

一、质粒 DNA 的提取、分离和纯化

质粒(Plasmid)存在于细菌染色体外的能够独立进行复制,为双链、闭合环状 DNA 分子,并以超螺旋状态存在于宿主细胞中。质粒不是细菌生命活动所必需的物质,但它赋予宿主细胞各种有利的表型,比如质粒可以带有抗生素的抗性基因。载体是将 DNA 片段(目的基因)转移至受体细胞的一种能自我复制的 DNA 分子。质粒载体是在天然质粒的基础上为适应实验室操作而进行人工构建的。与天然质粒相比,质粒载体通常带有一个或一个以上的选择性标记基因(如抗生素抗性基因)和一个人工合成的含有多个限制性内切酶识别位点的多克隆位点序列,并去掉了大部分非必需序列,使分子量尽可能减少,以便于基因工程操作。大多质粒载体带有一些多用途的辅助序列,这些用途包括通过组织化学方法肉眼鉴定重组克隆、产生用于序列测定的单链 DNA、体外转录外源 DNA 序列、鉴定片段的插入方向、外源基因的大量表达等。

1. 质粒与载体

1.1 质粒与载体的基本知识

1.1.1 质粒

(1)质粒的定义

质粒(Plasmid)存在于细菌染色体外的能够独立进行复制,为双链、闭合环状 DNA 分子,并以超螺旋状态存在于宿主细胞中。它具有自主的复制和转录系统,但质粒的复制和转录需要宿主细胞编码的某些酶和蛋白质。质粒不是细菌生命活动所必需的物质,赋予宿主细胞各种有利的表型,比如质粒可以带有抗生素的抗性基因,例如,四环素抗性基因或卡那霉素抗性基因等,含有这样质粒的细菌就具有了相应抗生素抗性能力。

(2)质粒的基本特征

①质粒的复制子

质粒 DNA 中能自主复制并维持正常拷贝数的一段最小的核酸序列单位。复制子包括 DNA 复制起点及其相关的调控元件。在质粒中已鉴定出的复制子已超过 30 个。不同的质粒携带的复制子的类型决定了该质粒在细菌中的拷贝数:紧密控制型(stringent control)和松弛控制型(relaxed control)。前者只在细胞周期的一定阶段进行复制,通常每个细胞内只含有一个或几个质粒分子;后者在整个细胞周期中随时可以复制,在每个细胞中有许多拷贝,一般在 20 个以上。

②质粒宿主范围

质粒宿主范围由其复制子决定。有的复制子,如 Col E1 有严格的宿主范围:它们只能在肠细菌(如大肠杆菌、沙门氏菌等)中复制。而其他的混杂质粒则有广阔的宿主范围,包括 RP40。对于广宿主范围的质粒而言,复制所需的蛋白质大部分是自己编码,在进化过程中,它们的启动子和核糖体结合位点变得可以为多种细菌家族所识别。

③质粒不相容性

利用同一复制系统的两个质粒会在复制和随后向子细胞的分配过程中彼此竞争,这样的

质粒在细菌培养物中不能共处。这种现象称之为不相容性。携带相同复制子的质粒是从细胞内的质粒库中随机选取出来进行复制的,而通常这种随机复制是不均衡的,由此导致其中一种质粒占据绝对优势,在无选择条件下,细菌生长几代后,占少数的质粒可能在菌落的某些细胞中丧失殆尽。但利用不同复制系统的不同质粒可在同一宿主细胞中共同存在。

④质粒的存在形式

共价闭环质粒以超螺旋形式存在。在提取质粒过程中,除了超螺旋 DNA 外,还会产生其它形式的质粒 DNA。如果质粒 DNA 两条链中有一条链发生一处或多处断裂,分子就能旋转而消除链的张力,形成松弛型的环状分子,称开环 DNA (Open circular DNA, 简称 ocDNA); 如果质粒 DNA 的两条链在同一处断裂,则形成线状 DNA (Linear DNA)。当提取的质粒 DNA 电泳时,同一质粒 DNA 其超螺旋形式的泳动速度要比开环和线状分子的泳动速度快。

1.1.2 载体

(1)载体的定义

载体是将 DNA 片段(目的基因)转移至受体细胞的一种能自我复制的 DNA 分子。经过人工构建的载体,不但能与外源基因相连接,导入受体细胞,还能利用本身的调控系统,使外源基因在新细胞中复制以致功能的表达。

(2)载体的类型

载体的类型有质粒(plasmid)、 λ 噬菌体(λ phage)、Cosmid、YAC、BAC 等,其中细菌质粒是重组 DNA 技术中最常见的载体。

(3)质粒载体的特征

质粒载体是在天然质粒的基础上为适应实验室操作而进行人工构建的,其基本特性

- ①. 分子量小、多拷贝、松弛控制型
- ②. 具有多种常用的限制性内切酶的单切点
- ③. 能插入较大的外源 DNA 片段
- ④. 具有容易操作的检测表型

(4)质粒载体的结构

以 pBluescript SK-载体为例

- ①ColE1 origin : 源自质粒 pUC18 的 ColE1 复制子
- ②Ampicillin: 氨苄青霉素抗性基因
- ③Fi origin
- ④MCS (多克隆位点): 外源基因插入区
- ⑤LacZ: 筛选基因

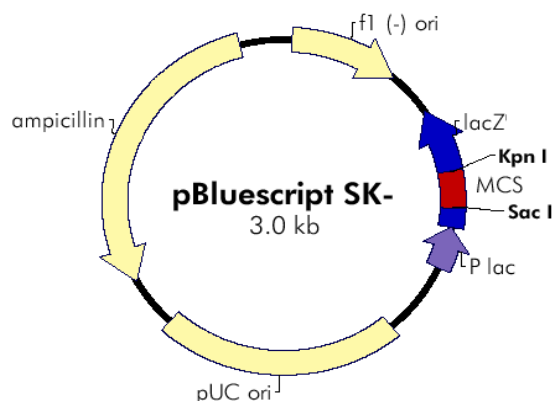


图 1.1 质粒载体 pBluescript SK- 结构图（图片摘自 geneservice 公司网站 http://www.geneservice.co.uk/products/cdna/datasheets/Dros_cDNA/clones.jsp）

1.2. 质粒 DNA 的制备基本原理：

1.2.1 从细胞中分离质粒 DNA 的方法都包括 3 个基本步骤：

(1). 培养细菌使质粒扩增

(2). 收集和裂解细胞

细菌的收获通过离心来进行，而细菌的裂解可采用多种方法。选择方法主要依据于三方面因素：质粒的大小、大肠杆菌菌株和裂解后用于纯化质粒 DNA 的技术。当质粒大于 15kb 时，在细胞裂解中容易受损，故采用温和裂解法从细胞中释放出来。将细菌悬于等渗溶液中，用溶菌酶和 EDTA 进行处理，破坏细胞壁，然后加入 SDS 等去污剂裂解球形体。当高分子质量的 DNA 分子（>100kb）很容易被机械剪切力打断，所以在提取过程中要分外小心，比如要轻轻晃动溶液，用大的移液器转移溶液以防剪切力等；当质粒小于 15kb 时，可用较剧烈的方法。让细菌溶解物悬于去污剂中，通过煮沸或碱处理使之裂解。

(3). 分离和纯化质粒 DNA

将共价闭合环状质粒 DNA 与污染的细菌 DNA 片段分开的经典方法是 Cs-Cl-溴化乙锭梯度密度离心。由于溴化乙锭与线状以及与闭环 DNA 分子的结合量有所不同溴化乙锭通过嵌入碱基之间而与 DNA 结合，进而使双螺旋解旋。由此导致线状 DNA 的长度有所增加，作为补偿，将在闭环质粒 DNA 中引入超螺旋单位。最后，超螺旋度大为增加，从而阻止了溴化乙锭分子的继续嵌入。但线状分子不受此限，可继续结合更多溴化乙锭，直至达到饱和（每 2 个碱基对大约结合 1 个溴化乙锭分子）。由于染料的结合量有所差别，线状和闭环 DNA 分子在含有饱和量溴化乙锭的氯化铯度中的浮力密度也有所不同。

1.2.2 碱裂解法制备质粒 DNA 原理

碱裂解法制备质粒 DNA 是目前实验室小量制备质粒最简便、最常用的方法，其原理是将细菌悬浮液暴露于高 pH 值得强阴离子洗涤剂中，会使细胞壁破裂，染色体 DNA 和蛋白质会变性，缠绕附着在细胞碎片上，将质粒 DNA 释放到上清中。尽管碱性溶剂使碱基配对完全破坏，但共价闭合环状 DNA（covalently closed circular DNA，简称 cccDNA）的二条链不会相互分开，当 pH 恢复到中性时，线状染色体 DNA 片段难以复性，而与变性的蛋白质和细胞

碎片缠绕在一起，而质粒 DNA 双链又恢复原状，重新形成天然的超螺旋分子，并以溶解状态存在于液相中。在裂解过程中，细菌蛋白质、破裂的细胞壁和变性的染色体 DNA 会相互缠绕成大型复合物，后者被十二烷基硫酸盐包盖。当用钾离子取代钠离子时，这些复合物会从溶液中有用地沉淀出来。离心去除变形剂后，就可以从上清中回收复性的质粒 DNA。

2. 试剂

- A. LB 液体培养基 (L): 蛋白胨 (tryptone) 1g, 酵母提取物 (yeast extract) 0.5g, NaCl 1g, 用 NaOH 调至 pH7.2-7.5。高压下蒸汽灭菌 15 分钟。配置抗性培养基时需按照抗生素母液浓度与工作浓度的比例添加抗生素。抗生素浓度见后表。
- B. LB 固体培养基 (L): 每升 LB 液体培养基加 1.8g 琼脂粉，高压下蒸汽灭菌 15 分钟。配置抗性平板时需按照抗生素母液浓度与工作浓度的比例添加抗生素。在融化的固体培养基的温度降至 65℃时，加入适量抗生素，迅速倒板。
- C. 溶液 I: 50mmol/L 葡萄糖、25mmol/L Tris-Cl (pH8.0), 10mmol/L EDTA (pH8.0)。高压蒸汽灭菌 15 分钟，储存于 4℃冰箱。
- D. 溶液 II: 分别配制 0.4mol/L NaOH, 2%SDS (W/V)，临用前将两种溶液等体积混匀。
- E. 溶液 III: 5mol/L KAC 60ml, 冰醋酸 11.5ml, 水 28.5ml。
- F. RNase A 母液: 将 RNase A 酶粉溶于 10mmol/L TrisCl (pH7.5)、15mmol/L NaCl, 终浓度为 10mg/ml。100℃加热 15 分钟，冷却后分装。
- G. 饱和酚: 市售酚需重蒸。重蒸后加 0.1%8-羟基喹啉，并用等体积的 0.5mol/L TrisCl (pH8.0) 和 0.1mol/L TrisCl (pH8.0) 缓冲液反复抽提，使 pH 达到 7.6 以上。
- H. 酚/氯仿: 将上述饱和酚和氯仿按 1:1 混合。
- I. 氯仿: 按氯仿/异戊醇=24:1 混合。
- J. 异丙醇
- K. 常用抗生素浓度表

抗生素	溶剂	储存液浓度 (mg/ml)	保存条件	工作浓度 (ug/ml)	
				严谨型质粒	松弛型质粒
氨苄青霉素	水	50	-20℃	20	60
羧苄青霉素	水	50	-20℃	20	60
氯霉素	乙醇	34	-20℃	25	170
卡那霉素	水	50	-20℃	10	50
链霉素	水	50	-20℃	10	50
四环素	乙醇	10	-20℃	10	50
庆大霉素	水	50	-20℃	10	50

3. 操作步骤

3.1 质粒 DNA 的少量快速提取——碱裂解法

- A. 取 1.5ml 培养液倒入 1.5ml ependorf 管中，6000rpm for 3min，彻底去除上清，在

沉淀中加入放置在冰箱的溶液 I 100ul，充分悬浮；

B. 加入 200ul 直接配制的溶液 II（取干净 1.5ml ependorf 管，在 ependorf 管中等体积加入 0.4mol/LNaOH，2%SDS，充分混匀），小心摇匀，不要震荡，于冰浴放置 5min；

C. 加入 150ul 冰冷的溶液 III，小心摇匀，不要震荡，于冰浴放置 5min；

D. 4℃，12000rpm for 10min，确保沉淀完全和致密；小心吸取 350-400ul 上清转到一干净的 Epp 管内；特别注意不要将沉淀带出；

E. 加 400ul 酚-氯仿（取干净 1.5ml ependorf 管，在 ependorf 管中等体积加入酚和氯仿，充分混匀），震荡混匀，12000rpm for 5min；小心吸取上清转到一干净的 Epp 管内，注意不要将酚、氯仿、以及水相和有机相界面上的蛋白沉淀层或吸出；

F. 加 300ul 氯仿，充分震荡混合均匀，12000rpm for 5min；小心吸取上清转到一干净的 Epp 管内，注意不要将氯仿吸出；

G. 加入 2 倍体积冰冷的无水酒精，轻轻摇动数次后冰浴 5min 以沉淀 DNA；也可以直接放到-20℃保持 30min 至过夜；

H. 离心 12000rpm，4℃for 5min；倾去上清，加入 1ml 冰冷的 70%酒精，颠倒离心管以漂洗沉淀；

I. 离心 12000rpm，4℃for 5min；倾去酒精，常温将 DNA 沉淀放入通风橱中 5-10 分钟以干燥沉淀；

J. 在 DNA 沉淀中加入 30-50ul[含 1% Rnase]的无菌水或者 TE，轻轻用枪头吹打沉淀以溶解 DNA，室温放置半小时，即可酶切和 PCR 鉴定。

附：质粒的小量制备方法中，如果所得的质粒量不够，可以将菌液及溶液 I、II、III 按等比例增加，以得到足量的质粒。

3.2 提取大分子量的质粒

以 Bacmid 的提取为例，Bacmid 为杆状病毒人工染色体，能以质粒形式存在于细菌中，其分子大于 100kb

A. 取 1.5ml 培养液倒入 1.5ml ependorf 管中，6000rpm for 3min，彻底去除上清，在沉淀中加入放置在冰箱的溶液 I（15mM Tris-HCl, pH8.0，10mM EDTA，100ug/ml RNase A；过滤灭菌）300ul，温和的悬浮细胞；

B. 加入 300ul 直接配制的溶液 II（取干净 1.5ml ependorf 管，在 ependorf 管中等体积加入 0.4mol/LNaOH，2%SDS，充分混匀），温和摇匀，室温放置 5min（悬浮液会从混浊变为透明）；

C. 缓慢的加入 300ul 冰冷的溶液 III，边加边温和的摇匀，于冰浴放置 5 至 10min；

D. 4℃，12000rpm for 10min，确保沉淀完全和致密；将上清转到一干净的 Epp 管内；特别注意不要将沉淀吸出；

E. 加 800ul 酚-氯仿（取干净 1.5ml ependorf 管，在 ependorf 管中等体积加入酚和氯仿，充分混匀），轻柔混匀，12000rpm for 5min；小心吸取上清转到一干净的 Epp 管内，注意不要将酚、氯仿、以及水相和有机相界面上的蛋白沉淀层或吸出；

F. 加 800ul 氯仿，轻柔混匀，12000rpm for 5min；小心吸取上清转到一干净的 Epp 管

内，注意不要将氯仿吸出；

G. 加入 800ul 异丙醇，轻轻摇动数次后冰浴 5 至 10min 以沉淀 DNA；也可以直接放到-20℃保持 30min 至过夜；

H. 离心 12000rpm，4℃for 10min；仔细的移去上清，不要触动到沉淀，加入 1ml 冰冷的 70%酒精，颠倒离心管以漂洗沉淀；

I. 离心 12000rpm，4℃for 5min；尽可能多的倾去酒精，不要触动到沉淀，常温将 DNA 沉淀放入通风橱中 5-10 分钟以干燥沉淀，注意不要干燥过度；

J. 在 DNA 沉淀中加入 30-50ul 的无菌水 or TE，为防止 Bacmid 发生剪断，不要机械震荡，偶尔的轻轻弹离心管底部。

K. 将 Bacmid 在 4℃保存（为防止反复冻融导致 DNA 的降解，避免在-20℃下保存）。

附：1）. 提取过程中应尽量保持低温。

2）. 加入溶液 II 和溶液 III 后操作应混和,切忌剧烈振荡，以免造成基因组震断。

4. 常见问题及对策

问题	原因	解决
未提质粒或得率很低	菌液老化	重新划线，挑斑培养
	菌液浓度过高，或者菌体量太大导致裂解不充分	取适量菌液，对拷贝数低的质粒可按比例增加 3 种溶液的量
	裂解溶液变质	溶液 2 中不能出现沉淀，溶液 3 要 4℃封闭保存以免酸碱度发生变化
	菌体中无质粒（在连接产物转化后挑的克隆中有可能出现）	重新转化，挑斑
质粒中混有杂质	有蛋白杂质（量大的话，在质粒溶解后，仍会有白色不溶性沉淀，即为蛋白杂质；量小的话，通常会影响后续酶切）	不要使用过多菌体；菌体裂解后吸取上清时不能混入白色沉淀；酚-氯仿抽提时，不要吸到有机-无机分层处的白色沉淀
	有基因组杂质（质粒电泳时在点样空附近出现条带）	加入溶液 2，3 时轻柔混匀，避免将基因组震碎；溶液 2，3 加入后都不要放置超过 5 分钟
	混有 RNA 杂质（质粒电泳时在凝胶的最前端出现亮带）	用含有 100ug/ml 的 RNase 的双蒸水溶解质粒后室温消化半小时
不能完全酶切	混有杂质	参照上述内容

	乙醇残留	质粒沉淀在通风橱中放置 5~8 分钟，观察无乙醇残留后再加 RNase 溶液溶解
	Tris-EDTA 溶液可能会影响酶切（EDTA 能螯合二价金属离子，会影响内切酶活性）	用双蒸水溶解质粒

参考资料：

- [1]J 萨姆布鲁克,D W 拉塞尔著. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 分子克隆实验指南[M] . 第 3 版. 北京:科学出版社, 2002 , 8187 - 96.
- [2]卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M] . 北京:中国协和医科大学出版社, 1999 , 121290 - 293.
- [3]Invitrogen 公司的 protocol Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System