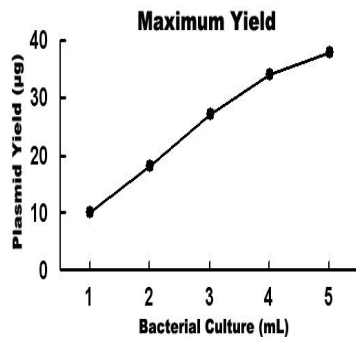
使用试剂盒抽提 48 个 2ml 携带 PEGF-N1 (Invitrogen)质粒载体的菌液样品，检测其纯度及稳定性。

3、下游应用：取纯化的质粒 DNA 进行酶切，自动测序分析。

## 实验结果

### 1、最高结合能力分析

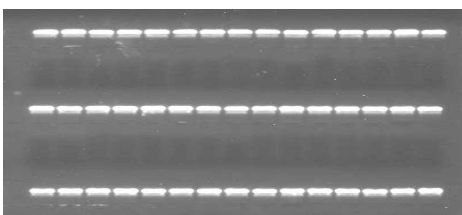
分别取 1ml、2ml、3ml、4ml、5ml 细菌培养液，用试剂盒抽提质粒。得到的质粒用 Nanodrap 2000 测得产量并统计如右图。结果表明 Magen Hipure Plasmid Mini Kit 随菌液用量增加显线性增加，达至 4-5ml 培养液时，增加变缓，由此可知 Magen Plasmid Kit I 硅胶柱的最高结合力可达至 35  $\mu\text{g}$ 。



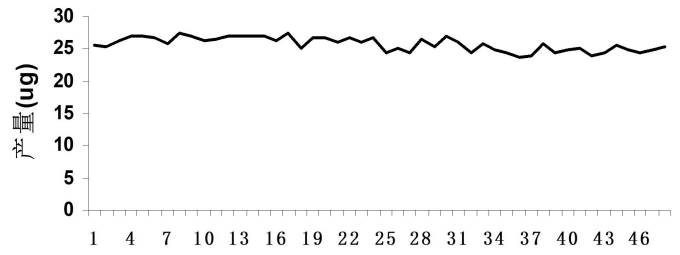
### 2、稳定性分析:

取 48 个 2ml 细菌培养液(携带 pEGF-N1)，用试剂盒抽提质粒。得到的质粒用 Nanodrap 2000 测 OD 值，根据值做出产量图和 A260/A280 A260/230 比值图，并将每个样品 3ul 上样电泳，结果如下。结果表明，使用 Hipure Plasmid Micro Kit 得到的产量和纯度都非常稳定，质粒的产量偏差不超过 10%， $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=1.81-1.92$ ， $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}=2.0-2.4$ 。

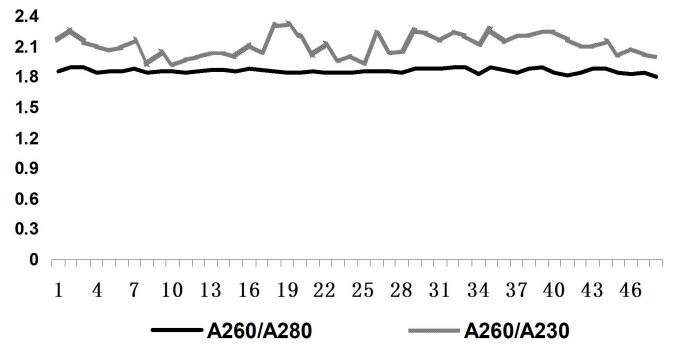
(质粒 DNA 电泳图)



(质粒 DNA 产量图)



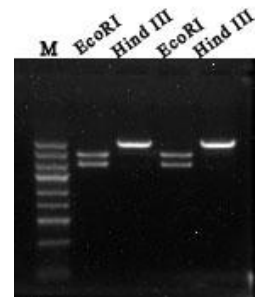
(质粒 DNA 纯度图 A260/A280、A260/A230)



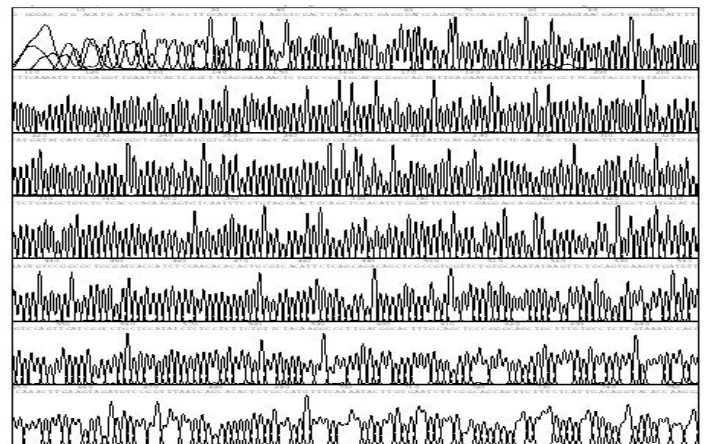
## 3、质粒的各种下游应用

### 3.1. 酶切及电泳结果。随机取方案 2

上述提取得到质粒 DNA，用 EcoR I 和 Hind III (NEB) 进行单酶切，然后取酶切产物，上样于 1.2% 琼脂糖凝胶，进行电泳分析（见右图）。M: CL5000 DNA Marker。结果表明，使用 Magen Hipure Plasmid Mini Kit 纯化的质粒酶切效果好。



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，最终可信测序长度约为 1300bp,截取部分测序图如下:



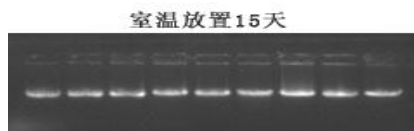
## 相关问题回答

### 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，pEGF-N1 产量就差异很大。如 Pet-15b, 1ml 菌液能得到约 2ug 质粒 DNA，pEGF-N1, 1L 菌液能得到约 10ug 的质粒 DNA，产量差异达 5 倍。若是低拷贝数的质粒差异可能会达至 100-200 倍。

### 2、该方法得到的质粒 DNA 稳定性如何？

答：将上述得到的质粒随机抽 9 个样室温放置 15 天（25℃），然后分别跑电泳，未发生降解，结果如下图：



### 3、该试剂盒稳定性如何？

答：此试剂盒溶液和柱子都经过严谨程序生产和质检。若试剂盒放置时间超过一年，我们建议重新配制 Buffer P2[0.2M NaOH, 1% SDS]，并用 Buffer GPS 平衡柱子，以提高柱子的结合效率。

### 4、通过此试剂盒抽提的质粒还需进一步纯化吗？

答：不需要，此试剂盒抽提出的质粒已是高质量、高纯质粒，无任何酶抑制剂残留，可直接用于自动测序，酶切，体外转录，标记，PCR 等下游实验。

### 5、抽提质粒出现多条带是怎么回事？

答：试剂盒抽提质粒不会引起质粒构型的改变，出现多条带是抽提前质粒本身的构型，试剂盒只是将这几个构型都回收了，很多情况下会看到 3 条带，分别是超螺旋、开环和复制中间体（即没有复制完全的两个质粒连在了一起）。如果不小心中 Buffer P2 加入后过度振荡，会有第四条带，这条带泳动得较慢，远离这三条带，是 20-100 kb 的大肠杆菌基因组 DNA 的片断。

### 6、该方法纯化得到的质粒可用于转染吗？

答：不可以，这套系统没有去除细菌内毒素步骤，细菌内毒素（Endotoxin）是革兰氏阴性菌细胞壁上特有的，它主要成分是脂多糖中的类脂 A。DNA 溶液中污染的内毒素是造成原代培养细胞转染效率低下的一个重要原因。若要抽提质粒应用于转染，需要使用 Magen Hipure Plasmid EF kit，这套系统采用独特的内毒素去除系统，能有效的去除质粒中的内毒素污染，纯化的质粒中内毒素含量小于 0.1EU/μg，可大大的提高转染实验效率。

### 7、Micro Kit 和 mini kit 有什么差别？

答：micro kit、mini kit 系统所用原理相同，不同在于 mini kit 的硅胶柱吸附能力是 micro kit 硅胶柱的两倍，因此 micro kit 适合处理 1.5-5 ml 菌液，最高产量达 35 ug，而 mini kit 可处理 5-15ml 菌液，最高产量可达 70ug。

### 8、如何提高 micro kit 的质粒产量？

答：micro kit 提取质粒产量低，主要因素是质粒的拷贝数，拷贝数低的质粒可提高菌液用量，并根据说明书的比例增加 Buffer P1、Buffer P2、Burrer P3 用量。当上清较多时，可分多次过柱。另外菌种的状态、质粒转化的过程及扩大培养的过程，都会对质粒产量有一定的影响，针对这些情况最好对质粒重新转化或重新扩大培养。

### 9、该系统能否用于提取大型质粒 DNA，如 BAC 等？

答：不建议用该系统提取 BAC/PAC/P1 等大型质粒 DNA，使用此系统不但产量低且会打断这些大分子量的质粒 DNA。建议使用 Magen Hipure BAC/PAC DNA Kit 试剂盒抽提，此系统使用了独特的结合缓冲液，能高效的回收大片段质粒 DNA 的同时，减少质粒断裂的可能性。

### 10、micro kit 洗脱体积与浓度的关系是如何的？

答：3ml 携带 Pegfpn-3 质粒的 DH5 α 过夜培养液，按照 Magen Hipure Plasmid Micro kit 提供标准方案进行纯化，洗脱体积为 20、40、60、80、100、120、140、160、180、200ul。每个数值点位三个平行的平均值。增大系统体积可以增加质粒的回收率，但所得质粒的浓度有所下降。

洗脱体积与浓度的关系图

