

使用 illustra plasmidPrep Mini Spin 小量质粒抽提试剂盒迅速纯化高质量的质粒DNA

P. Tatnell

GE Healthcare, The Maynard Centre, Cardiff, U.K.

illustra plasmidPrep Mini Spin 小量质粒抽提试剂盒能用来快速地纯化来自小体积大肠杆菌转染培养液(1-3 毫升)的质粒 DNA。该系统快速、高效,而且通常能够获得最高达 15 μ g 的质粒 DNA 回收率。稳定的纯度和得率能够保证质粒 DNA 的下游应用,如限制性内切酶分析、片段连接、克隆、DNA 序列测定、PCR 和其他的分子生物学应用。

实验方法概述

整个实验过程分为三个阶段:使用改良的碱性细胞裂解液溶解细菌(1-3);通过离心使细胞碎片沉淀;最后将上清液加到纯化用的特制硅膜小柱中。该最新研发的特制硅膜能够在洗脱质粒DNA前,只需一部的清洗/干燥,便有效去除变性污染物。illustra plasmidPrep Mini Spin 小量质粒抽提试剂盒使用离液盐 chaotropic salts 使杂质变性,因而促进质粒DNA能被选择性地结合于硅膜上(4,5)

提取时间

使用 illustra plasmidPrep Mini Spin 小量质粒抽提试剂盒提取单个质粒 DNA 的制备时间比使用Qiagen公司的QIAprep Spin Mini Kit快50%(图 1)。

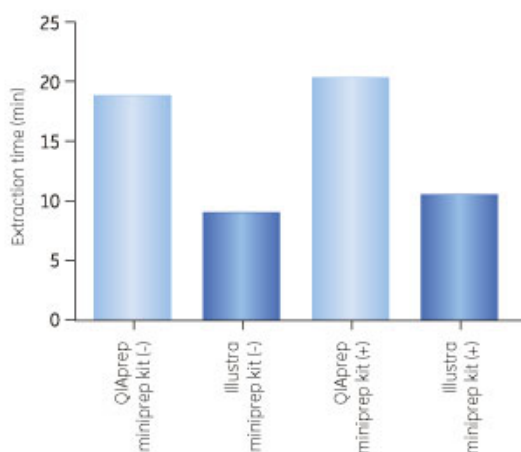


图 1. 使用 illustra plasmidPrep Mini Spin 试剂盒提取单个质粒 DNA 制备 和使用 QIAprep Mini Kit 试剂盒进行实验时间的比较。为了统计学的分析和关联度,我们请了三个不同的研究员抽提了共九个质粒 DNA 的样品。 (+) 表明包含核酸酶活性的去除步骤(可选), (-) 表明省略该步骤。

超螺旋状质粒DNA的数量

在样品中,超螺旋状质粒DNA数量的多少能用来评定在提取过程中质粒本身所受到的物理损伤的程度。实验数据显示从所有四个培养液获得的质粒DNA中,均有60-70%的含量处于超螺旋状的构型(此处未列出具体数据)。

源于EndA+菌株HB101的质粒DNA样品中的核酸酶活性

直接测量由 illustra plasmidPrep Mini Spin 小量质粒抽提试剂盒所抽提,源于大肠杆菌 HB101 的质粒 DNA 中的核酸酶活性。部分被降解的质粒 DNA 显示了核酸酶活性的残留,因这些样品均没有经过核酸酶洗脱液的处理。但经过额外洗脱处理后,质粒 DNA 样品就没有降解的情况,显示核酸酶活性被完全去除了(此处未列出具体数据)。

下游应用的兼容性

使用 QIAprep 和 illustra 试剂盒获得的质粒 DNA 样品进行限制性酶解(图 2) - 其中包括内切酶 HindIII 的低浓度酶解(37 $^{\circ}$ C, 1 个单位酶作用 1 小时)。当中显示 HindIII 的活性随盐浓度提高而降低;因此, HindIII 酶解能被用于检测质粒 DNA 中是否存在高盐的污染。在实验中,两种试剂盒抽提得到的质粒 DNA 均进行了 HindIII 酶切的比较(图 3),结果显示用 illustra 和 QIAprep 获得的质粒 DNA 样品中没有含盐离子。

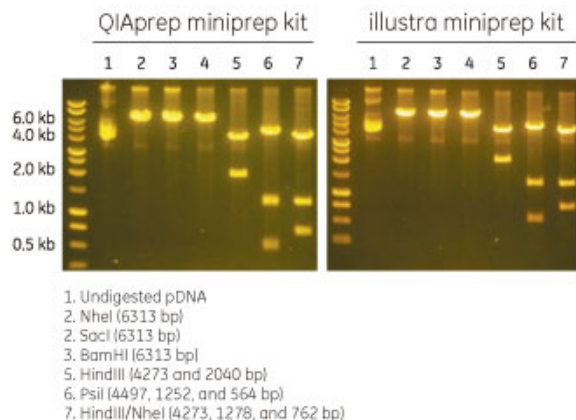


图 2. 限制性内切酶消化质粒DNA样品(400 ng、5 个单位 37 $^{\circ}$ C 作用 1 小时), 选取了从培养液 1 中获得的质粒 DNA 作为代表性图像。

Endpoint PCR

在图4显示, 所有的质粒小抽的产物(不管哪家供应商)都能有足够的质量去进行1187 bp产物的扩增。我们将 QIAprep和illustra获得的质粒DNA分别作为扩增, 使用三种不同的DNA聚合酶进行扩增, 结果显示扩增后的电泳条带的亮度相若。同时, 发现PCR程序的循环数不会影响扩增效果, 这说明两种试剂盒产物的模板扩增效率也是相似的。另外, 实验结果同样表明无论使用非校正 (Taq DNA 聚合酶) 或校正功能的聚合酶 (PfuTurbo™和 Vent DNA™聚合酶), illustra获得的质粒DNA都能成为可靠的模板, 进行有效的扩增。

连接和克隆

另一些实验结果表明, 使用illustra Mini Spin小量质粒抽提试剂盒获得的质粒DNA能够作为T4 DNA连接酶克隆实验的良好模板(此处未列出具体数据)。另外, 使用illustra或QIAprep试剂盒提取的质粒DNA样品于连接、克隆和转化(>300个抗氨苄菌落克隆), 其效率均相似。阴性的对照反应(没有连接酶)产生<50个菌落。

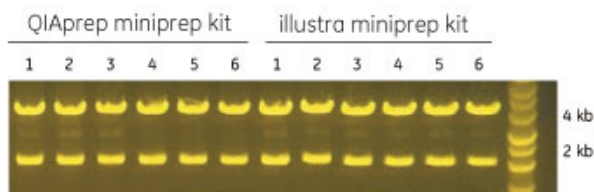


图 3. 用Hind III消化质粒DNA样品(1个单位, 37°C作用1小时), 选取了从培养液1中获得的质粒DNA作为代表性图像。

结论

illustra plasmidPrep Mini Spin小量质粒抽提试剂盒作为用途广泛的质粒DNA纯化工具, 与QIAprep Spin Miniprep质粒小抽试剂盒相比, 在时间上每个反应节省了10分钟, 但完全没有降低质粒DNA的回收率、纯度或质量。同时, 所得到的质粒DNA样品均具备高的质量, 保证在限制性内切酶分析、PCR、片段连接、克隆等下游分子生物学应用中有优秀的表现。

参考文献

1. Birnboim, H.C. and Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513(1979).
2. Ish-Horowicz, D. and Burke, J. F. Rapid and efficient cosmid cloning. Nucl. Acids Res. 9, 2989(1981).
3. Sambrook, J. et al. Cold Spring Harbor laboratory. 2nd ed. (1989).
4. Vogelstein, B. and Gillespie, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci USA 76, 615 (1979).
5. Marko, M. A. et al. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. Anal. Biochem. 121, 382(1982).

详情请登陆www.gehealthcare.com/illustra

订购信息

产品	货号
illustra plasmidPrep Mini Spin (50 preps)	28-9042-69
illustra plasmidPrep Mini Spin (250 preps)	28-9042-70

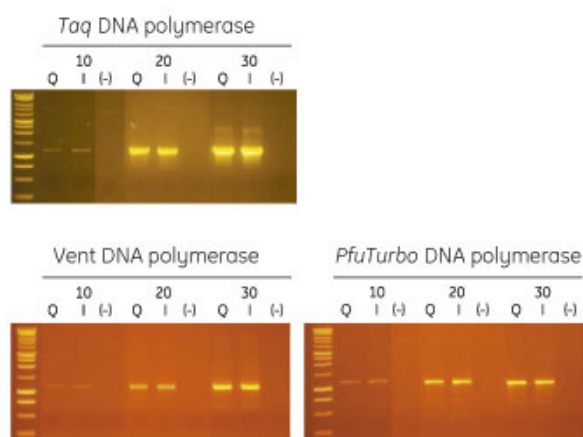


图 4. Endpoint PCR分析。泳道Q和I分别代表QIAprep spin kit试剂盒和illustra miniprep kit试剂盒获得的质粒DNA的扩增产物的。(-)代表未加模板的阴性对照。数字10, 20, 和30分别代表不同的PCR程序循环数。对于多个质粒DNA进行了PCR实验, 只选取了QIAprep或illustra miniprep kit试剂盒的各一个产物作为代表性图像。