

十分钟得到转染级质粒DNA— PureYield™ 质粒小提系统

Don Smith, Eric Vincent, Promega Corporation

本文介绍PureYield™ 质粒小提系统，这一系统可帮助研究者纯化高质量的质粒DNA，适用于多种下游应用，包括转染、体外表达、测序和克隆。该系统可直接从多达0.6ml的细菌培养液中纯化质粒，不需要离心富集细胞；如果使用离心方法富集细胞，则最多可处理3ml的细胞培养液。整个操作过程仅需10分钟。

简介

质粒小提无论对于基因操作还是蛋白表达，都是一种基本的研究工具。然而，大多数商品化的小提系统所能得到的纯度和浓度都比较有限，使纯化出的质粒被局限于要求较低的应用上。PureYield™质粒小提系统可纯化出高质量的DNA，对于最高要求的应用也能胜任，包括转染。纯化出的质粒DNA质量出众，使研究人员避免耗费时间和精力进行大量的操作。

PureYield™质粒小提系统具有独特的试剂、专利设计的纯化基质和纯化柱，可以直接从细菌培养物中快速纯化DNA，纯化过程仅需不到10分钟，洗脱体积可低至30μl，可获得更高浓度的质粒。低洗脱体积得以实现是因为纯化柱的设计能够确保几乎无残留体积。洗脱的质粒不再被剩余的洗涤液、盐或者酒精污染，确保纯化的质粒可用于高度敏感的下流实验，比如转染和TnT®偶联的体外转录/翻译。另一个好处是低拷贝质粒也能获得同等程度的纯化水平。尽管该系统最适于提取小于10kb的质粒，我们也纯化过18kb的质粒。

10分钟获得高质量DNA

PureYield™质粒小提系统具有独特的试剂组分，可直接从细菌培养物中纯化质粒，也可以从离心富集的细胞团中纯化质粒，这些细胞团最多来自3ml的细胞培养液(图1)。一般来说，在LB中过夜培养16-18小时的菌液，取0.6ml可用于直接提取。如果需要从更大体积的培养物中纯化质粒，可以先离心富集细胞，随后再使用600μl的培养基或水重悬。然后加入100μl裂解液并颠倒混合，直到获得清亮的蓝色溶液。接着，加入350μl冰冷的中和溶液，颠倒试管混合溶液，直到获得均一的黄色溶液，表示pH改变完全，中和步骤已完成。中和后产生大量沉淀，可通过常用的微型离心机去除。将去除沉淀物的裂解液

上清转移到纯化柱中，纯化柱下面连接着收集管。将样品离心20秒。暂时移去纯化柱，弃除离心到收集管内的液体。将纯化柱重新连接到收集管上。在纯化柱中加入20μl内毒素去除清洗液，然后离心15秒。此时，不需要将纯化柱从离心机上移走，随即加入400μl纯化柱清洗缓冲液，再离心30秒。将纯化柱转接到干净的1.5ml试管中，向纯化柱中加入30μl洗脱液。孵育1分钟后，通过离心得到质粒DNA。

小提质粒系统获得高纯度DNA

我们使用PureYield™质粒小提系统从大肠杆菌细胞中纯化高拷贝的pGEM®-3Zf(+)质粒。纯化出的质粒用分光光度计分析，根据260nm的吸光度估计质粒产量。质粒的纯度通过两种方法判断： $A_{260/280}$ 比值，通常纯质粒为1.8-1.9； $A_{260/230}$ 比值，通常纯质粒大于2.0。较低的数值表明有蛋白污染($A_{260/280}$)或者盐/乙醇污染($A_{260/230}$)。表1显示了得到的质粒DNA的产量和纯度。另外，琼脂糖凝胶分析被用于观察纯化质粒的完整性(图2, A)。为了确定增加洗脱体积是否能进一步增加产量，我们从携带pGEM®-3Zf(+)质粒的0.6ml JM109细胞培养液中提取质粒。将洗脱体积增加到100μl时，可以发现产量稍有增加(图2, B)，但是洗脱体积大于100μl时，没有发现产量继续增加(数据未显示)。

小提质粒DNA在转录/翻译偶联系统中性能优良

我们测试了使用PureYield™质粒小提系统纯化出的质粒DNA在TnT® T7快速偶联转录/翻译系统中的性能(图3)。从1.0或1.5ml的JM109细胞中纯化萤光素酶T7对照质粒。将使用PureYield™小提系统得到的质粒与转录/翻译系统提供的对照质粒以及使用SV(离心/抽真空)系统纯化的质粒进行了比较。PureYield™小提系统纯化的质粒与转录/翻译系统提供的对照质粒的性能一样好。PureYield™小提系统纯

转染级小提DNA

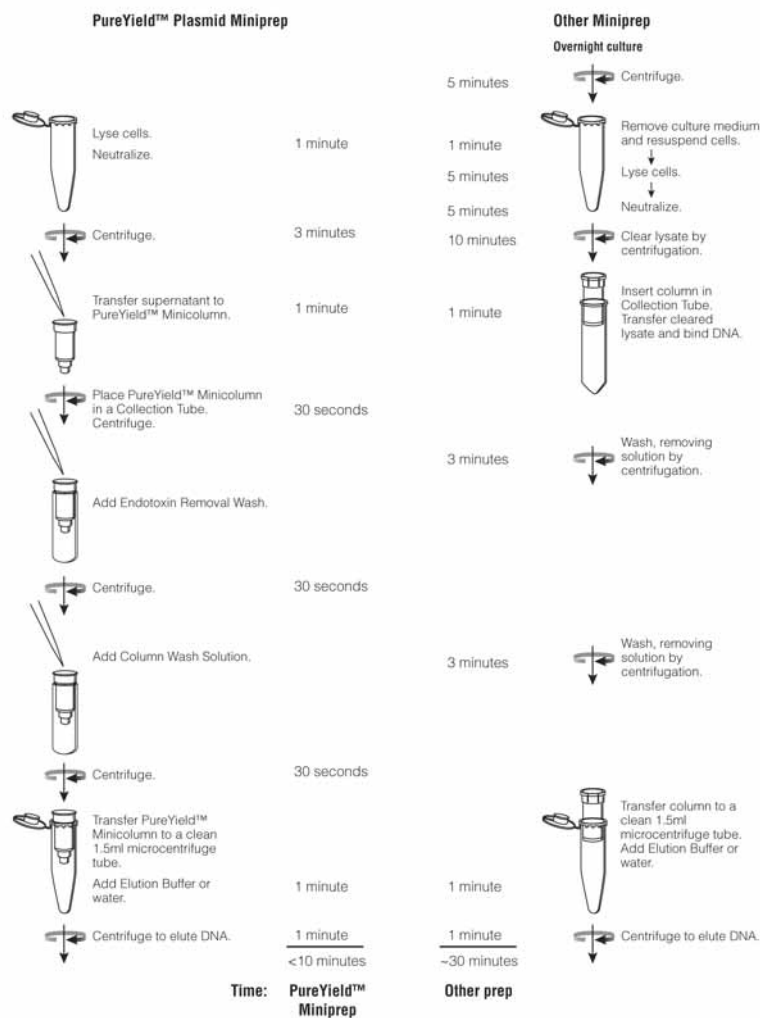


图1. PureYield™ 质粒小提系统在大约10分钟内能获得转染级DNA。

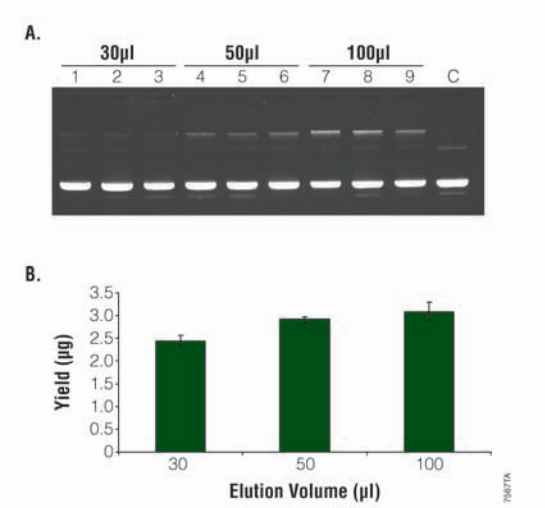


图2. 使用PureYield™质粒小提系统获得的质粒的完整性。从0.6ml JM109培养液中纯化质粒，在琼脂糖凝胶中上样1µg并用EB染料显色(图A)。泳道1-3, 30µl洗脱体积；4-6, 50µl洗脱体积；7-9, 100µl洗脱体积。泳道C，来自于大规模工业制备的对照质粒。洗脱体积增加到100µl时产量能略微增加(图B)。N=每种洗脱体积下重复6次。

表1. 使用PureYield™ 质粒小提系统纯化的质粒的纯度。

培养液体积	属性	A230/260	A260/280	产量(µg)
0.6ml	平均数	2.16	1.85	2.44
	标准差	0.179	0.023	0.315
	变异系数	8.27%	1.26%	12.9%
1.0ml	平均数	2.31	1.87	5.43
	标准差	0.019	0.012	0.303
	变异系数	0.80%	1.26%	5.58%
1.5ml	平均数	2.29	1.86	7.78
	标准差	0.022	0.004	0.741
	变异系数	0.95%	0.22%	9.53%

N=6。

操作手册

PureYield™ Plasmid Miniprep System Technical Bulletin #TB374
(www.promega.com/tbs/tb374/tb374.html)

本产品已有中文操作手册CTB374，请联系普洛麦格(北京)生物技术有限公司索取。

转染级小提DNA

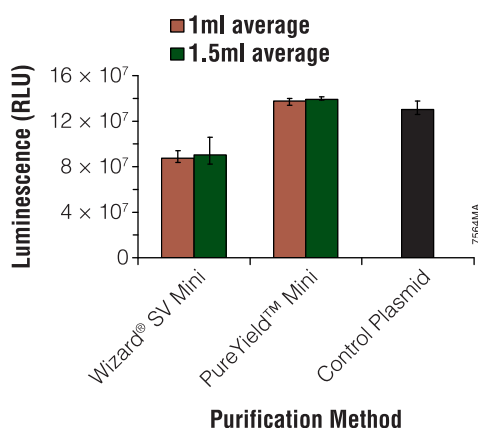


图3. 使用PureYield™质粒小提系统纯化的质粒DNA与转录/翻译偶联反应中提供的对照质粒DNA性能一致。使用Wizard® Plus SV小提DNA纯化系统或者PureYield™质粒小提系统从1.0ml或1.5ml JM109细胞中纯化萤光素酶T7对照质粒DNA，然后用于T_NT® T7快速偶联转录/翻译系统，并与T_NT®快速系统提供的对照DNA相比较。使用ONE-Glo™萤光素酶检测系统定量蛋白表达。(N=6)。

化的质粒在自动测序反应中也表现出众，可以得出完美的、超过700个碱基的数据(图4)。

PureYield™质粒小提系统最大的优势之一是能用小规模、快速的方法制备转染级的DNA。图5所示数据比较了使用SV(离心/抽真空)小提系统和PureYield™质粒小提系统制备的质粒。纯化的质粒用于转染几种常见的哺乳动物细胞系。最均衡一致的转染结果来自于使用PureYield™质粒小提系统制备的质粒。即便是很难转染的细胞系(如CHO细胞)也能获得很好的转染效率。

总结

PureYield™质粒小提系统给研究者提供了一个制备小量、高质量DNA的新选择，适用于转染、克隆、测序和转录/翻译偶联反应。全部操作可在10分钟内完成，既可直接处理0.6ml的细菌培养液，也可处理从最多3.0ml的细菌培养液中富集的细菌细胞。

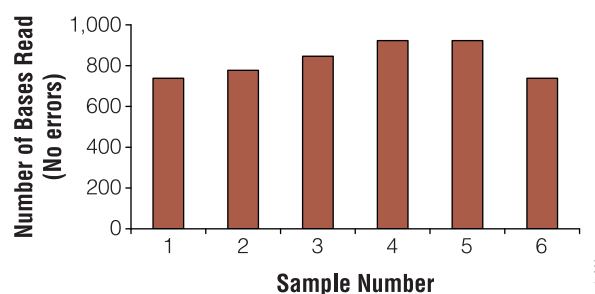


图4. 使用PureYield™质粒小提系统提取的质粒DNA在自动DNA测序反应中表现出众。使用PureYield™质粒小提系统分别制备6份pGEM®-3Zf(+)质粒，并提交给测序服务商。所有6份提取都获得了大于700个碱基的完美读数。

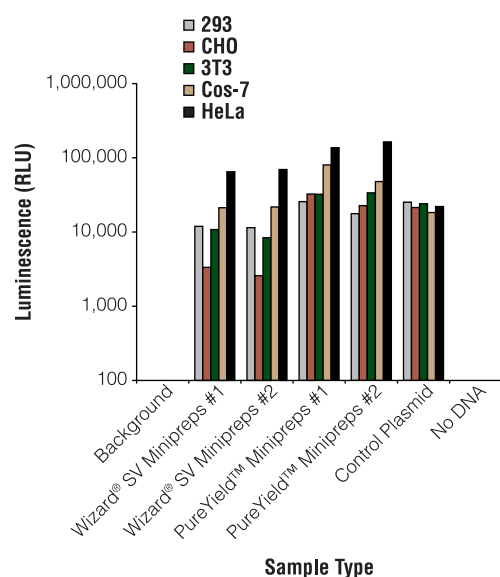


图5. 使用PureYield™质粒小提系统制备的质粒DNA在转染实验中表现出良好的均衡性。Promega pGL4.13质粒使用SV(离心/抽真空)系统或PureYield™质粒小提系统制备得到。将质粒转染到5个常用的哺乳动物细胞系中，然后使用ONE-Glo™萤光素酶检测系统检测细胞系的萤光素酶活性，从而评定转染效率。(N=6)。

订购信息

产品	规格	目录号
PureYield™ Plasmid Miniprep System	50prep	A1221
	250prep	A1222