《黑龙江八一农垦大学学报》论文模板

**页面设置**：纸张为A4，页边距——上下左右均为2cm。每行45字，每页46行。

**正文字体**：五号宋体

**一级标题**：小四黑体

**二级标题**：五号黑体

**三级标题**：五号楷体

经典碱裂解法质粒大量提取方法的改良

孟雨1，李静2，李小丹1\*

(1.黑龙江八一农垦大学，大庆 163319;2.东北农业大学农学院)

摘 要：利用滤膜过滤技术对经典碱裂解法进行改良，并将改良后的提取效果与经典碱裂解法和试剂盒法进行比较。结果表明，改良法提取的质粒DNA浓度显著高于经典碱裂解法和试剂盒法，并且质粒纯度与试剂盒法相近。改良方法适用于实验室的应用与推广。

关键词：碱裂解法；质粒DNA；提取与纯化；滤膜过滤

中图分类号：Q78 文献标识码：A

The Modification of Traditional Alkaline Lysis Method for Plasmid DNA Extraction

**Meng Yu1,Li Jing2, Li Xiaodan1**

(1.Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319；2. College of Agriculture, Northeast Agricultural University)

**Abstract:** The membrane filter technique was used to modify the traditional alkaline lysis method.Comparing the effect of extraction of the modified method with traditional alkaline lysis method and reagent kit method, the results showed that the plasmid DNA isolated and purified by this method had higher concentration than the other two methods, and had similar purity with the reagent kit method. Therefore the method was more suitable for the laboratory extraction and purification of plasmid DNA for a large scale.

**Key words:** alkali lysis; plasmid DNA; isolation and purification; membrane filter

一般细胞转染等特定实验需要高浓度及高纯度的质粒DNA, 且要求DNA的A260/A280值应控制在1.8～2.0之间。虽然近些年来质粒大量提取试剂盒层出不穷，但大多费用较高，所以目前大多实验室仍以传统的手提方法为主，其中以萨姆布鲁克[1-2]提出的经典碱裂解法应用的最为广泛。但此方法却仍存在诸多弊端，例如操作复杂、耗时、所得质粒纯度低等，尤其是多次使用有机溶剂容易造成质粒DNA的污染，且易对实验人员构成危害，实验废液也会造成不同程度的环境污染[2]。因此本实验室在经典的碱裂解法基础上，采用物理方法替代化学方法去除蛋白质，从而避免了酚、氯仿等有机溶剂对实验者的危害和对环境的污染，并且对改良前后的碱裂解法及试剂盒法所制备的质粒DNA的效果进行比较。

1 材料和方法

1.1 菌株

大肠杆菌DH5α

1.2 主要试剂仪器

主要试剂:溶液Ⅰ：10 mmol·L-1 Tris-HCl,pH7.5,50 mmol·L-1 EDTA, pH8.0；灭菌后,4℃保存。溶液Ⅱ:1%SDS，0.2 mol·L-1 NaOH；现配现用，2%SDS，0.4 mol·L-1 NaOH母液等体积混均即可。溶液Ⅲ 1.32 mol·L-1醋酸钾，pH 4.8,用醋酸调节pH值。灭菌后，4 ℃保存。 STE溶液。含RNaseA 20μg·mL-1的 TE溶液。琼脂糖。质粒大量提取试剂盒。

主要仪器：0.2 μm滤膜，电泳仪DYY–8B型稳压稳流电泳仪, 核酸蛋白定量仪， Gel Doc 2000紫外凝胶成像仪系统,DK-S12电热恒温水浴锅。

1.3 实验方法

1.3.1质粒DNA的提取与纯化

大提试剂盒法:依照试剂盒说明书的步骤提取质粒DNA。

经典碱裂解法:提取方法主要按文献[1]进行。

改良的碱裂解法:（1）挑取单菌落于含Amp抗生素的LB液体培养基中，37 ℃120rpm摇菌过夜，至OD值为0.6，取50 mL菌液在冰上预冷10 min，5 000rpm离心10 min，尽量吸除上清；（2）重复步骤（1）；（3）将所得菌体沉淀用20mL冰预冷的STE洗涤一次，5 000rpm离心10 min，吸除上清；（4）向留有菌体沉淀的离心管中加入冰预冷的Ⅰ溶液2 mL，振荡悬浮菌体；（5）向离心管中加入4mL溶液Ⅱ (此过程要在冰上进行[3])，温和地上下翻转6～8次使菌体充分裂解，冰预冷3 min；（6）向离心管中加入4 mL溶液Ⅲ，立即温和地上下翻转6～8次，充分混匀，此时会出现白色絮状沉淀，5 000rpm离心10 min，吸取上清转至10mL新离心管中，5 000rpm离心10 min；（7）用注射器吸取上清，0.22 μm微孔滤膜过滤；（8）向所得滤液中加入0.7倍体积的异丙醇，轻轻颠倒振荡，置于﹣20 ℃10 min；（9）5 000rpm离心20 min，吸除上清，向离心管中加入70%的乙醇洗涤沉淀；（10）5 000rpm离心3 min，将离心管敞口置于室温或50 ℃温箱放置数分钟，目的是将离心管中残留的乙醇去除，避免残留的乙醇影响后续的实验，例如酶切、PCR等；（11）向离心管中加入200uL含RNaseA20 μg·m L-1 TE溶液溶解沉淀,37 ℃水浴10 min；（12）取相同的菌液，在相同的条件下，重复实验三次。

1.3.2质粒DNA的琼脂糖凝胶电泳检测

采用琼脂糖凝胶电泳法:制备1%琼脂糖凝胶，将三种方法所提的质粒DNA，各取3 μL进行凝胶电泳，比较三种方法提取质粒DNA的效果。

1.3.3测定质粒DNA的A260/A280值

将三种方法提取的质粒各取1 uL并稀释100倍，经核酸蛋白定量测定仪测定质粒DNA的A260/A280值和质粒DNA浓度。

2 结果与分析

2.1琼脂糖凝胶电泳结果

图1为质粒DNA的琼脂糖凝胶电泳结果：1为经典碱裂解法所提质粒，较清晰，但仍残留较多杂质；2为试剂盒所提质粒，非常清晰，基本无杂质；3为改良后的碱裂解法所提质粒，非常清晰，基本无杂质。



图1 三种方法提取质粒DNA的效果

M.marker；1. 经典碱裂解法提取的质粒；2.试剂盒法提取的质粒；

3. 改良后碱裂解法提取的质粒

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA prepared with three different methods

文章中可能涉及的其他类图：



图1不同处理马铃薯地上部干物质累积动态图 图1 乙醇浓度对黄酮得率的

Fig. 1 Change of potato above-ground dry matter Fig.1 The effect of ethanol thickness on tatle flavanone accumulation underdifferent treatments



图4 流速对黄豆酱多肽回收率的影响 图1 雪水与清水对苜蓿发芽率的影响

Fig.4 The effects of flow rate on recovery Fig .1 The effects of running water and snow melt

rate of soybean paste peptides water on afalfa germination rate



2.2三种方法提取质粒DNA的A260/A280值和浓度

表1为三种方法提取的质粒DNA浓度的比较，从表中可看出：改良后的碱裂解法提取的质粒DNA浓度明显高于经典碱裂解法及试剂盒法。表2为三种方法提取质粒DNA的A260/A280值的比较，从表中可看出：改良后的碱裂解法所提取的质粒DNA纯度均在1.8～2.0之间，明显比经典碱裂解法效果好，而与试剂盒法相差无几，符合细胞转染等特定实验的使用要求。

表1 三种方法提取质粒DNA的浓度

 Table 1 The DNA density of three method extraction material particle DNA density

|  |  |
| --- | --- |
| 方法 | 浓度/μg·mL-1 |
| 试剂盒 | 47.0643 | 46.7394 | 46.8290 |
| 经典碱裂解法 | 30.4986 | 30.5263 | 31.1362 |
| 改良后碱裂解法 | 68.9413 | 68.3840 | 68.4980 |

表2 三种方法提取质粒DNA的A260/A280值

 Table 2 The DNA A260/A280 value of three method extraction material particle

|  |  |
| --- | --- |
| 方法 | OD值A260/A280 |
| 试剂盒 | 1.9734 | 1.9442 | 1.8921 |
| 经典碱裂解法 | 1.6328 | 1.4893 | 1.4874 |
| 改良后碱裂解法 | 2.0013 | 1.9735 | 1.9836 |

3 讨论

实验在经典碱裂解法的基础上进行改良，用其他方法[4-9]提取多数都需要较长时间，而改良后的操作方法可节省时间，最重要的是以物理方法替代用有机溶剂抽提除蛋白质的化学方法。利用滤膜将蛋白质完全去除，同时用异丙醇除去小片段DNA[10]，最后用RNaseA将RNA消化掉，避免了酚、氯仿等对质粒DNA的污染，同时保障了实验者的安全。而且改良后的碱裂解法提取出的质粒DNA的浓度，明显高于试剂盒法及经典碱裂解法，其纯度更是可以与试剂盒法相媲美，并且所需费用却远远低于试剂盒的价格。此方法操作简便，用时短，摒除了酚、氯仿的使用，减少对环境的污染，绿色环保。更降低了实验成本，节省资源，可以在实验室中广泛使用，利于实验研究。

在操作过程中需要注意一些问题:(1)操作过程要认真细致，避免细菌及其他物质的污染；(2)过滤之前吸出的离心上清液要尽量减少蛋白质的含量，过滤时速度缓慢，防止滤液经滤膜边缘流过而污染过滤完的滤液；(3)根据实际情况加入足量的RNaseA，并且孵育时间充足，以防RNA消化不完全，对结果造成影响；(4)提出的质粒DNA浓度与所提菌液的新鲜度及菌液中细菌的密度有很大关系，应注意；(5)溶液Ⅱ现用现配，加入溶液Ⅱ后混匀一定要温和，以免污染细菌基因组DNA，此时菌液应变得清亮粘稠[11]，作用时间不要超过5 min，以免质粒受到破坏；(6)加入溶液Ⅲ后应立即混合，避免产生局部沉淀,如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。

讨论一定要扣准文题和结果。具体地说可参考下面5个方面进行:

1. 对结果揭示的情况作进一步的说明和解释,特别是本研究结果所具有的理论和实际意义;
2. 结合结果深入探讨与本研究相关的新方法、新理论以及预测发展趋势;

③ 比较本研究与他人研究的异同,并实事求是地指出各自的优点和不足;

④ 总结本研究的成败关键、经验和教训,客观地反映本研究的不足,包括研究中矛盾现象及尚难解决的问题;

⑤ 对进一步的研究提出建议或指出方向。

可以加二级标题。如3.1、3.2、3.3等。

4 结 论

结论是全篇的总结。要对科技论文作全面的概括,应该注意的是：结论并不仅是本文中的研究结果,而是在研究结果的基础上,进一步得出科学的结论,也即使研究由感性认识上升到理性认识。这是论文写作的重要一环,它是以正文的论述为基础,但较正文的表述更精炼、更集中、更典型、更有价值。

也可以以列出序号方式阐述。如a. b. c.等。

**参考文献类型和标志代码**

普通图书[M]、论文集、会议录[C]、汇编[G]、报纸[N]、期刊[J]、学位论文[D]、报告[R]、标准[S]、专利[P]、数据库[DB]、电子公告[EB]、联机网络[OL]。

参考文献：

[1] 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔.分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,2005.

[2] 邓云华,唐庭炼,金爱银,等.一起城市自来水酚污染事件的调查[J].环境与健康杂志,2002(3):63.

[3] Isidoro Felieiello, Ganni Chinali.A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from E.coli[J]. Analytical Biochemistry,1993,212:394-401.

[4] 陈绍兴,李沁,董艳,等.质粒DNA提取的简便方法[J].天津农业科学,2009(5):8-9.

[5] 代敏,王雄清,彭成,等.乳牛乳腺炎病原菌的质粒提取及其四环素耐药基因的扩增[J].中国兽医科学,2009(4):87-92.

[6] 王锦文,李均敏,丁丽亚,等.丙烯酞胺降解细菌质粒抽提方法的比较[J].台州学院学报,2003,25(3):58-61.

[7] 周鹤峰,邵敏,葛正龙.碱裂解法提取质粒DNA的研究[J].遵义医学院学报,2005,28(3):225-227.

[8] 姚伟,周会,徐景升,等.质粒DNA小量提取法的改进[J].应用与环境生物学报,2005,11(6):776-777.

[9] 倪志华,赵晓瑜.碱裂解提取质粒DNA的改进方法[J].河北大学学报:自然科学版,2005,25(2):321-322.

[10] R Lakshmi,V Baskar,U Ranga. Extraction of superior quality Plasmid DNA by a combination of modified alkaline lysis and Silica matrix[J].Anal Biochem,1999,272(l):109-112.

[11] S Ehrt.D Schnapp inger.lsolation of plasmids from Ecoli by alkaline lysis [J].Methods Mol Biol,2003,235:75-78.

[1] 王险峰, 关成宏, 辛明远. 我国长残效除草剂使用概况、问题及对策[J]. 农药, 2003, 42(11): 5-10.

[1] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984:54-68.

[2] O’brien J A. Introduction to information systems[M]. 7th ed. Burr Ridge, III.: Irwin, 1994.

[3] Martin G. Control of electronic resources in Australia[M]//Pattle L W, Cox B J. Electronic resources: selection and bibliographic control. New York: The Haworth Press, 1996: 85-96.

[1] 张忠智.科技书刊的角色要求[C]//中国科学技术期刊编辑论文汇编.北京:中国科学技术期刊会,1997:33-34.

[1] 苔莲梅.大豆根腐病病菌（Fusarium oxysporum）毒素及其对大豆根部致病作用的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2003:5-8.

[1] World Health Organization.Factors regulating the immune response: report of WHO Scientific Group[R].Geneva: WHO, 1970.

[1] 全国文献工作标准化技术委员会第七分委员会. GB/T 5795-1986 中国标准书号[S]. 北京:中国标准出版社,1986.

[1]萧钰.出版业信息化迈入快车道[EB/OL].(2001-12-19) [2002-04-15].http:∥www.creader.com200112190019.htm.

[1]姜锡洲.一种温热外敷药制备方案:中国,88105607.3[P]. 1989-07-26.

收稿日期：201x-0x-0x

基金项目：项目名称（项目编号）。

作者简介：姓名（出生年-），性别，职称，最终学历毕业院校，现主要从事教学与研究工作的方向。

通信作者：姓名，性别，职称，级别（硕士、博士研究生导师），联系方式：电话或E-mail。

注：请作者认真核对文章内容、基金项目、作者简介等，如有问题文责自负。