

## 质粒的扩增与抽提（也是孙师姐整理）

### 1.质粒的扩增

(1) NQO1 敲低质粒和空白对照质粒（含氨苄青霉素抗性）由公司合成，并获得含相应质粒的感受态甘油菌种。

(2) 在超净工作台中，将菌液涂布器浸泡在 70%酒精内，沾有少量酒精的涂布器于酒精灯外焰灼热灭菌，待冷却后，吸取适量菌液（约 30 $\mu$ l），使用涂布器在含有氨苄青霉素的固体培养基三区划线涂布，随后，将平板倒置于细菌培养箱，37 $^{\circ}$ C，过夜培养。

(3) 待平板上长出单克隆菌落后，用 10  $\mu$ L 的吸头挑取单克隆，接种至含 LB 液体培养基的 10 mL 离心管中，其中含 10  $\mu$ L 的氨苄青霉素，浓度为 100  $\mu$ g/mL。放置于细菌培养摇床上培养 24 h，摇床的温度为 37 $^{\circ}$ C，转速为 200 rpm。

(4) 24 h 后，在超净工作台中，在提前标注菌液名称及冻存时间的 1.5 mL 的离心管中加入 500  $\mu$ L 50%甘油溶液，再吸取 500  $\mu$ L 的菌液，移液枪吹打混匀后，-80 $^{\circ}$ C冰箱保存。

### 2.质粒提取

(1) 将提前接种，经过 10~12 h，37  $^{\circ}$ C摇床培养的菌液，视情况所需进行保菌，再置于室温离心机中，8000 rpm 离心 3~5 min，将上清倒掉，将离心管反扣在铺平的吸水纸上，静置片刻，充分吸干管内多余培养基。

(2) 向每个离心管添加 500  $\mu$ L 保存于 4  $^{\circ}$ C冰箱的 Buffer P1（已添加 RNase A），用枪头吹打混匀，将菌体沉淀均匀重悬，如枪头吹打效果不佳则可

使用涡旋仪充分振荡，充分重悬混匀后，将液体转移至 2 mL 离心管中。

(3) 向每个离心管添加 500  $\mu$ L 室温保存的 Buffer P2，盖上管盖后轻轻上下颠倒 10 次，使菌体与 Buffer 充分接触裂解，此时管中液体应是清澈但粘稠的状态，混匀后置于室温静置 5 min。

(4) 向每个离心管中添加 500  $\mu$ L 的 Buffer E3，盖紧管盖立刻用力摇晃 20 次，此时管中出现白色絮状沉淀，再室温静置 5 min。

(5) 将静置结束的离心管置于室温离心机中，13000 rpm 离心 5 min，尽可能使絮状物完全沉淀或与液体尽可能分离。

(6) 每次吸取 750  $\mu$ L 的液体置于过滤柱 FM 中，再将置于收集管中的 FM 盖紧，做好标记，置于室温离心机中，13000 rpm 离心 1 min，将收集管中的液体转移至新的 2 mL 离心管中，重复上述步骤，直至所有上清都被过滤并收集。过程中需注意做好标记，并保持离心管、过滤柱、收集管三者对应。

(7) 向所收集的滤液中添加异丙醇，比例为每 500  $\mu$ L Buffer P1 对应 450  $\mu$ L 的异丙醇，对滤液中的质粒 DNA 进行沉淀。充分混匀后，室温静置 15~20 min 或 4  $^{\circ}$ C 冰箱静置 2 h。

(8) 静置即将结束时，取出对应数量的吸附柱 DL，向每个 DL 柱中添加 200  $\mu$ L Buffer PS 平衡滤膜，室温离心机 13000 rpm 离心 2 min，弃滤液。

(9) 将醇沉溶液加入已平衡的吸附柱 DL 中，每管添加 750  $\mu$ L，室温下 13000 rpm 离心 1 min，弃滤液，重复该步骤直至全部液体过滤完成。

(10) 向吸附柱 DL 中加入 750  $\mu$ L 的 Buffer PW（已添加无水乙醇），室

温 13000 rpm 离心 2 min 后，弃下层滤液，再放回离心机中，13000 rpm 离心 2 min，彻底甩干滤膜。

(11) 于通风橱中将吸附柱 DL 置于离心管中吹风 5~10 min 至完全干燥。

(12) 向滤膜中间滴加 DEPC 水 20~100  $\mu$ L，静置 5 min 后，室温 13000 rpm 离心 2 min，为提高质粒浓度及提取效率，可以将过滤的液体再加入到滤膜上静置 5 min，再次离心。

(13) 在离心管上做好基因及日期的标注，使用 Nanodrop 检测质粒的浓度，标记好浓度之后于-20 °C冰箱保存以便后续使用。