

浅谈质粒抽提试剂盒基本原理

碱裂解法从大肠杆菌中制备质粒，是每个分子生物学实验室都要用到的常规技术，但是大家对碱法抽提质粒的原理知之甚少。

一、碱法抽提质粒用到的三种溶液及硅酸纤维膜（超滤柱）

溶液 I：50 mM 葡萄糖 / 25 mM Tris-Cl / 10 mM EDTA, pH 8.0;

溶液 II：0.2 N NaOH / 1% SDS;

溶液 III：3 M 醋酸钾 / 2 M 醋酸 / 75% 酒精。

二、溶液I中各成分的作用

葡萄糖是使悬浮后的大肠杆菌不会快速沉积到管子的底部，因此有些试剂厂商的溶液I没有葡萄糖成分；EDTA是 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 等二价金属离子的螯合剂，其主要目的是为了螯合二价金属离子从而达到抑制DNase的活性。

三、溶液II中各成分的作用

NaOH主要是为了溶解细胞，释放DNA，因为在强碱性的情况下，细胞膜发生了从bilayer（双层膜）结构向micelle（微囊）结构的变化；但NaOH易和空气中的 CO_2 发生反应，形成碳酸钠，降低了NaOH的碱性，所以必须用新鲜的NaOH。SDS与NaOH联用，其目的是为了增强NaOH的强碱性，同时SDS能很好地结合蛋白，产生沉淀。这一步要记住两点：第一，时间不能过长，因为在这样的碱性条件下基因组DNA片断会慢慢断裂；第二，必须温柔混合，不然基因组DNA会断裂。

四、溶液 III 中各成分的作用

溶液 III 中的醋酸钾是为了使钾离子置换 SDS 中的钠离子而形成了 PDS，因为十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate)遇到钾离子后变成了十二烷基硫酸钾 (potassium dodecylsulfate, PDS)，而 PDS 是不溶水的，同时一个 SDS 分子平均结合两个氨基酸，钾钠离子置换所产生的大量沉淀自然就将绝大部分蛋白质沉淀了。2 M 的醋酸是为了中和 NaOH，因为长时间的碱性条件会打断 DNA，所以要中和。基因组 DNA 一旦发生断裂，只要是 50—100 kb 大小的片断，就没有办法再被 PDS 共沉淀了，所以碱处理的时间要短，而且不得激烈振荡，不然最后得到的质粒上总会有大

量的基因组 DNA 混入，琼脂糖电泳可以观察到一条浓浓的总 DNA 条带。75%酒精主要是为了清洗盐份和抑制 Dnase；同时溶液 III 的强酸性也是为了使 DNA 更好地结合在硅胶纤维膜上。

得到的质粒样品一般用含 RNase (50 ug/ml) 的 TE 缓冲液进行溶解，不然大量未降解的 RNA 会干扰电泳结果的。琼脂糖电泳进行鉴定质粒 DNA 时，多数情况下你能看到三条带，但千万不要认为你看到的是超螺旋、线性和开环这三条带。碱法抽提得到质粒样品中不含线性 DNA，不信的话你用 EcoRI 来线性化质粒后再进行琼脂糖电泳，就会看到线性质粒 DNA 的位置与这三条带的位置不一样。其实这三条带以电泳速度的快慢而排序，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）。如果你不小心在溶液 II 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。



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：54460832 800-988-1995

E-mail:master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

