

小量細菌質體DNA的製備及其定量

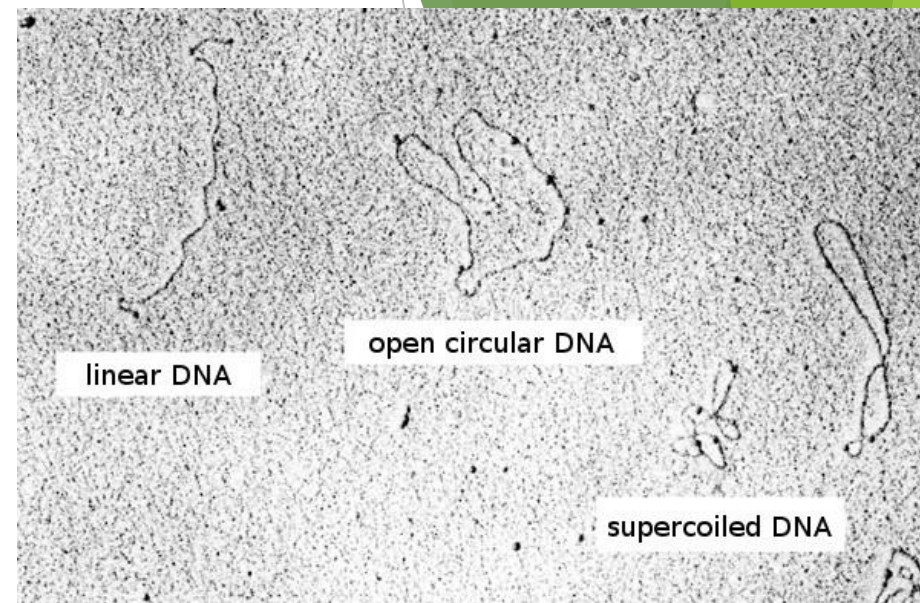
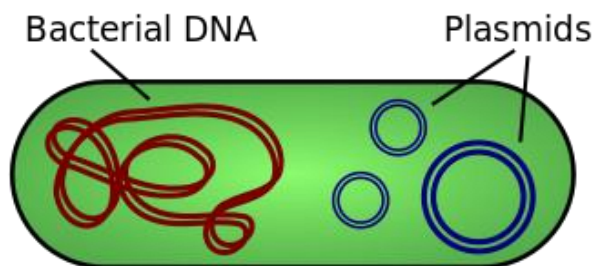
劉佩芬老師

高雄醫學大學
生物醫學暨環境生物學系

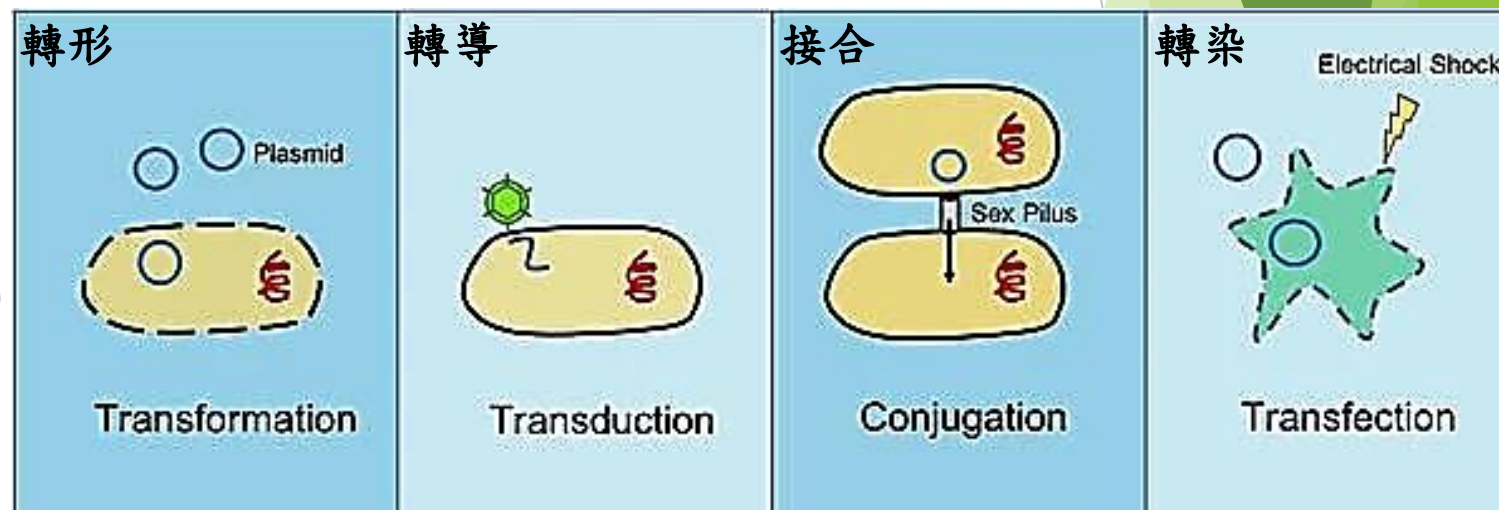
實驗背景介紹

質體DNA

- ▶ 質體是細菌染色體以外的遺傳物質，由雙股環狀DNA組成。細菌所帶質體的大小及數目不定。質體DNA可以在細菌間互相轉移，而將外來的基因轉移到其他宿主細胞中表現。因此，質體DNA的製備是分子遺傳學的一項基本而且重要的技術。
- ▶ 大部分的質體都是環狀分子，但是也有少數屬於線狀分子或出現超螺旋情況。
- ▶ 通常攜帶有利於生物體存活並賦予選擇性優勢（例如抗生素抗性）的基因。
- ▶ 用途：
 - 製造大量蛋白質 ex. 胰島素
 - 基因治療(避免細胞損傷、癌變或免疫反應)
 - 疾病模型建立



質體形狀



質體轉移方式

質體DNA製備的原理及步驟

1. 培養並收穫細菌。
2. 破壞細菌的細胞壁與外膜。
3. 破壞細胞膜使細菌裂解。
4. 移除染色體DNA。
5. 移除蛋白質與RNA。
6. 純化DNA。

鹼性溶裂法製備質體DNA

鹼性溶裂法的原理是以NaOH和SDS將細菌分解，並造成蛋白質及DNA變性，再用酸加以中和。質體DNA在中和後可以恢復原狀，而大部分細菌染色體DNA無法復原，並與SDS-K⁺所形成的複合物一起沉澱，藉由離心去除之，再以酒精或異丙醇將上清液的質體DNA沉澱，即可得到質體DNA。

細菌質體DNA萃取

↑ 萃取質體DNA的方法很多，最常用的是鹼性溶解法(alkaline lysis)及煮沸法(boiling method)。

↑ 鹼性溶解法(alkaline lysis)

- ✿ 原理是利用鹼處理質體DNA和染色體DNA，使兩者雙股打開呈單股狀態，再加入酸中和鹼使得單股DNA回復成為雙股DNA。
- ✿ 細菌以NaOH及SDS分解，並使蛋白質及DNA變性，再以酸中和。
- ✿ 質體DNA分子在中和後恢復原態，但細菌染色體DNA則無法完全復原而與SDS-K⁺形成複合物，可用離心沉澱加以去除。
- ✿ 上清液中所含的質體則可以酒精或異丙醇將其沉澱。

sodium dodecyl sulfata (SDS; 十二烷基硫酸鈉)

E. coli CELL

shows the plasmid DNA and chromosomal DNA

提高滲透壓使細胞裂解

addition of NaOH causes denaturation of plasmid DNA and chromosomal DNA

Acid addition neutralizes the base and in turn renatures the DNA and plasmid

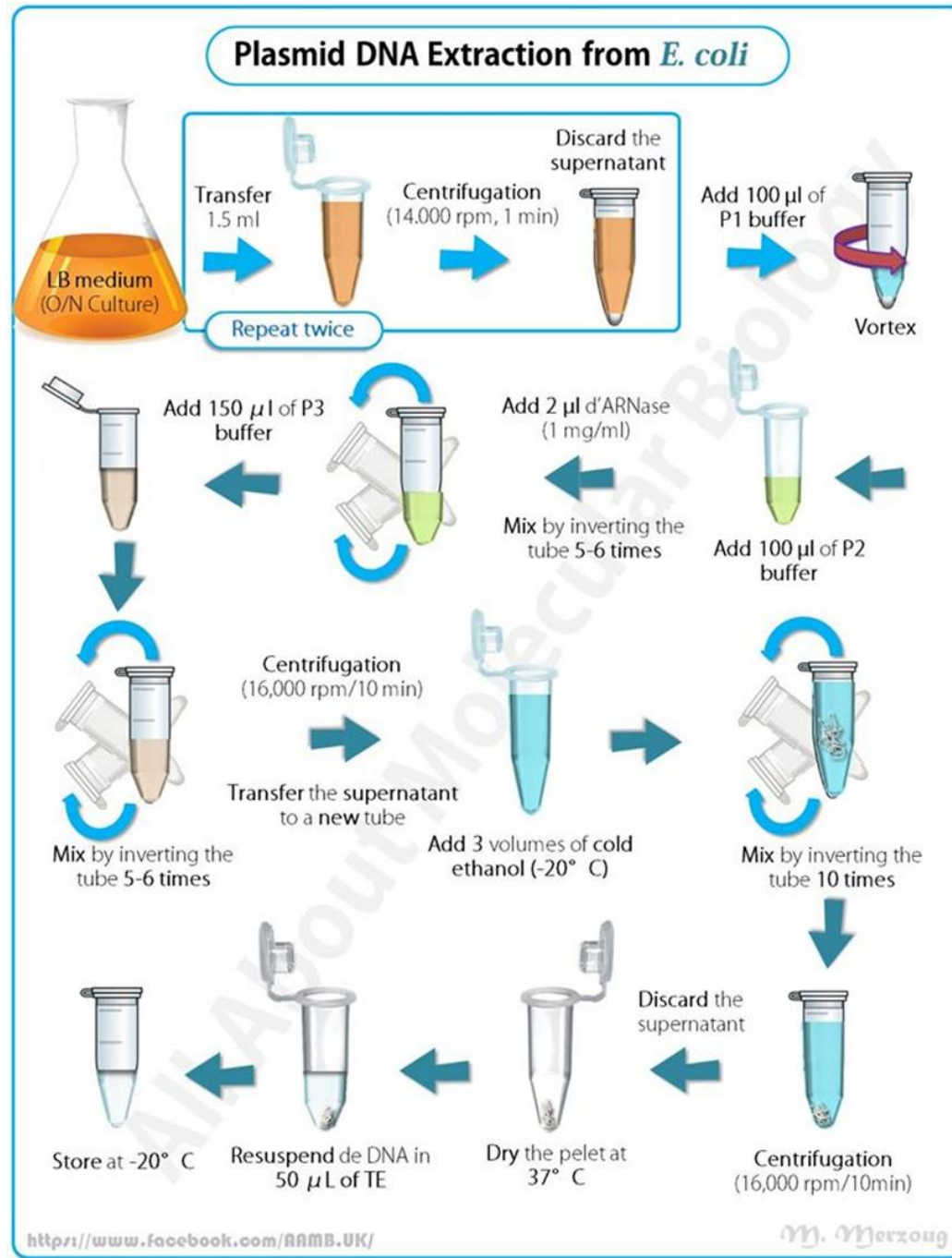
PLASMID DNA

PRECIPITATE CONTAINING CHROMOSOMAL DNA

The chromosomal DNA caught within the SDS/lipids is pellet down in centrifuge and the plasmid DNA is found in the lysate.

<http://bioinfo2010.wordpress.com/>

製備質體DNA套組



(1) **Solution 1**：將菌體懸浮於溶液中

成分	功用
25 mM Tris-HCl (pH8.0)	緩衝溶液，維持pH值穩定
10 mM EDTA	與微生物金屬離子結合，抑制DNase活性
50 mM Glucose	增加溶液黏稠度，避免菌體沉降，保持懸浮
RNase	降解溶液內RNA

(3) **Solution 3**：中和solution 2 強鹼，清除細胞內雜質

成分	功用
3M potassium acetate	與solution 2 中SDS反應，與變性蛋白質生成不溶於水之potassium dodecylsulfate (PDS)，進而去除雜質
5M acetic acid	中和強鹼

(2) **Solution 2**：將細胞裂解。注意加入solution 2後不可劇烈晃動且時間不能過長，這會使DNA斷裂。

成分	功用
250 mM NaOH	細胞膜成分為磷脂類物質，利用強鹼使酯鍵斷裂，破壞細胞膜
1% (W/V) SDS	與Solution 3反應

(4) **Washing buffer**：含有高濃度乙醇，乙醇會影響DNA品質，並抑制後續的酶作用反應，在elution前需將乙醇完全去除。

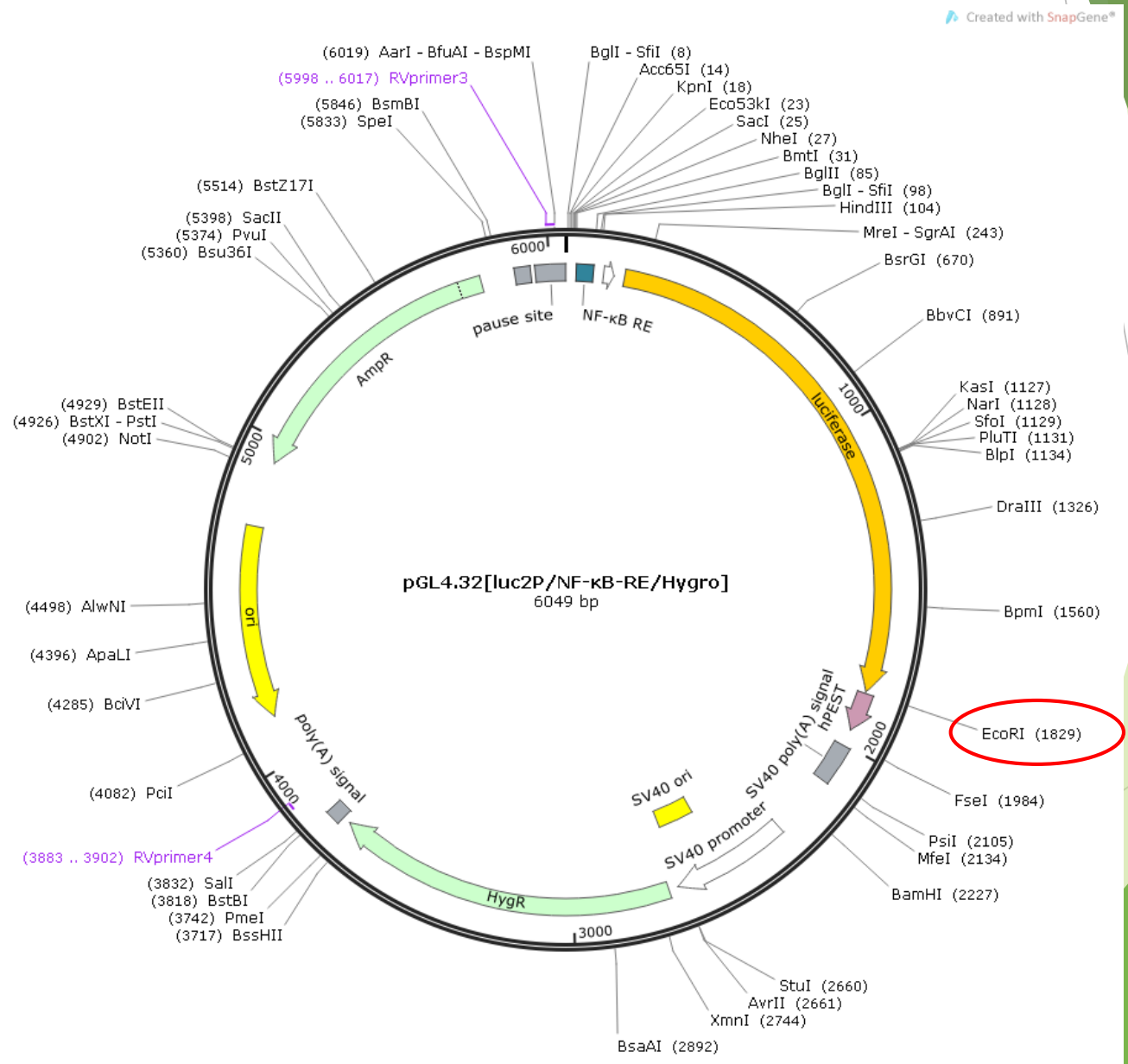
成分	功用
10 mM Tris-HCl (pH 7.5)	清洗多餘鹽類
80 % Ethanol	

(5) **Elution buffer**

成分	功用
10 mM Tris-HCl (pH 7.5)	將管柱內吸附膜上DNA沖提至乾淨離心管中

質體示意圖及multiple cloning site限制酶切位

本實驗所使用大腸桿菌 (E. coli) 宿主細胞攜帶有pGL4.32質體 (圖一)，由於pGL4.32質體帶有抗ampicillin抗藥性基因 (AmpR)，故需將細菌培養於含有ampicillin的培養基中，才能篩選出帶有pGL4.32質體的細菌。



核酸定量

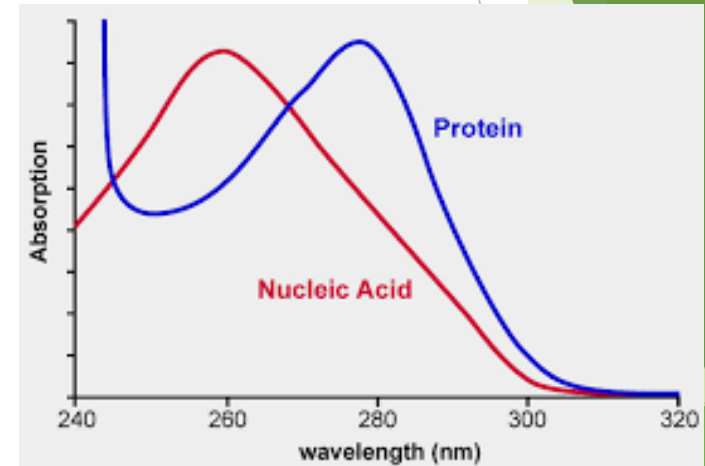
1. 以分光光度計對DNA或RNA定量時，需測260nm及280nm的吸光值。核酸和蛋白質分別在波長260nm及280nm有最大吸光值，若有任何蛋白質污染可經由280nm吸光值得知。因此， $A_{260/280}$ 比值可提供評估樣品的純度。製備DNA之 $A_{260/280}$ 比值為 1.7~1.9；製備RNA之 $A_{260/280}$ 比值為 1.8~2.0，即為好的純度。

2. 核酸之定量：

雙股DNA在UV 260nm 的吸光值= 1.0；相當於濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ 。

單股DNA在UV 260nm 的吸光值= 1.0；相當於濃度 33 $\mu\text{g/ml}$ 。

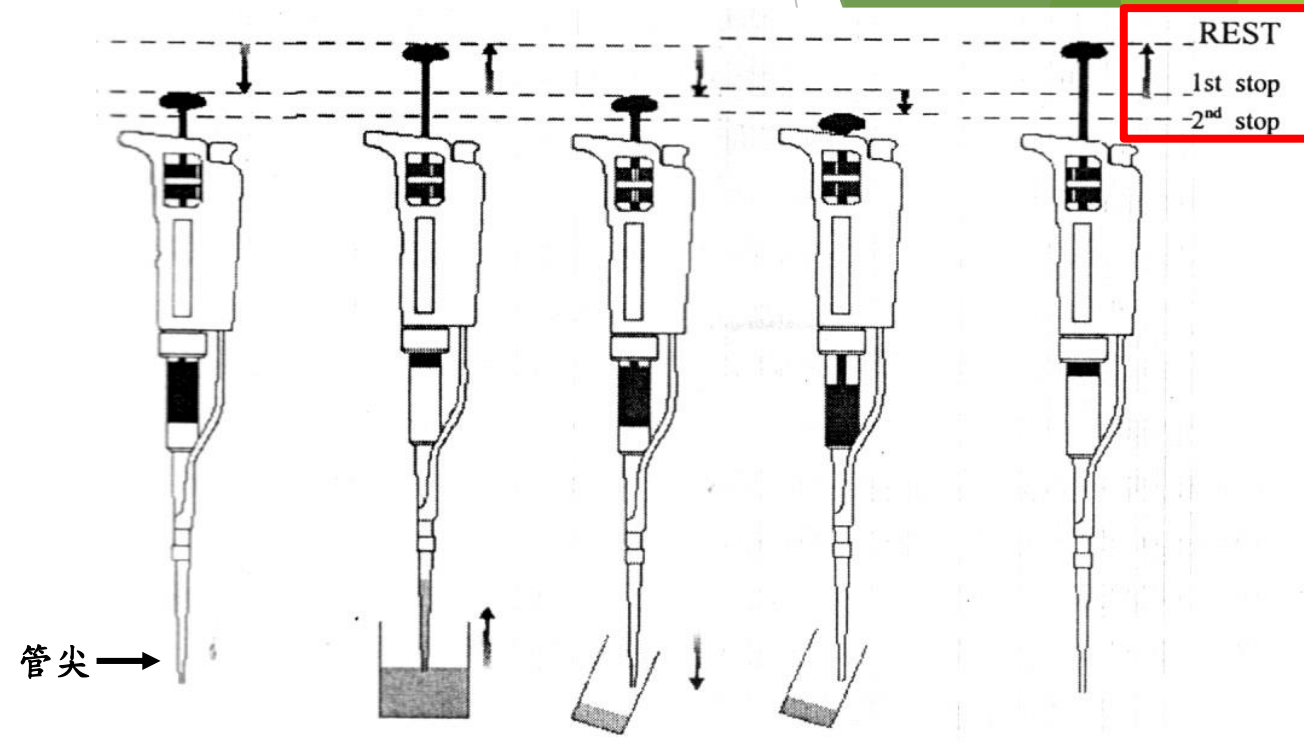
單股RNA在UV 260nm 的吸光值= 1.0；相當於濃度 40 $\mu\text{g/ml}$ 。



實驗材料與步驟介紹

微量吸管(PIPETMAN)操作要點

- 使用pipetman 前，下壓按扭數次，以做排氣動作。
- 將**管尖(tip)**裝於微量吸管柱前端，安裝時**壓緊旋轉**以確保其**密閉性**。
- 操作微量吸管時要盡量保持垂直，造成吸取液面的最小截面積。
- 管尖浸於液面下**約5 mm**，等1~2 秒待其氣壓回穩後將管尖拉離液劑。
- 從管尖排出液劑時，應將吸管尖之管口靠在容器之內壁上(傾斜10~45 度)，緩緩壓下按扭至第一段處。
- 將按扭完全按下(至第二段處)，並小心的將管尖沿著容器內壁滑動而拉離容器(如此可使試劑完全注入而不會殘留在吸管尖內)。
- 設定吸取容量碼表值，由低值旋轉至高值時，需旋轉超越所欲設定值後，再反轉至設定值；由高值旋轉至低值時，則直接旋轉至設定值即可。
- 吸取試劑時，**釋放按鈕不可過速**，以免試液衝入吸管柱內而腐蝕活塞。
- 濃稠或具黏性之試液，如血液、蛋白質、有機溶劑等，均需先行將tip預潤。切勿吸取溫度高於70°C之試劑，以免蒸汽侵入而腐蝕活塞。



儀器設備

- 桌上型離心機
- 1.5 ml 離心管
- 震盪器 (vortex)
- 微量吸管 (pipetman) ; P20 、 P200 、 P1000
- 管尖
- 微量離心管 (microcentrifuge tube)
- 核酸純化管 (Spin column)
- 37°C 水浴槽
- 分光光度計 (spectrophotometer)
- 石英測光管 (cuvette)

藥品試劑

- 隔夜培養之大腸桿菌(*E. coli* 攜帶質體pGL4.32)菌液
- 100%絕對酒精(ethanol)、70%酒精
- 碎冰
- TE緩衝液 (10mM Tris-HCl及1mM EDTA, pH8.0)
- 無菌水

溶液I

50 mM glucose
25 mM Tris-HCl (pH 8.0)
10 mM EDTA (pH 8.0)

溶液II (使用前**新鮮配製**)

0.2N NaOH
1% SDS
(1 ml 1N NaOH + 0.5 ml 10% SDS + 3.5 ml H₂O = 5 ml 溶液II)

溶液III 5M potassium acetate 60 ml
glacial acetic acid 11.5 ml
H₂O 28.5 ml

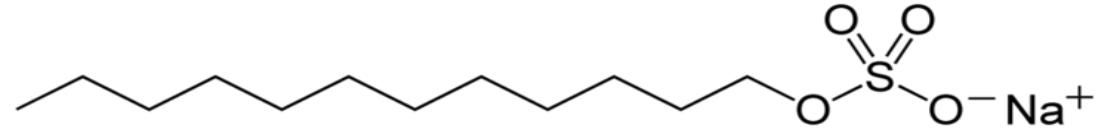
Washing buffer

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
80 % Ethanol

Elution buffer

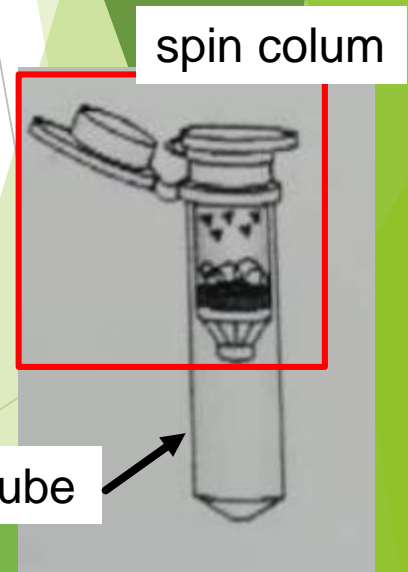
10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

10% SDS(Sodium dodecyl sulfate)



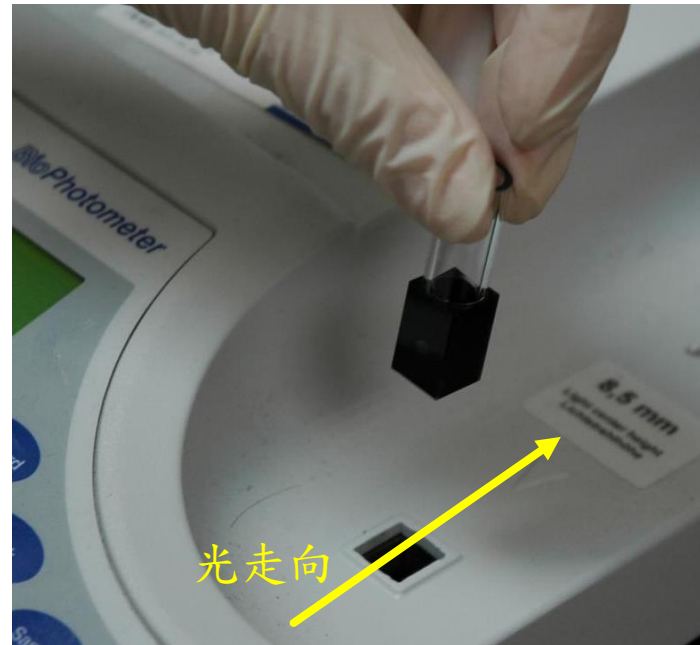
實驗步驟

- 取1.3 ml 隔夜培養的菌液置入1.5 ml 離心管中，於室溫下以12-14,000 rpm離心1分鐘，將菌體離至管底。
- 將離心管中的上清液(supernatant)抽出丟棄，**上清液需確實移除**。
- 加入200 μ l冰冷的**溶液I**，劇烈震盪(vortex)使沉澱物(pellet)再懸浮。需確定沉澱物**完全溶解**在溶液I中。
- 加入200 μ l新鮮製備的**溶液II**，上下翻轉試管10次，確定混合均勻，靜置於冰浴中5分鐘，**菌液將呈現藍色**。
- 加入300 μ l冰冷的**溶液III**，上下搖晃試管數次，確定混合均勻，此時細胞懸浮液**接近透明**。
- 以12,000 rpm離心3分鐘，將spin colum 放入tube中，小心地取上清液至spin colum中，並以最高速離心1分鐘。
- 將tube中的濾液丟棄，加入600 μ l的washing buffer，並以最高速離心1分鐘。
- 丟棄濾液，最高速離心來移除殘留的酒精。
- 將spin column移至新的微量離心管(microcentrifuge tube)並加入30 μ l的elution buffer至column中靜置2分鐘。
- 以最高速離心1分鐘來溶離(elute)DNA，去除上方column，plasmid DNA會在下方tube中。



核酸定量

- 取出 **2** μl 加水稀釋至 **198** μl ，將稀釋液裝入石英測光管，測其在 UV 260nm 及 UV 280nm 的吸光值，並估算其濃度。
- DNA 樣品名稱標示清楚後，進行後續分析或儲存於 -20°C 備用。



拿時不要碰觸光穿透面(光滑面)

課後作業(實驗報告)

實驗報告格式

- ▶ **簡介**：介紹實驗目的與原理。
- ▶ **方法和材料**：所用到的材料與實驗方法步驟。
- ▶ **結果**：DNA定量濃度與純度(A260數值, A280數值與A260/280比值)
- ▶ **討論**：實驗中發生的情況、充分討論和解釋結果、你學到什麼、你的結果有沒有錯誤、可以改進實驗的任何內容...等。
- ▶ **引用資料**：所引用到的任何資料(網站、書籍、文獻)。