

质粒 DNA 的提取与琼脂糖凝胶电泳

1 实验目的

掌握碱裂解法提取质粒的原理和方法，掌握琼脂糖凝胶电泳分离鉴定 DNA 的原理和方法。

2 实验原理

2.1 质粒

质粒(plasmid)是在细菌中以独立于染色体之外的方式存在，是细菌染色体外的小型双链环状 DNA 复制子。质粒的大小不定，小的不到 1 kb，大的超过 500 kb，每个质粒都有一段 DNA 复制起始点的序列，它帮助质粒 DNA 在宿主细胞中复制。对细菌的某些代谢活动和耐药性表型具有一定的作用。目前，已发现有质粒的细菌有几百种，已知的绝大多数的细菌质粒都是闭合环状 DNA 分子(简称 cccDNA)。细菌质粒的相对分子质量一般较小，约为细菌染色体的 0.5%~3%。根据相对分子质量的大小，大致上可以把质粒分成大小两类：较大一类的相对分子质量是 40×10^6 以上，较小一类的相对分子质量是 10×10^6 以下(少数质粒的相对分子质量介于两者之间)。每个细胞中的质粒数主要决定于质粒本身的复制特性。按照复制性质，可以把质粒分为两类：一类是严紧型质粒，当细胞染色体复制一次时，质粒也复制一次，每个细胞内只有 1~2 个质粒；另一类是松弛型质粒，当染色体复制停止后仍然能继续复制，每一个细胞内一般有 20 个左右质粒。一般分子量较大的质粒属严紧型。分子量较小的质粒属松弛型。质粒的复制有时和它们的宿主细胞有关，某些质粒在大肠杆菌内的复制属严紧型，而在变形杆菌内则属松弛型。在基因工程中，常用人工构建的质粒作为载体。人工构建的质粒可以集多种有用的特征于一体，如含多种单一酶切位点、抗生素耐药性等。常用的人工质粒运载体有 pBR322、pSC101。pBR322 含有抗四环素基因(Tc^r)和抗氨苄青霉素基因(Amp^r)，并含有 5 种内切酶的单一切点。如果将 DNA 片段插入 *EcoRI* 切点，不会影响两个抗生素基因的表达。但是如果将 DNA 片段插入到 *HindIII*、

*Bam*HI 或 *Sal*I 切点, 就会使抗四环素基因失活。这时, 含有 DNA 插入片段的 pBR322 将使宿主细菌抗氨苄青霉素, 但对四环素敏感。没有 DNA 插入片段的 pBR322 会使宿主细菌既抗氨苄青霉素又抗四环素, 而没有 pBR322 质粒的细菌将对氨苄青霉素和四环素都敏感。pSC101 与 pBR322 相似, 只是没有抗氨苄青霉素基因和 *Pst*I 切点。质粒运载体的最大插入片段约为 10 kb(kb 表示为千碱基对)。

应用质粒作为基因克隆的载体分子, 携带外源基因进入细菌体内进行扩增或表达, 一个重要前提条件是要获得批量纯化的质粒 DNA 分子。质粒的提取方法很多, 大多包括 3 个主要步骤: 细菌的培养、细菌的收集和裂解。在质粒 DNA 的分离和纯化过程中, 毫无疑问, 宿主细胞的裂解是分离质粒 DNA 实验操作的关键步骤。常用的质粒 DNA 分离方法有 3 种: 碱裂解法、煮沸法和去污剂裂解法。前两种方法比较剧烈, 它们可以破坏碱基配对, 使宿主细胞的线性染色体 DNA 变性, 而共价闭合环状 DNA 由于拓扑缠绕, 两条链不会互相分离。当外界条件恢复正常时, 质粒的 DNA 双链又迅速恢复原状, 重新形成天然的超螺旋分子, 其大小范围在 1KB 至 200kb 以上不等。所以, 质粒 DNA 提取与纯化是最基本的分子生物学实验技术, 其中, 碱裂解法提取的质粒产量高、纯度好, 是一种最为常用的方法。

2.2 碱裂解法

碱裂解法提取质粒的实验原理是在 pH 12.0 ~ 12.6 碱性环境中, 细菌的线性大分子量染色体 DNA 变性分开, 而共价闭环的质粒 DNA 虽然变性但仍处于拓扑缠绕状态。将 pH 调至中性并有高盐存在及低温的条件下, 大部分染色体 DNA、大分子量的 RNA 和蛋白质在去污剂 SDS 的作用下形成沉淀, 而质粒 DNA 仍然为可溶状态。通过离心, 可除去大部分细胞碎片、染色体 DNA、RNA 及蛋白质, 质粒 DNA 尚在上清中, 收集上清即可得到富集的质粒 DNA。

近年来, 随着基因治疗和 DNA 疫苗的发展, 质粒逐渐成为一种新型的生物大分子医药产品, 药用质粒的大规模制备成为生物下游过程的重要研究课题。

采用此碱裂解法制备高拷贝数质粒(如 pUC 系列)时, 质粒 DNA 的产量通常约为 3~5 $\mu\text{g/ml}$ 菌液。随着生化技术的发展, 市场上出现了商品化的试剂盒

用于提取及纯化质粒，有些试剂盒采用了传统的 SDS 碱裂解法，结合 DNA 制备膜技术，具有高效、快速、方便之特点。还有些试剂盒利用层析的原理纯化质粒 DNA，DNA 分子中磷酸二酯链骨架在高盐作用下脱水，使得暴露的磷酸基团吸附硅胶，经水溶性缓冲液重新水化后，DNA 能从层析柱上回收。大多数试剂盒分离纯化的原理为先使经过分离的质粒 DNA 吸附在柱或膜上，然后常规用乙醇洗涤，最后用水将吸附在柱上或膜上的 DNA 用水溶解下来。本实验中采用的试剂盒为 TIANGEN 快速质粒小提试剂盒。

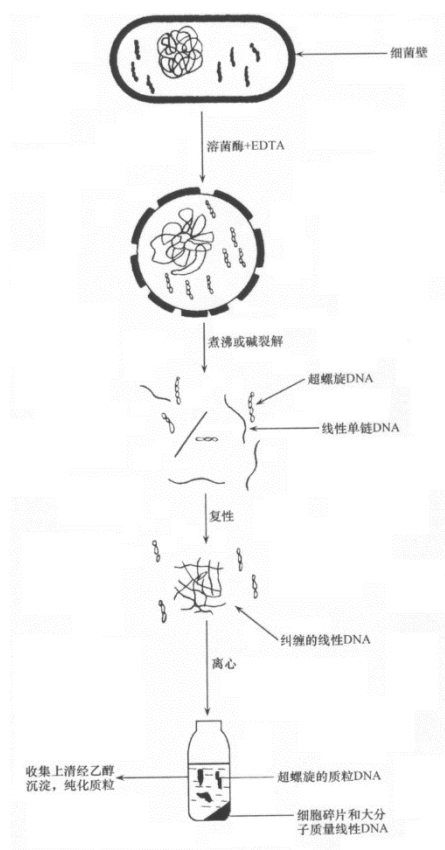


图 1 质粒 DNA 制备原理

2.3 凝胶电泳

电泳技术是分离、纯化 DNA 和鉴定 DNA 大小的重要方法。生物大分子如核酸、蛋白质、多糖等，在一定的 pH 条件下，可以解离成带电荷的离子。在电场中这些带电荷的离子，可以根据电荷的性质向正极或负极移动。这种带电荷物质在电场中向其相反电极泳动的现象称为电泳。在电泳过程中通常要考虑泳动率，泳动率又称迁移率，是指带电荷颗粒单位时间荷单位电场强度下，在电泳介质中

泳动的距离。泳动率与样品分子荷电密度、电场中电压及电流成正比，与样品的分子大小、电泳介质黏度与电阻成反比。不同大小的带电分子具有不同的泳动率。不同的电泳介质具有对样品不同的分辨效果。在进行核酸电泳时，注意 DNA 分子的构象，在分子质量相同时，以高度超螺旋的 DNA 泳动速度最快，随着超螺旋程度降低，相应 DNA 泳动速度依次变慢，最慢者为线状双链 DNA。在通常情况下，线状 DNA 分子在一定浓度琼脂糖介质中泳动的速度与其分子质量的对数成反比。因此，利用 DNA 分子长度 (bp) 的负对数与泳动距离作图，对于 DNA 片断分子质量测定方便而准确。缓冲液是电场中的导体，其种类、pH 及离子强度会直接影响电泳效果。通常要选择缓冲离子泳动速度应和样品的泳动速度一致，否则会引起带型不均一或不对称峰的出现。在分离核酸时，常选用较高的 pH 值，使样品带负电荷，在电场中向正极泳动。以电泳支持介质主要可以分为聚丙烯酰胺和琼脂糖凝胶，以电泳方式可以分成垂直型和水平型。一般来说，聚丙烯酰胺凝胶电泳用来分离较短的核酸片断 (5~500 bp)，分辨率高于琼脂糖凝胶电泳，而后者多用于 0.1~60 kb 的较大核酸片断。垂直型电泳装置分离效果比水平型略好，多用于聚丙烯酰胺凝胶电泳。水平型电泳几乎为所有的琼脂糖电泳所采用，其优点是灌胶、制板及加样等操作都较为方便且不会因机械压力引起低浓度凝胶的破裂。

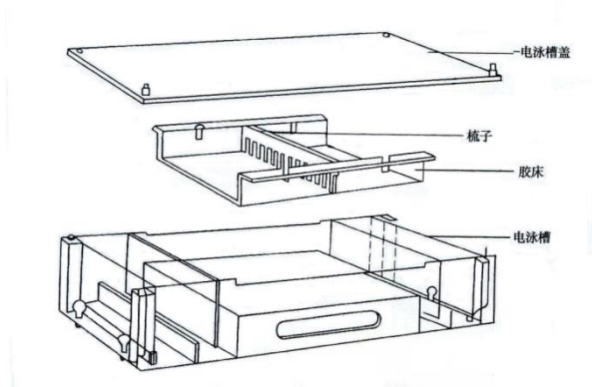


图 2 水平电泳装置结构示意图

琼脂糖凝胶电泳是分离、鉴定和纯化 DNA 片段的标准方法。该技术操作简便、快速，分离范围较广，用各种浓度的琼脂糖凝胶可以分离长度为 200 bp 至 50 kb 的 DNA。

琼脂糖是从海藻中提取出来的一种线型高聚物。琼脂糖凝胶的制备是将琼脂糖在所需缓冲液中融化形成清澈、透明的溶液，然后将溶液倒入胶模中，令其凝

凝固后，琼脂糖形成一种固体基质，其密度取决于琼脂糖的浓度。在外加电场作用下，带负电荷的 DNA 分子向阳极迁移，迁移速率由以下参数决定：①DNA 的分子大小；②琼脂糖浓度；③DNA 的构象；④所加电压；⑤电场方向；⑥碱基组成与温度；⑦嵌入染料的存在；⑧电泳缓冲液的组成。DNA 在琼脂糖凝胶中的电泳行为受 DNA 的碱基组成或凝胶电泳温度的影响不明显，琼脂糖凝胶电泳一般在室温下进行。琼脂糖浓度和所加电压对迁移速率的影响比较值得注意。一个给定大小的线状 DNA 片段，其迁移速率在不同浓度的琼脂糖中各不相同，采用不同浓度的凝胶有可能分辨长度范围广泛的 DNA 分子。在低电压时，线状 DNA 片段的迁移速率与所加电压成正比。但是，随着电场强度的增大，高分子量 DNA 片段的迁移率将以不同的幅度增长。因此，随着电压的增大，琼脂糖凝胶的有效分离范围缩小。

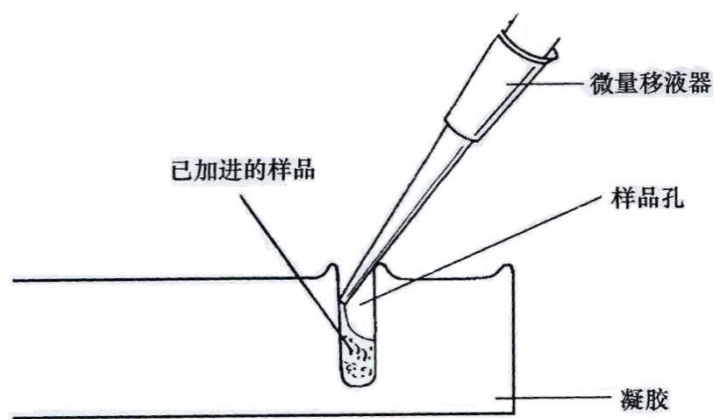


图 3 电泳上样示意图

样品经电泳后形成的条带必须经过染色后才能被显示出，以进行分析和检测。观察琼脂糖凝胶中 DNA 的最简便方法是利用荧光染料进行染色。荧光物质含有一个可以嵌入 DNA 碱基之间的平面基团，DNA 与之结合后在紫外线照射下呈现荧光。

实验室中最常用的荧光染料是溴化乙锭 (EB)。其原理是在紫外线照射时，核酸的吸收波长为 254 nm 的紫外线并将能量传递给溴化乙锭，同时嵌入在核酸碱基间的溴化乙锭吸收 302 nm 和 366 nm 波长的紫外线，来自两方面的能量最终激发出波长为 590 nm 的红橙色的可见荧光。通常用水将 EB 配制成 1 mg/mL 的贮存液，于室温下避光保存。该染料通常以 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度掺入到凝胶和缓冲液里，电泳后直接观察。也可在不加 EB 的条件下进行凝胶电泳，电泳完成后将

凝胶浸在含 EB(0.5 $\mu\text{g/mL}$)的电泳缓冲液或水中，于室温下染色 20 min 左右后观察。EB 的存在将使线状双链 DNA 的电泳迁移率降低近 15%。应该注意的是，溴化乙锭是强诱变剂，并有中度毒性，取用这种染料的溶液时务必带上防护手套。如不慎与皮肤接触，应立即用清水彻底冲洗，含有溴化乙锭的溶液在使用后，不得随意丢弃。

出于安全性的考虑，本实验对凝胶的染色未采用溴化乙锭，而是选择了更加安全低毒的 GeneGreen 核酸染料。它是一种新型的核酸染料，采用琼脂糖电泳检测 DNA 时，GeneGreen 与核酸结合后能产生很强的荧光信号，其灵敏度与 EB 相当。经过荧光染料染色后的凝胶，在暗室条件下，经过蓝光透射仪照射激发可以出现相应的可见荧光。实验者可通过肉眼或仪器进行观察。

2.4 大肠杆菌及质粒载体

大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) 是革兰氏阴性短杆菌，大小 $0.5 \times 1 \sim 3$ 微米。周身鞭毛，能运动，无芽孢。能发酵多种糖类产酸、产气，是人和动物肠道中的正常栖居菌，婴儿出生后即随哺乳进入肠道，与人终身相伴，其代谢活动能抑制肠道内分解蛋白质的微生物生长，减少蛋白质分解产物对人体的危害，还能合成维生素 B 和 K，以及有杀菌作用的大肠杆菌素。它的主要特点有以下几点：

- 1、大肠杆菌是细菌，属于原核生物；具有由肽聚糖组成的细胞壁，只含有核糖体简单的细胞器，没有细胞核有拟核；细胞质中的质粒常用作基因工程中的运载体。
- 2、大肠杆菌的代谢类型是异养兼性厌氧型。
- 3、人体与大肠杆菌的关系：在不致病的情况下（正常状况下），可认为是互利共生（一般高中阶段认为是这种关系）；在致病的情况下，可认为是寄生。
- 4、培养基中加入伊红美蓝遇大肠杆菌，菌落呈深紫色，并有金属光泽，可鉴别大肠杆菌是否存在。
- 5、大肠杆菌在生物技术中的应用：大肠杆菌作为外源基因表达的宿主，遗传背景清楚，技术操作简单，培养条件简单，大规模发酵经济，倍受遗传工程专家的重视。目前大肠杆菌是应用最广泛，最成功的表达体系，常做高效表达的首选体系。
- 6、大肠杆菌在生态系统中的地位，假如它生活在大肠内，属于消费者，假如生活在体外则属于分解者。
- 7、它的基因组 DNA 为拟核中的一个环状分子。同时可以有多个环状质粒 DNA。DH5 α 菌株属于大肠杆菌，它适用于高效的 DNA 克隆和质粒扩

增，能保证高拷贝质粒的稳定遗传。

本实验中使用的质粒为 pTrc99a。由于实验者往往需要利用质粒作为载体实现在目标宿主中表达目标基因，而目标宿主基因克隆相较于大肠杆菌往往相对困难，一般情况下，实验者首先利用 pTrc99a 质粒在大肠杆菌中完成基因克隆，后将改造后的质粒转入到相应目标宿主中进行基因表达等操作。其质粒图谱如下图 4。

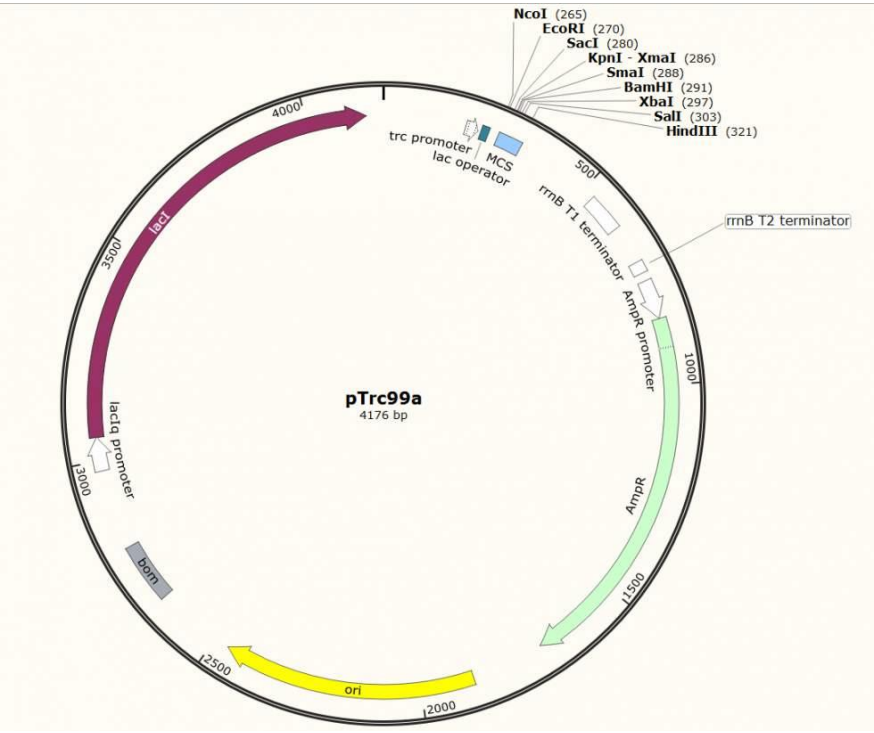


图 4 pTrc99a 质粒图谱

3 实验材料

3.1 主要器材

电子天平，冰箱，超净工作台，摇床，高速离心机，旋涡振荡器，制冰机，微量移液器，微量离心管，微波炉，琼脂糖凝胶电泳仪（DYY-6C 型，北京市六一仪器厂），TGreen 切胶仪/蓝光透射仪，封口膜。

3.2 主要试剂

- (1) 菌种：含有 pTrc99a 质粒的大肠杆菌 DH5 α ，氨苄青霉素抗性。
- (2) LB 液体培养基：酵母浸膏 5 g/L，胰蛋白胨 10 g/L，NaCl 10 g/L，pH 7.0
- (3) 氨苄青霉素：100 mg/mL
- (4) 快速质粒小提试剂盒（天根）
- (5) 琼脂糖：电泳级
- (6) DNA Marker DL5000，由 9 条线状双链 DNA 条带组成，分别为 5000、3000、2000、1500、1000、750、500、250 和 100 bp。
- (7) GeneGreen 核酸染料（天根）
- (8) TAE 溶液：40 mmol/L Tris-乙酸盐，1 mmol/L EDTA
- (9) 10 $\times$ 点样缓冲液（Loading Buffer, Takara）

4 实验方法

4.1 菌体培养（前期准备工作）

将甘油中保存的菌液接入固体 LB 平培养，挑取单菌落接入 5 mL 液体 LB 培养基（其中氨苄青霉素的浓度为 100 μ g/mL），37 $^{\circ}$ C，200 rpm 培养 12~16 h。

4.2 质粒提取

按照快速质粒小提试剂盒（天根）进行操作：

1. 取 1-4ml 过夜培养的菌液，加入离心管中，使用常规台式离心机，12,000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 1min，尽量吸除上清（菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中）。
2. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 150 μ l 溶液 P1（请先检查是否已加入 RNase A 和 TIANRed），使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。
3. 向离心管中加入 150ul 溶液 P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。
4. 向离心管中加入 350ul 溶液 P5，立即快速地上下颠倒混匀 12-20 次，充分混匀，此时将出现絮状沉淀。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 2 min。
5. 将上一步收集到的上清液用移液器转移到吸附柱 CP3 中（吸附柱放入收集管中），注意尽量不要吸出沉淀。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP3 放入收集管中。
6. 向吸附柱 CP3 中加入 300 ul 漂洗液 PWT（请先检查是否已加入无水乙

醇），12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP3 放入收集管中。

7. 将吸附柱 CP3 放入收集管中，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 min，目的是将吸附柱中残留的漂洗液去除。

8. 将吸附柱 CP3 置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位滴加 50-100ul 洗脱缓冲液 TB，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30sec 将质粒溶液收集到离心管中。

10. 测定得到的纯化产物的浓度，保存于 -20°C 冰箱中待用。

4.3 酶切

使用限制性内切酶切割质粒，形成线性质粒。

取 25 μL 提取的质粒，加入 5 μL 10*CutSmart，1 μL *Hind*III 限制性内切酶和 19ul ddH₂O，混匀后放置于 37°C 反应 20 min，进行电泳观察。

4.4 琼脂糖凝胶电泳

A 制胶

- a) 利用 1×TAE 溶液配制 1%琼脂糖 25 ml(浓度由目的条带大小决定)，微波加热使之溶化；
- b) 加入 2.5 μL GeneGreen（微毒，小心取用），轻轻摇匀，避免产生气泡；
- c) 将制胶床放入水平放置的制胶托盘中，插好梳子，倒入融好的琼脂糖凝胶；
- d) 待凝胶充分凝固(30 min)后，拔下梳子。

B 加样

- e) 将制胶床连同凝胶一起放入电泳槽中；
- f) 加入电泳缓冲液 TAE，浸没胶面 1 mm 左右；
- g) 50 μL 的样品和 10 μL 点样缓冲液混和，然后点在点样孔中；
- h) 将 6 μL 的 DNA Marker 点在点样孔中。

C 电泳

- i) 盖上透明上盖；
- j) 接通电源线，选择工作电压，120 V，30 min，打开电泳开关；
- k) 当加样缓冲液中的溴酚蓝迁移至足够分离 DNA 片段的距离时，关闭电源，将凝胶在蓝光透射仪下观察，并拍照保存电泳图。（请注意观

察，如溴酚蓝已经接近另一端时可及时停止）

5 注意事项

- (1) 琼脂糖溶液微波加热时间不易过长，以免液体大量蒸发；
- (2) 所用器具需要高压灭菌；
- (3) 碱裂解过程中混和的动作要温和，切勿振荡。
- (4) 将融好的凝胶倒入制胶床前需要冷却至 70℃以下，高温凝胶会使制胶床变形；
- (5) 凝胶放入电泳槽时点样孔靠近阴极侧（通电后气泡较多的一侧）；
- (6) 上盖的小凸块应插入槽体，并压下安全按钮；
- (7) 本实验中使用的染色剂的是 GeneGreen，无毒。但实验中依然应注意戴手套操作，且接触染料的手不要随意接触其他器皿，养成良好的实验习惯。

6 思考题

- 1、 分析实验结果，思考可能影响质粒提取的纯度和浓度的因素；
- 2、 简述质粒提取过程中各溶液（P1、P2、P3 等）的作用；
- 3、 为了准确观察质粒的实际长度，跑胶前必须将质粒酶切变成线性片段，为什么？

PS：请大家提前扫描下方二维码，加入化工实验 2-（10）交流群，针对实验内容有任何问题，都可随时提问。

