

大量提取质粒 DNA (CsCl 密度梯度离心法)

李渊越

1. 预约摇床、超速离心机。
2. 配 TB 培养基 (1L 锥形瓶中装 250 ml 培养液), 并灭菌。质粒做好转化, 并涂板。

3. 第一天早上, 往 TB 中加入适量的 Amp 或 Kana。挑菌, 37 °C 摇床培养 24 h, 至 OD₆₀₀ 到 10-15。
4. 检查以下药品: 25% sucrose in 50 mM Tris-HCl (pH8.0) >250mL、lysozyme 粉末>1g、0.5 M EDTA (pH8.0)>50mL、RNase A (100 mg/ml)>150uL、Triton-lysis>100mL、PEG8000>300mL、1×TE>150mL、CsCl>250g、正丁醇>2 瓶、EB>2mL。

5. 第二天早上, 把菌液倒入离心瓶中, 用 Beckman J6-MI 离心机以 4,200 rpm, 20 min 离心。离心后, 把上清倒干。在离心的时候, 配 Lysozyme 25mL。并将 RNase 置于室温。
6. 弃上清, 以 20ml 25% sucrose in 50 mM Tris-HCl (pH8.0), 重悬至菌完全分散。
7. 加入 4ml 新配制的 lysozyme-EDTA-RNase 溶液。混匀, 室温静置 10 min 以上。
8. 在静置的同时, 准备好高速离心管, 往里面各加入 5ml Triton-lysis。
9. 将 lysozyme-EDTA-RNase-DNA 溶液倒入高速离心管中, 使用 JA-30.50 Ti 转头, 100,000g, 15min。
10. 将上清倒入新管中 (不要把沉淀倒出来), 加入 PEG8000 使总体积至 50mL (1/2 体积), 颠倒混匀, 于 4 °C 中放置 2 h 以上 (过夜更好)。
11. 4,000 g 5 min, 去上清, 加入 8.5ml TE, 溶解至无沉淀。
12. 加入 11.00 g (要精确到小数点后 2 位, 便于配平) CsCl, 溶解完全。
13. 在超离管中用 200ul 枪加入 100ul EB (2mg/ml), 将溶液通过 20mL 一次性注射器移入超离管中, 用 TE 将液面补平至近管口。
14. 补加 TE 至液面到超速离心管管口。
15. 称出每管重量, 配平, 封口。任选以下一种条件在 20°C 下进行密度梯度离心:

转头	转速	时间
Type 70.1 Ti	70,000rpm	20h
NVT65	60,000rpm	16h
NVT65	65,000rpm	8h

16. 灭 250mL 以上的超纯水, 并配好至少 500mL 灭菌水饱和正丁醇。

17. 超离后, 取样品, 用 5 ml 注射器加上 12# 针头, 抽取 EB 带, (离心完可见两条 EB 带, 上面一条细浅的带为断裂的质粒 DNA, 应抽取下面一条粗浓的 EB 带) 放入 50ml 管中。
18. 以灭菌水饱和正丁醇溶液萃取 EB, 直到溶液澄清无色。
19. 加入等体积 TE (一定要加。若不加, 在无水乙醇沉淀时, 会沉淀下部分 CsCl)。
20. 加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, 混匀 (如果不充分混匀, 可能会导致离下的 DNA 是透明的, 容易随上清一起倒掉)。6,000rpm, 20min, (注意方向) 去上清 (注意沉淀不会贴壁, 不要倒掉)。
21. 加入 450 μl (~900ul) 水, 把 50mL 离心管平放 (注意方向), 溶解, 直到溶解完全 (约需室温过夜)。
22. 用枪小心将液体吸入 1.5mL 离心管中 (如 >450ul, 可分成两管), 加入十分之一体积的 3 M NaAc (pH 5.2), 再加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, 混匀, 置于 4C 或 -20C 15-30min。13,000 rpm 离心 10min。
23. 用 1mL 70% 预冷的乙醇洗沉淀一次, 13,000rpm 离心 10min。
24. 去上清, 以 1mL TE 溶解完全, 测定浓度。

lysozyme-EDTA-RNase 溶液

溶菌酶	0.4 g
0.5M EDTA (pH=8.0)	25mL
RNase A (100mg/mL)	120uL
H ₂ O	25mL

25% 蔗糖:

蔗糖	25 g
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	5 ml

过滤，加纯水定容至 100 ml，置于 4 °C 保存。

0.5 M EDTA (pH 8.0) :

EDTA·Na·2H ₂ O	186.1 g
NaOH	约 20 g

加 800 ml 纯水溶解完全后，调 pH 至 8.0，定容至 1 L，湿热灭菌，常温保存。

Triton-lysis:

10% Triton-100	5mL
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	15 mL
H ₂ O	100mL

湿热灭菌，常温保存。

PEG8000:

PEG8000	150 g
5 M NaCl	150 ml

加纯水定容至 500 ml，湿热灭菌，常温保存。

EB (2mg/ml):

EB	20mg
----	------

加超纯水 10ml，溶解，室温保存。