

# 中量提取质粒 DNA (CsCl 密度梯度离心法)

李渊越

1. 将菌液倒入装有 50mL TB 的锥形瓶中，或从培养好的平板上挑取单克隆，锥形瓶置于 37°C 摇床 350rpm 培养 16-20h, 至 OD600 到 10-12。(OD600 到 40 为用 TBS 培养基在我们的培养条件下所能达到的最高浓度，在此浓度时，菌处于对数生长期)
2. 将培养好的菌液到入国产 50mL 离心管中，每管不超过 45mL。(有实验表明，若往离心管中装入超过 45mL 的液体，离心后，液体的终体积仍为 45mL。因此，一次不应离超过 45mL 的液体，否则将污染离心机。)
3. 室温离心 5,000rpm, 5min。弃上清，控干。
4. 加 P1-RNase 至终体积到 7mL，震荡重悬至菌均匀分散。(按该法最多只能裂解 45mL 13OD 的细菌，如需裂解更多细菌，请按比例增加。否则将导致细菌裂解不完全，反而得到更少的菌。)
5. 加 14mL P2，盖上盖子，上下颠倒混匀 2min。(该步一定要混匀，以达到将细菌完全裂解的目的。加入 P2 后可见溶液澄清粘稠，该步反应时间不应过久)
6. 加 7mL P3。(P2 和 P3 之间反应时间不要超过 5min。混匀后可见絮状沉淀。该步若置于冰上，沉淀效果更好。但位于室温的反应以足以达到实验需要。)用 H<sub>2</sub>O 配平至对称管重量差 < 0.1g。
7. 室温 (4度更好，但没有必要。)离心，10,000 rpm, 5min。
8. 将上清用滤纸过滤至另一国产的 50mL 管中。加 0.6 倍体积的异丙醇，颠倒混匀后室温 (不可置于 4度。若置于 4度，将会使部分盐析出)静置 10min。(分子克隆 p35)
9. 室温离心 10,000rpm 15min。
10. 弃上清，在加 1.8mL H<sub>2</sub>O 溶解完全后，平均分至两个 1.5mL 管中，再分别往每管中加入二分之一体积的 PEG8000，4°C 沉淀 2 小时。
11. 3,000 rcf 离心 3min，弃上清。(可以不要非常完全控干)
12. 加 1.55mL CsCl 溶液溶解至沉淀完全溶解。10,000 rcf 3min 离心，弃去不溶物质。
13. 往 2mL 超速离心管中加入 50ul 2mg/mL EB。加之前用卷纸把枪头外壁的 EB 擦干。(将外壁的 EB 擦干是为了防止 EB 残留在离心管的管口。)
14. 将 DNA 移至 2mL 超速离心管中，并用 H<sub>2</sub>O 将体积补至 2mL。(此时，溶液的密度为 3.10g/2mL，共含 1.55g CsCl。)
15. 配平至对称管重量差 < 0.02g，封口。(该步配平时，可按 1ul H<sub>2</sub>O 重 0.001g 来补加 H<sub>2</sub>O 进行配平以缩短时间。)在封口后，上下颠倒混匀。
16. 打开超速离心机，按 Memu -> Programme -> Plasmid-CsCl -> OK。(该步为 149,000rpm 2h 升速 max 降速 6。)
17. 按 Vacuum 至真空度 < 400 后按 Start。(不等真空度至 < 400 其实也可启动，但这可能将造成离心机反复升降速，故制定此规则。)等升至最大转速后才能离开。(该步为离心机安全操作必须，请务必做到)
18. 2h 后，取出转头，离心管。若转头内有液体需将其洗净，擦干。(因为此时泄漏的液体含有 EB，因此需要将其洗净，擦干。)
19. 先用 8 号针头在离心管上部插个洞，再用 1mL 注射器抽出所需的红色 DNA 条带至 1.5mL 离心管中。
20. 加入 1mL 水饱和正丁醇，上下颠倒混匀 (勿用振荡器) 约 20 下。(或更多，使上部液体尽可能变红。)将 1.5mL 管置于离心机中，按 Short 键 5 秒，松手。弃去上层液体。(离心的目的是为了加速液面分层，因此也可省去。)
21. 重复 20 步 2-3 遍，至下层看不到红色后再萃取一遍。(再萃取一遍的目的是为了确保 EB 完全去除。)
22. 往溶液中补加等体积的 H<sub>2</sub>O，平均分成若干管，使每管终体积为 400ul。往每管中分别加入 1mL (2.5 倍体积) 无水乙醇，颠倒混匀。13,500 rpm 5min 4°C。弃上清。(该步的目的是为了除去溶液中残留的 CsCl。)
23. 加 1mL 预冷的 70%乙醇洗一遍。13,500 rpm 5min 4°C。弃上清。(该步的目的是为了除去 21 步中管壁上残留的部分含 CsCl 的液体。)
24. 加 400ul H<sub>2</sub>O 或 TE 溶解。(对于高拷贝质粒，45mL 菌液将获得 500-1,500ug 左右质粒。)

## 试剂

P1

50mL P1+5mg RNase, 4C 保存。

P2

P3

异丙醇

PEG8000

CsCl 溶液

准确称取 31.00gCsCl, 加 H<sub>2</sub>O 定容至 30.0mL。

2mg/mL EB

水饱和正丁醇

无水乙醇

70%乙醇