



质粒DNA的小量提取

碱裂解法

南昌大学生物学实验教学中心 汪艳璐

实验目的

学习和掌握碱裂解法提取质粒**DNA**

实验原理

碱裂解法是根据共价闭合环状质粒**DNA**与线性染色体**DNA**的变性与复性的差异达到分离的目的。

在强碱性条件下，染色体**DNA**的氢键断裂，双螺旋结构解开而变性，质粒**DNA**大部分氢键也断裂，但超螺旋共价闭合环状的两条互补链不会完全分离，彼此互相盘绕，仍会紧密地结合在一起。当将pH调到中性并有高浓度盐存在时，变性质粒**DNA**又回复到原来的结构保存在溶液中，而染色体**DNA**不能复性，相互缠绕形成不溶性网状结构。通过离心，染色体**DNA**与不稳定的大分子**DNA**，蛋白质-**SDS**复合物等一起沉淀下来而被除去。提取的质粒**DNA**再用酚、氯仿抽提进一步纯化。

实验材料与试剂

1、实验材料

菌种：含质粒**PET28a**的大肠杆菌

2、实验试剂

1) 溶液I:

50mmol/L 葡萄糖溶液

25mmol/L Tris-Cl (pH8.0)

10mmol/L EDTA (pH8.0)

2) 溶液II: 0.4mol/L NaOH, 2%SDS

用前两者等体积混合，需新鲜配制

3) 溶液III:3mol/L的乙酸钾 (pH4.8)

3mol/L乙酸钾 60ml

冰乙酸 11.5ml

水 28.5ml

4) 酚/氯仿试剂:

V (酚) : V (氯仿, 含1/24异戊醇) =1:1

5) TE缓冲液

10mmol/L Tris-Cl (pH7.4-8.0)

1mmol/L EDTA (pH8.0)

6) LB培养基

蛋白胨 10g

酵母浸出粉 5g

NaCl 10g

溶解在1L水中, 调pH至7.2, 121°C高压蒸汽灭菌20min。

7) 氨苄青霉素 (Amp) : 使用浓度为50-100ug/ml

实验器材

- 1、Eppendorf管
- 2、移液器
- 3、恒温培养箱
- 4、低温高速离心机

操作步骤

1、菌种培养

将含**PET28a**的大肠杆菌接种于**LB**（含**Amp**）中，**37°C**振荡培养过夜。

2、质粒提取

- 1) 取1.5ml培养液倒入Eppendorf管中，8000rpm，离心5min。
- 2) 弃上清，使细胞沉淀尽可能干燥。
- 3) 将菌体沉淀悬浮于100ul溶液I中，用涡旋振荡器振荡1min，置冰浴10min。
- 4) 加200ul溶液II，盖紧管口，快速来回颠倒3次，使内容物充分混合，不要振荡，至冰浴中3min。
- 5) 加150ul溶液III（冰上预冷），盖紧管口，颠倒数次并轻轻振荡混匀，冰浴5min。

- 6) 4°C, 12000rpm, 离心5min, 将上清液移入另一Eppendorf管中。
- 7) 向上清液中加入等体积酚/氯仿 (1:1), 用涡旋振荡器振荡1-2min, 10000rpm, 离心2min, 将上清液移入另一Eppendorf管中。
- 8) 加入等体积氯仿, 重复上面的操作。
- 9) 加入1/10体积的3mol/L氯化钠, 再加2倍体积的无水乙醇, 混匀后室温放置5min, 4°C, 12000rpm, 离心15min, 弃上清, 将Eppendorf管倒扣在吸水纸上, 吸干液体。
- 10) 加1ml70%乙醇振荡漂洗沉淀, 12000rpm, 离心2min, 弃上清。
- 11) 将Eppendorf管倒扣在吸水纸上, 使乙醇流尽, 空气中干燥。
- 12) 加10ulTE缓冲液, -20°C保存。

注意事项

- 1、加入溶液Ⅱ后快速来回颠倒，不要振荡。
- 2、加入溶液Ⅲ后轻轻振荡。
- 3、吸取上清时切勿吸到中间层。

思考题

- 1、溶液I、II、III的作用分别是什么？
- 2、为什么加入溶液II后不要振荡？