



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106957842 B

(45)授权公告日 2020.05.22

(21)申请号 201710337946.0

C12R 1/19(2006.01)

(22)申请日 2017.05.15

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106957842 A

CN 102242115 A,2011.11.16,

CN 1570099 A,2005.01.26,

(43)申请公布日 2017.07.18

WO 2004069849 A2,2004.08.19,

(73)专利权人 青岛安德贝生命科技有限公司
地址 266000 山东省青岛市市北区劲松一
路200号13-1301

吴桂梅等.柱式法和磁珠法提取大肠杆菌中
质粒.《生物技术世界》.2015,

专利权人 青岛大学附属医院

审查员 李杏

(72)发明人 张进平 张晓春

(74)专利代理机构 青岛中天汇智知识产权代理
有限公司 37241

代理人 袁晓玲 刘晓

(51)Int.Cl.

C12N 15/10(2006.01)

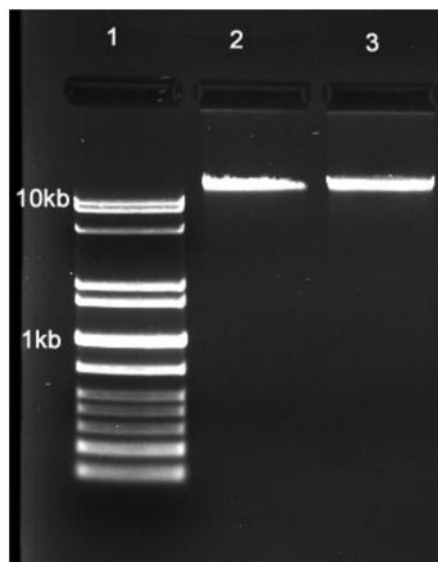
权利要求书2页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

BAC克隆DNA的提取方法

(57)摘要

本发明涉及分子生物学和分子遗传学及细胞生物学领域,特别涉及到DNA的提取和纯化方法。本发明采用了磁珠分离与分子筛过滤技术,结合蛋白酶消化技术,发明了BAC克隆DNA的稳定提取方法。本发明利用优化的悬浮、裂解、中和缓冲液获取粗制DNA沉淀;经重悬DNA沉淀,在适宜的pH和离子浓度下,将DNA多聚核苷酸大分子非特异性和可逆地结合到磁性纳米材料的官能基团;通过快速结合、清洗步骤,去除裂解过程的离子、蛋白、糖类等污染物和小分子等杂质;经蛋白酶进一步消化、纯化和过滤装置的浓缩后产生出纯化的DNA产物。本发明操作简单稳定、经济高效、无毒无污染。本发明具备优良的扩展性,能实现标准化的试剂盒套装系列产品和全自动化操作。



1. 一种BAC克隆DNA的提取方法,其特征在于,其主要步骤包括:

(1) BAC克隆大肠杆菌培养:于2mL的LB培养液中加入微量E. coli (大肠杆菌) BAC克隆的冻存原液并进行初始培养4至6小时,从初始培养液中制作克隆平盘,从过夜培养的平盘中挑取克隆并植入500mL含相应抗生素的LB培养液中过夜培养;

(2) 细菌裂解:将500mL的大肠杆菌培养液进行离心,获取细菌沉淀物,细菌沉淀再经过悬浮,裂解,中和,离心,去除大部分裂解后的杂质,抽取其中上清;

(3) DNA沉淀:将含有DNA的上清液与0.7倍于上清液体积的异丙醇混合并离心,获取DNA粗制沉淀物;

(4) 第一次抽提、清洗:DNA粗制沉淀物经TE缓冲液悬浮后与磁珠混合,清洗磁珠,获取较纯DNA;

(5) 第二次抽提、清洗:将步骤(4)获得的DNA再经磁珠纯化;

(6) DNA再纯化及浓缩:经磁珠提取的DNA进一步通过10kD超滤离心管浓缩,去除微量盐、低分子量核酸与蛋白杂质,最终获取高质量高纯度DNA产物。

2. 根据权利要求1所述的BAC克隆DNA的提取方法,其特征在于,在进行步骤(5)第二次抽提、清洗之前,将步骤(4)得到的DNA加入蛋白酶消化液,经酶反应消化残存蛋白质。

3. 根据权利要求1或2所述的BAC克隆DNA的提取方法,其特征在于,所述步骤(2)将500mL大肠杆菌培养液平均倒入两只500ml离心管中,4°C在7000xg离心力下离心10分钟;向细菌沉淀物中分别加入6ml细菌悬浮缓冲液,在高速振荡器上用移液管将菌体沉淀搅散,最后用移液枪与10ml移液管彻底将菌体打散、悬浮,将打散后的菌体转移至两只50ml离心管中;向离心管中分别加入6ml细菌裂解液,轻轻反转4至5次,于室温静置3至5分钟,立即向裂解中的菌体分别加入6ml中和液,轻轻反转混匀4至5次,放置于冰上,3至5分钟后至菌体絮状物完全由棕色转为白色,将离心管安置于离心转子,于4°C以12000xg离心10分钟。

4. 根据权利要求3所述的BAC克隆DNA的提取方法,其特征在于,所述步骤(2)去除裂解后的杂质的具体方法为:将离心后的离心管置于冰上,用移液管抽取离心管中的上清液,将所有上清液逐次转移到过滤管中,上清液在重力作用下经过过滤管底部的棉纱过滤后自然流到50mL离心管中,直至所有上清全部收集于离心管中;所述过滤管的制作步骤为:取10ml注射器,用剪刀剪出5平方厘米的医用灭菌脱脂棉纱,并用注射器推塞填塞于注射器内底部,然后拔掉推塞;所述过滤管固定设置在50mL离心管内,喷口朝向50mL离心管。

5. 根据权利要求4所述的BAC克隆DNA的提取方法,其特征在于,所述步骤(3)获取DNA粗制沉淀物的具体方法为:计算离心管中的上清液体积,按照上清液体积的0.7倍向离心管中加入纯异丙醇,将离心管安置于离心转子,于4°C以4000xg离心15分钟,将离心后的DNA沉淀弃去上清液后,再以4000xg离心1分钟,弃去上清液,获得半透明状DNA初步提取后的沉淀物,立即向DNA沉淀物中加入500 μ l TE缓冲液并用移液枪将沉淀物悬浮溶解于TE缓冲液中。

6. 根据权利要求5所述的BAC克隆DNA的提取方法,其特征在于,所述步骤(4)将DNA悬浮液转移至900 μ l (1.8x) Agencourt XP磁珠中,反转并充分混匀后于室温下静置5分钟,使DNA与磁珠充分结合;袖珍台式离心机离心2秒后放置于磁力架,静置3至5分钟;用移液枪或负压弃去所有上清液,加入1ml 70%的酒精,合上离心管盖,在磁力架上旋转3至4次离心管,弃去酒精,再次加入新鲜的1ml 70%酒精,重复一次清洗过程;磁珠清洗2次后,弃去酒精,将磁珠离心后再次安放于磁力架,用移液枪彻底弃去残存酒精;于室温下静置30分钟,或于

37℃加热盘中加温5分钟再静置于磁力架,直到磁珠团块因干燥开始出现出细小的裂缝;向干燥后的磁珠加入200 μ l 65℃预热的TE缓冲液,充分混匀、离心后置于磁力架5分钟,抽取上清,转移至1.5ml实验管,其中含有洗提出的DNA;再次加入200 μ l 65℃预热的TE缓冲液抽提磁珠,充分混匀、离心后置于磁力架5分钟,抽取上清,合并提取的DNA上清液。

7. 根据权利要求6所述的BAC克隆DNA的提取方法,其特征在于,所述步骤(5)将第一次提取的DNA溶液转至650 μ l (1.6x) Agencourt XP磁珠中,混匀后于室温静置5分钟,轻轻离心后放置于磁力架,静置3至5分钟;用移液枪或负压弃去所有上清液,加入1ml 70%的酒精,合上离心管盖,在磁力架上旋转3至4次离心管,弃去酒精,再次加入新鲜的1ml 70%酒精,重复一次清洗过程;磁珠清洗2次后,弃去酒精,将磁珠离心后再次安放于磁力架,用移液枪彻底弃去残存酒精;于室温下静置30分钟,或于37℃加热盘中加温5分钟再静置于磁力架,直到磁珠团块因干燥开始出现出细小的裂缝;向干燥后的磁珠加入200 μ l 65℃预热的TE缓冲液,充分混匀、离心后置于磁力架5分钟,抽取上清,转移至1.5ml实验管,其中含有洗提出的DNA;再次加入200 μ l 65℃预热的TE缓冲液抽提磁珠,充分混匀、离心后置于磁力架5分钟,抽取上清,合并提取的DNA上清液。

8. 根据权利要求7所述的BAC克隆DNA的提取方法,其特征在于,所述步骤(6)将抽取的DNA溶液转移至0.5mL 10kD超滤离心管中,于4℃以14000xg离心10分钟,去掉滤过液,再次向柱芯中加入TE缓冲液至400 μ l,上下轻摇混匀后再次离心10分钟,观察离心柱芯的体积刻度,直到液面水平低于100 μ l后停止离心;反转离心内芯于一新的收集管中,14000xg离心1分钟收集DNA浓缩液。

BAC克隆DNA的提取方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学和分子遗传学及细胞生物学领域,特别涉及到DNA的提取和纯化方法。

背景技术

[0002] 近十几年来,分子生物学和细胞遗传学发展迅速,涉及DNA的测序、克隆、功能分析及鉴定的技术在医学、农林业、环境、海洋、法医学等领域得到广泛而深入的应用。BAC (bacterial artificial chromosome) 克隆是当前存储、扩增DNA大片断,特别是基因组DNA大片断的主要方法。BAC克隆长度一般在100kb至300kb不等。由于BAC克隆插入DNA片断较大,转染大肠杆菌后所产生的拷贝数较低。无论是现有的离子交换柱法,还是手工方法提取均有一些缺陷和难于克服的困难。

[0003] 现有提取与纯化方法仍主要采用离子交换柱分离方法。如QIAGEN公司的Plasmid Maxi Kit (CatNo.12163)、Omega Bio-tek公司的E.Z.N.A.® BAC/PAC DNA Maxi Kit (D2154-01),这些商用化试剂盒一般能够满足日常试验中低于10ug和片断大小低于100kb的提取需要。离子交换柱提取法所收获的DNA产量一般较低,特别在大片断DNA提取过程中,有时很不理想。同样,大容量的商业化提取试剂盒价格一般较高昂。有些试剂盒在某种程度上也存在可靠性与稳定性的问题。

[0004] 为克服柱法提取的问题,同时为了节省成本,不少研究与应用技术人员采用了手工操作的方法提取DNA,但其中多数方法中应用了酚、氯仿等有毒有害的有机溶剂,对实验人员和环境危害很大。同时,手工提取过程也极易导致DNA产物被有机溶剂污染,直接影响下游实验。

[0005] 采用传统的手工抽提,DNA的降解程度高,一般从500ml培养液中其DNA产物量远低于10ug。DNA降解后的小分子片段也会影响DNA计量的准确性。图1为应用碱性裂解法,然后用苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)混合物提纯,最后用异丙醇(isopropyl alcohol)沉淀出的DNA结果。从图1中可以很明显地观察到在低于100bp的位置存在了大量的DNA降解后的小分子片断。这些小分子片断会造成260nm处核酸吸光值超常放大,从而在分光光度计位于260nm处的吸光值呈现出异常高的数值,使260/280及260/230的比值呈现出远大于正常量的情况。这种不正常的260读数会导致DNA计量的错误。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服上述大片段DNA提取过程存在的DNA易水解、数量少、易污染、成本高的问题,提供一种从大体积BAC克隆细菌培养液中提取质量高、数量充分、无毒、无污染、成本低的DNA的提取技术,从根本上解决BAC克隆大片断DNA的提取纯化问题,同时提供了自动化纯化大片断DNA的可能性。

[0007] 本发明是采用以下的技术方案实现的:

[0008] 一种BAC克隆DNA的提取方法,其主要步骤包括:

[0009] (1) BAC克隆大肠杆菌培养:于2mL的LB培养液中加入微量E. coli (大肠杆菌) BAC克隆的冻存原液并进行初始培养4至6小时,从初始培养液中制作克隆平盘,从过夜培养的平盘中挑取克隆并植入500mL含相应抗生素的LB培养液中过夜培养;

[0010] (2) 细菌裂解:将500mL的大肠杆菌培养液进行离心,获取细菌沉淀物,细菌沉淀再经过悬浮,裂解,中和,离心,去除大部分裂解后的杂质,抽取其中上清;

[0011] (3) DNA沉淀:将含有DNA的上清液与一定体积的异丙醇混合并离心,获取DNA粗制沉淀物;

[0012] (4) 第一次抽提、清洗:DNA粗制沉淀物经TE缓冲液悬浮后与一定比例的磁珠混合,清洗磁珠,获取较纯DNA;

[0013] (5) 第二次抽提、清洗:将步骤(4)获得的DNA再经一定比例的磁珠纯化;

[0014] (6) DNA再纯化及浓缩:经磁珠提取的DNA进一步通过10kD超滤离心管浓缩,去除微量盐、低分子量核酸与蛋白杂质,最终获取高质量高纯度DNA产物。

[0015] 上述技术方案,进一步地,在进行步骤(5)第二次抽提、清洗之前,将步骤(4)得到的DNA加入蛋白酶消化液,经酶反应消化残存蛋白质。

[0016] 上述技术方案,进一步地,所述步骤(2)将500mL大肠杆菌培养液平均倒入两只500ml离心管中,4℃在7000xg离心力下离心10分钟;向细菌沉淀物中加入6mL细菌悬浮缓冲液,在高速振荡器上用移液管将菌体沉淀搅散,最后用移液枪与10mL移液管彻底将菌体打散、悬浮,将打散后的菌体转移至两只50mL离心管中;向离心管中加入6mL细菌裂解液,轻轻反转4至5次,于室温静置3至5分钟,立即向裂解中的菌体加入6mL中和液,轻轻反转混匀4至5次,放置于冰上,3至5分钟后至菌体絮状物完全由棕色转为白色,将离心管安置于离心转子,于4℃以12000xg离心10分钟。

[0017] 上述技术方案,进一步地,所述步骤(2)去除裂解后的杂质的具体方法为:将离心后的离心管置于冰上,用移液管抽取离心管中的上清液,将所有上清液逐次转移到过滤管中,上清液在重力作用下经过过滤管底部的棉纱过滤后自然流到50mL离心管中,直至所有上清全部收集于离心管中;所述过滤管的制作步骤为:取10mL注射器,用剪刀剪出5平方厘米的医用灭菌脱脂棉纱,并用注射器推塞填塞于注射器内底部,然后拔掉推塞;所述过滤管固定设置在50mL离心管内,喷口朝向50mL离心管。

[0018] 上述技术方案,进一步地,所述步骤(3)获取DNA粗制沉淀物的具体方法为:计算离心管中的上清液体积,按照上清液体积的0.7倍向离心管中加入纯异丙醇,将离心管安置于离心转子,于4℃以4000xg离心15分钟,将离心后的DNA沉淀弃去上清液后,再以4000xg离心1分钟,弃去上清液,获得半透明状DNA初步提取后的沉淀物,立即向DNA沉淀物中加入500μL TE缓冲液并用移液枪将沉淀物悬浮溶解于TE缓冲液中。

[0019] 上述技术方案,进一步地,所述步骤(4)将DNA悬浮液转移至900μL (1.8x) Agencourt XP磁珠中,反转并充分混匀后于室温下静置5分钟,使DNA与磁珠充分结合;轻轻离心后放置于磁力架,静置3至5分钟;用移液枪或负压弃去所有上清液,加入1mL 70%的酒精,合上离心管盖,在磁力架上旋转3至4次离心管,使磁珠充分于酒精中清洗,弃去酒精,再次加入新鲜的1mL70%酒精,重复一次清洗过程;磁珠清洗2次后,弃去酒精,将磁珠离心后再次安放于磁力架,用移液枪彻底弃去残存酒精;于室温下静置30分钟,或于37℃加热盘中加温5分钟再静置于磁力架,直到磁珠团块因干燥开始出现细小的裂缝;向干燥后的磁珠

加入200 μ L 65 $^{\circ}$ C预热的TE缓冲液,充分混匀、离心后置于磁力架5分钟,抽取上清,转移至1.5mL实验管,其中含有洗提出的DNA;再次加入200 μ L 65 $^{\circ}$ C预热的TE缓冲液抽提磁珠,充分混匀、离心后置于磁力架5分钟,抽取上清,合并提取的DNA上清液。

[0020] 上述技术方案,进一步地,所述步骤(5)将第一次提取的DNA溶液转至650 μ L (1.6x) Agencourt XP磁珠中,混匀后于室温静置5分钟,使DNA与磁珠充分结合;轻轻离心后放置于磁力架,静置3至5分钟;用移液枪或负压弃去所有上清液,加入1mL 70%的酒精,合上离心管盖,在磁力架上旋转3至4次离心管,使磁珠充分于酒精中清洗,弃去酒精,再次加入新鲜的1mL 70%酒精,重复一次清洗过程;磁珠清洗2次后,弃去酒精,将磁珠离心后再次安放于磁力架,用移液枪彻底弃去残存酒精;于室温下静置30分钟,或于37 $^{\circ}$ C加热盘中加温5分钟再静置于磁力架,直到磁珠团块因干燥开始出现细小的裂缝;向干燥后的磁珠加入200 μ L 65 $^{\circ}$ C预热的TE缓冲液,充分混匀、离心后置于磁力架5分钟,抽取上清,转移至1.5mL实验管,其中含有洗提出的DNA;再次加入200 μ L 65 $^{\circ}$ C预热的TE缓冲液抽提磁珠,充分混匀、离心后置于磁力架5分钟,抽取上清,合并提取的DNA上清液。

[0021] 上述技术方案,进一步地,所述步骤(6)将抽取的DNA溶液转移至0.5mL 10kD超滤离心管中,于4 $^{\circ}$ C以14000xg离心10分钟,去掉滤过液,再次向柱芯中加入TE缓冲液至400 μ L,上下轻摇混匀后再次离心10分钟,观察离心柱芯的体积刻度,直到液面水平低于100 μ L后停止离心;反转离心内芯于一新的收集管中,14000xg离心1分钟收集DNA浓缩液。

[0022] BAC克隆DNA的裂解与清洗过程是关键的一环。DNA提取失败往往是由于在此环节没有掌握好所致。发明过程中发现,细菌悬浮液在加入碱性裂解液之后,裂解时间过长,裂解反应温度过高,裂解出的DNA被快速水解,反映在琼脂糖凝胶中,存在大量的拖带或小分子聚集带。因此,在加入裂解液后的步骤中要尽可能缩短反应时间。最后要用对DNA有一定保护作用的TE缓冲液彻底替换掉抽提过程应用的试剂或产生的污染物,从而降低DNA水解程度。

[0023] 本发明采用了磁珠分离与分子筛过滤技术,结合蛋白酶消化技术,发明了BAC克隆DNA的稳定提取方法。本发明涉及经过优化的提取缓冲液系统,磁珠结合,蛋白酶消化,小分子分离,浓缩等关键性步骤;利用优化的悬浮、裂解、中缓冲液,配合离液剂、离子获取粗制DNA沉淀;经重悬DNA沉淀,在适宜的pH和离子浓度下,将DNA多聚核苷酸大分子非特异性和可逆地结合到磁性纳米材料的官能基团,例如羧基、硅基,通过快速结合、清洗步骤,去除裂解过程的离子、蛋白、糖类等污染物和小分子等杂质。

[0024] 本发明的方法能够有效提取片断大于10kb以上的DNA,所处理的体积通常为常规100ml至500mL细菌培养液;可从大体积培养液中有效去除高盐、蛋白、糖及小分子杂质,在很大程度上提高了DNA纯化过程的稳定性和产物质量,有效地克服了提取过程DNA的大量降解;提取的DNA质量高、数量充分,每500mL培养液可稳定获得50至100微克高纯度DNA;不采用酚、氯仿等有毒有害的有机溶剂,对实验人员和环境友好,不会对DNA产物产生有机溶剂污染;操作简单稳定、经济高效;具备优良的扩展性,能实现标准化的试剂盒套装系列产品和全自动化操作;从根本上解决了涉及DNA分析,特别是基因组DNA分析实验所面临的一个亟需解决的BAC克隆大片断DNA的提取纯化问题,对于满足DNA分子探针标记及其产业对大片断DNA的需求极有意义。

附图说明

- [0025] 图1是为应用碱性裂解法提取的DNA琼脂糖凝胶电泳图；
- [0026] 图2是实施例简易过滤装置的结构示意图；
- [0027] 其中,1、过滤管;2、离心管;3、脱脂棉纱；
- [0028] 图3是实施例过滤裂解杂质后得到的DNA沉淀物的状态图；
- [0029] 图4是磁珠团块因干燥开始出现出细小的裂缝时的状态图；
- [0030] 图5是采用实施例的方法提取的BAC DNA琼脂糖凝胶电泳图。

具体实施方式

[0031] 为了能够更加清楚地理解本发明的上述目的、特征和优点,下面结合附图及实施例对本发明做进一步说明。

[0032] 实施例

[0033] 1.主要设备与试剂材料

[0034] 落地式离心机:ThermoSorval RC 6+离心机及转子F12-6x500,F13-14x50cy

[0035] 台式4℃离心机:Eppendorf 5424R

[0036] 常规袖珍离心机

[0037] 37℃孵育箱

[0038] 37℃细菌培养摇床

[0039] 50mL离心管:Thermo Scientific,339653

[0040] 1.5mLEppendorf离心管,无DNase (脱氧核糖核酸酶) 与RNase (核糖核酸酶)。

[0041] 超滤离心管:Merck Millipore,Amicon Ultra 0.5mL Centrifuge Filters, Ultracel 10K

[0042] LB细菌培养液:将下列试剂加入到800mL去离子纯水中,10g Bacto-tryptone,5g yeast extract,10g NaCl,用NaOH调整pH到7.5,然后加入去离子纯水至1升。高温消毒备用。

[0043] 抗生素工作液:按照BAC克隆相应抗生素要求,稀释抗生素粉剂至所需要浓度。如BAC克隆一般使用氯霉素,可称量一定量粉剂氯霉素抗生素用100%酒精稀释至50mg/mL,常规培养液中加入至终浓度为12.5μg/ml。

[0044] 细菌悬浮缓冲液(TE缓冲液):溶解6.06g Tris和3.72g Na₂EDTA·2H₂O于800mL去离子纯水中,用HCL调整pH至8.0,然后加水至1升。加入100mg RNase A至终浓度为100μg/mL。加入RNase A后的悬浮缓冲液要置于4℃保存。

[0045] 细菌裂解液:溶解8.0g NaOH颗粒至900mL去离子纯水中,最后加入50mL 20%SDS (w/v),最后加水至1000mL。

[0046] 中和液:于500mL去离子纯水中溶解294.5g Potassium Acetate,然后约110mL冰醋酸调整pH至5.5,最后加水至1升。

[0047] 核酸纯化试剂盒:Agencourt AMPure XP,60mL,A63881,Beckman Coulter

[0048] 蛋白酶K溶液:(20mg/mL) x5,RNA grade,25530049,Thermo Fisher

[0049] 2.BAC克隆大肠杆菌培养

[0050] (1)单克隆选择平盘制备:在250mL的消毒瓶中加入2g琼脂糖粉剂,再加入100mL

LB培养液,混匀;210℃高温高压消毒20分钟后冷却至50℃后,迅速加入终浓度为12.5ug/mL的氯霉素。在超净工作台混匀后迅速倒入约9个10mL培养平盘中,每个盘约倒入10mL,室温下完全冷却并存放于4℃冷藏箱备用。

[0051] (2) 于10mL圆底细菌培养管中加入2mL LB培养液,加入相应氯霉抗生素至终浓度12.5ug/ml。

[0052] (3) 将冻存于-80℃的BAC克隆转移至干冰上并始终保持冷冻状态,用消毒后的200μL或1mL移液头蘸取少量冻存液,并转移至2mL LB培养液中。

[0053] (4) 将已加入BAC克隆大肠杆菌的培养管移至37℃/每分250转的摇床中培养约6-8小时,培养至略有混浊的透明状态。

[0054] (5) 按1比10000比例用LB培养液稀释BAC克隆培养液。例如,先取10μL培养液加入到990μL LB培养液中,混匀后再从中取10μL加入到990μL新鲜的LB培养液中。

[0055] (6) 将接种牙签或接种环插入到稀释后的克隆培养液中,然后用接种环在培养平盘的两个平分区域顺次轻轻划线。一次接种一个平盘。

[0056] (7) 将接种后的平盘倒置后于37℃孵育箱中过夜培养20小时至单克隆菌落形成。单克隆菌落形成后的平盘用parafilm或保鲜膜密封,平盘要倒置于4℃冷藏冰箱保存。保存与使用期一般不超过5天。

[0057] (8) 在容积为1000mL三角培养瓶中加入500mL LB培养液,在培养液中并加入终浓度为12.5ug/mL氯霉素,轻摇后混匀。从BAC克隆平盘中挑取单克隆菌落并接种至三角培养瓶中的LB培养液中。用锡箔纸封好三角培养瓶口。轻轻摇匀后固定于37℃、每分260转的培养摇床中培养。细菌培养至呈浅白色约80%的融合态。培养时间通常不超过20小时。

[0058] 3. 细菌裂解与DNA沉淀

[0059] 将培养约20小时的500mL细菌培养物平均倒入两只500mL离心管中,平衡后放置于离心转子(F12-6x500LEX)中,于离心机(Sorvall RC 6+, Thermo Scientific)4℃用7000xg离心10分钟。

[0060] 离心完成后,弃去上清,保留沉淀菌体。此时也可将沉淀物与离心管一起于-20℃保存备用。

[0061] 向离心后的菌体分别加入6mL细菌悬浮缓冲液,在高速振荡器上用移液管将菌体沉淀搅散,最后用移液枪与10mL移液管彻底将菌体打散、悬浮。将打散后的菌体转移至两只50mL(Thermofisher, 339653)离心管中。

[0062] 向离心管中加入6mL细菌裂解液,轻轻反转4至5次,于室温静置不超过5分钟。

[0063] 立即向裂解中的菌体加入6mL中和液,轻轻反转混匀4至5次,放置于冰上,约3至5分钟后至菌体絮状物完全由棕色转为白色。

[0064] 将离心管安置于离心转子(F13-14x50cy),于4℃以12000xg离心10分钟。

[0065] 在离心间隙,用10mL注射器和50mL离心管制作一只简易过滤装置。用剪刀剪出约5平方厘米一小片医用灭菌脱脂棉纱并用注射器推塞填塞于注射器内底部,然后拔掉推塞,用胶带纸将制作的过滤管装置粘贴于50mL离心管中,注意注射器的喷口朝向离心管内,如图2所示。

[0066] 将离心后的离心管小心置于冰上,用10mL移液管小心抽取2只离心管中的上清液,注意尽量不要取到絮状沉淀物。将所有上清液逐次转移到过滤管中,让上清液在重力作用

下通过注射器底部的棉纱过滤后自然流到50mL离心管中,直至所有上清全部收集于离心管中,弃去过滤装置。经过本装置过滤后能够去除大部分裂解后肉眼所见的杂质。

[0067] 计算离心管中的上清液体积,按照上清液体积的0.7倍向离心管中加入纯异丙醇。比如,如过滤后的上清液总体积为25mL,应加入100%的异丙醇17.5mL,最终异丙醇含量为41%,最后总体积为42.5mL。

[0068] 将离心管安置于离心转子(F13-14x50cy),于4℃以4000xg离心15分钟。

[0069] 离心间隙,向一只2mL low binding离心管中加入涡旋混匀的900μL Agencourt XP磁珠,桌面离心机轻轻离心后,置于室温下备用。应至少在使用前10分钟准备好。

[0070] 将离心后的DNA沉淀小心弃去上清液后,再以4000xg离心1分钟,用移液器尽量弃去上清。此时离心管底部侧壁有半透明状DNA初步提取后的沉淀物,如图3所示,箭头所指为DNA初步提取后的沉淀物。此时要特别注意不能将离心管长时间置于室温下,以免DNA降解。

[0071] 4. 第一次抽提、清洗

[0072] 立即向DNA沉淀物中加入500μL TE缓冲液并用1000μL移液枪将沉淀物悬浮溶解于TE缓冲液中。

[0073] 将500μL DNA悬浮液转移至已经于室温下备好的900μL (1.8x) Agencourt XP磁珠中,反转并充分混匀后于室温下静置5分钟,使DNA与磁珠充分结合。

[0074] 用常规袖珍离心机离心2秒钟,后放置于磁力架(DynaMag™-2Magnet, ThermoFisher, 12321D),静置3至5分钟。

[0075] 用移液枪或负压弃去所有上清液,加入1mL 70%的酒精,合上离心管盖,在磁力架上旋转3至4次离心管,使磁珠充分于酒精中清洗。最后弃去酒精,再次加入新鲜的1mL 70%酒精,重复一次清洗过程。

[0076] 磁珠清洗2次后,弃去酒精,将磁珠离心后再次安放于磁力架,用移液枪彻底弃去残存酒精。于室温下静置30分钟以上,或于37℃加热盘中加温5分钟再静置于磁力架,直到磁珠团块因干燥开始出现细小的裂缝,如图4所示。

[0077] 向干燥后的磁珠加入200μL 65℃预热的TE缓冲液,充分混匀、离心后置于磁力架5分钟,小心抽取上清,转移至1.5mL实验管,其中含有洗提出的DNA。再次加入200μL 65℃预热的TE缓冲液抽提磁珠,充分混匀、离心后置于磁力架5分钟,抽取上清。合并提取的DNA上清液,总体积为400μL。

[0078] 5. 蛋白酶消化

[0079] 本步骤可作为选项。由于DNA抽提液中仍可能存在一定量的组蛋白、酶、糖等残留,为后续实验考虑,可作进一步的蛋白酶消化处理以去除残余蛋白质。

[0080] 向抽提出的400μL DNA抽提液中加入10μL浓度为20mg/mL的Proteinase K溶液,混匀后于37℃水浴箱中温浴4小时。

[0081] 6. 第二次抽提、清洗

[0082] 于2mL low binding离心管中加入650μL (1.6x) Agencourt XP磁珠,室温静置备用。

[0083] 将第一次提取的DNA溶液或Proteinase K处理后的DNA抽提液转至650μL磁珠中,混匀后于室温静置5分钟。

[0084] 将静置后的磁珠轻轻离心后放置于磁力架,静置3至5分钟。

[0085] 用移液枪或负压弃去上清,加入1mL70%的酒精,合上离心管盖,在磁力架上旋转3至4次离心管,使磁珠充分于酒精中清洗。弃去酒精,再次加入新鲜的1mL 70%酒精,重复一次清洗过程。

[0086] 磁珠清洗2次后,弃去酒精,将磁珠离心后再次安放于磁力架,用移液枪彻底弃去残存酒精。于室温下静置30分钟以上,或于37℃加热盘中加温5分钟再静置于磁力架,直到磁珠团块因干燥呈现出细小的裂缝。

[0087] 向干燥后的磁珠加入200μL65℃预热的TE缓冲液,充分混匀,离心后置于磁力架5分钟,小心抽取上清,转移至1.5ml实验管,其中含有洗提出的DNA。再次加入200μL65℃预热的TE缓冲液抽提磁珠,充分混匀,离心后置于磁力架5分钟,抽取上清。合并提取的DNA上清液约400μL。

[0088] 7. DNA再纯化及浓缩

[0089] 将抽取的DNA溶液转移至Millipore公司生产的Amicon Ultra 0.5mL centrifugal filter (10kD, UFC501024)中,按照厂家要求,于4℃台式离心机14000xg离心10分钟。去掉滤过液,再次向柱芯中加入TE缓冲液至400μL,上下轻摇混匀后再次离心10分钟。观察离心柱芯的体积刻度,直到液面水平低于100μL后停止离心。

[0090] 反转离心内芯于一新的收集管中,14000xg离心1分钟收集DNA浓缩液。

[0091] 8. 质量检查

[0092] Nanodrop2000C测定DNA产物量(quantity)和品质(quality)。取1.5μL DNA溶液加入Nanodrop2000C测定平台,所获DNA的260nm与280nm的比值应介于1.80与1.90之间。比值高于1.90以上可能仍存在核酸小分子污染物。260nm与230nm的比值应等于或略高于2.0,如果高于2.2以上提示仍然存在盐类分子的污染物。

[0093] 琼脂糖凝胶观察DNA的完整性(Integrity)。将0.4克琼脂加入到预装有40mLTAE缓冲液的加热瓶中,混匀后于微波炉中加热约1分钟至充分溶解,小心不要沸腾出瓶口。加入约5μl浓度为10mg/mL的溴化乙锭溶液,轻摇混匀后迅速倒入琼脂胶制备装置,排除胶体表面气泡后插入孔梳,室温下冷却30分钟至完全凝固。取1μL DNA溶液与上样液混合后上样,同时上样时加入正、负对照样品和合适的DNA ladder(梯带)。按照5v/cm约在100v电压下跑胶约30分钟后于365nm紫外光下检查DNA结果。图5所示2、3道为BAC DNA结果,应在10kb以上位置。

[0094] 本发明能够从大体积BAC克隆细菌培养液中有效提取质量高、数量充分、无毒、无污染、低成本的DNA;本发明操作简单稳定、经济高效、无毒无污染。本发明具备优良的扩展性,能够实现标准化的试剂盒套装系列产品和全自动化操作。

[0095] 以上所述的实施例仅是对本发明的优选实施方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案作出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。

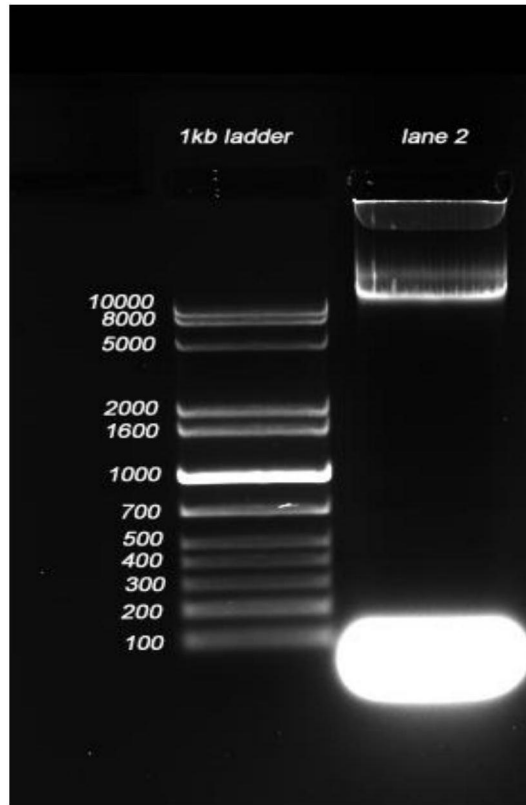


图1

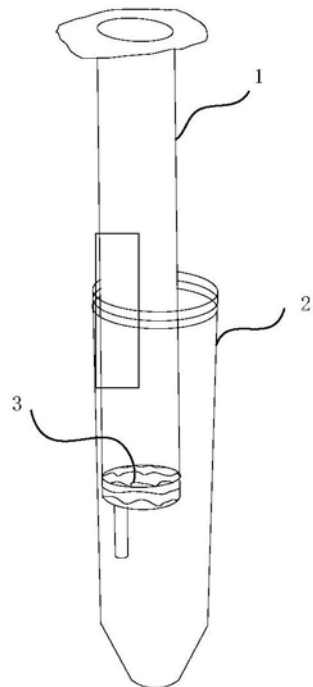


图2

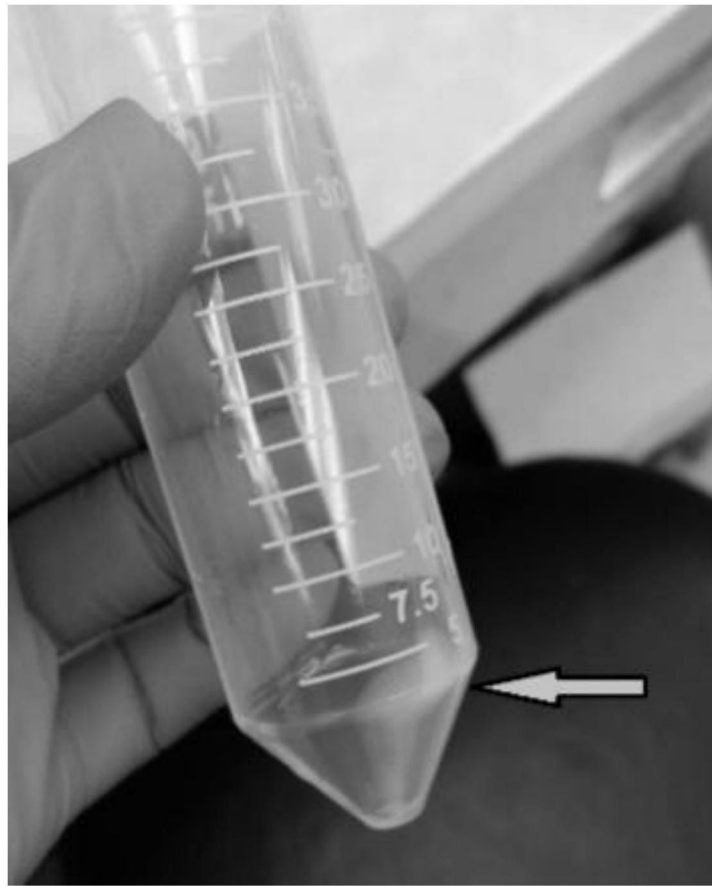


图3



图4

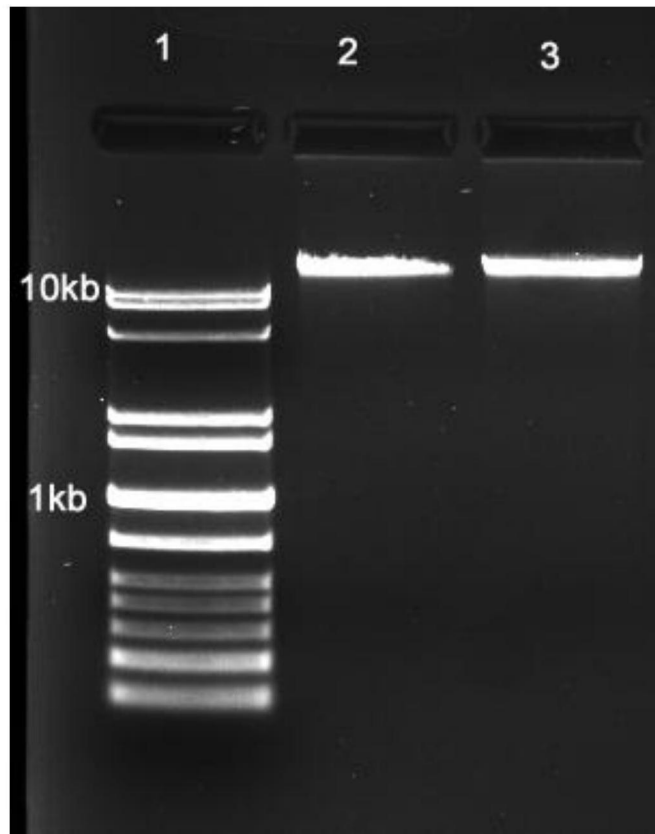


图5