

## 质粒提取常见问题及解决方案

古人常说：工欲善其事必先利其器，也就是磨刀不误砍柴工了。生物实验中，这个道理也是一样的。要提取高质量、高纯度的质粒，必须做足够的准备，如下：

- 1、提取质粒所必须的溶液的配制或者购买相关试剂盒。
- 2、宿主的选择并制备高质量的感受态细胞。
- 3、培养基的选择并配制好相关培养基。
- 4、提取质粒所需的工具，包括试管、离心机等准备。

做好这些准备，仅仅是提取质粒的第一步，其中还有很多细节需要注意。如：1、现在提取质粒通用方法都是碱裂解法，必须保证配置的溶液 I、溶液 II、溶液 III 的准确性；或者准备购买的试剂盒的有效性。2、宿主的选择是关键，现在实验室通用的菌株有很多，有专门用于蛋白表达用的，如：BL21、DH5 $\alpha$ 、JM109 等等，选用合适的宿主可以提高质粒的产率和质量。3、选择合适的培养基，是培养细菌的关键，如：BL 培养基，SOB 培养基等。另外培养细菌时，必须注意所用的培养基、试管或培养瓶必须是高温高压灭菌处理的。

按照以上准备并按照相关操作步骤提取质粒，但是往往会出现很多问题，如：根本提取不到质粒、质粒的产量很低、质粒中混有的 RNA 去除不尽、下游酶切不开、下游转染失败等等。对此，我们一一分析，尽可能为您提供帮助。以下是提取质量过程中常见问题和解决方案：

1. 细菌离心后，加入溶液 I 涡旋振荡时，发现菌体呈絮状不易混匀，或成细砂样。  
——很可能是细菌发生溶菌，可减少培养时间、降低培养温度试试看，通常降低培养温度会使细菌生长更加稳定；同时也可以试试平板培养，培养后，用 PBS 将菌落洗下，再进行质粒的提取，固体培养基上细菌生长的要好一些。

2. 加入溶液 II，菌液浑浊度没有发生明显变化。
  - 裂解不完全，主要问题是发生在溶液 II 上。确保 10% SDS 是澄清的，确认 NaOH 是有效的，如使用的是试剂盒，确认溶液 II 是澄清没有沉淀的。如确认原因不是发生在溶液 II 上，而是细菌浓度比较高，可相应增加溶液 I/II/III 的体积。另外一个原因可能是污染了杂菌。如果菌液生长异常快，就要小心可能的杂菌污染了。如，就是和你的目的菌具有同样的抗性，生长速度异常，能提出质粒，而且跑胶的带异常的亮，酶切以后和的目标载体（pcDNA3，5.4kb）具有同样的大小。
  
3. 加入酚仿抽提，离心后在水相和有机相间没有变性蛋白层，但随后的乙醇沉淀发现大量的半透明沉淀，溶解后蛋白浓度高。
  - 乙醇沉淀时，较纯的质粒沉淀应该是白色（PEG 纯化的沉淀是透明的，肉眼不易发现），如沉淀是半透明的凝胶状，则是蛋白含量高。出现此类问题时确认两点：1. 平衡酚是否被氧化、pH 是否是 8.0？2. 溶液 I/II/III 反应后，离心的上清 pH 是否在 8.0 左右。有时，由于溶液 III 配置的问题，导致溶液 I/II/III 反应后离心的上清 pH 与 8.0 偏差较大，导致平衡酚抽提时没有有效的将蛋白抽提出来，有时，离谱的 pH 会导致水相和平衡酚互溶。
  
4. 使用酚仿抽提方法，质粒 A260/A280 的纯度也很好，但酶切不能完全切开
  - 1.确认酶的有效性；2. 平衡酚是否被氧化而呈现棕色，而非正常的黄色；3. 是否不小心吸入了痕量的酚；4.乙醇沉淀后，70%乙醇漂洗的是否充分，残留的盐类会影响酶切；5.乙醇漂洗后是否完全干燥，残留的乙醇会影响酶切；其实如果选用宿主合适的话（如 DH5a、XL1-blue 等，HB101 和 BL21 则不行），完全可以不用酚氯仿抽提这一步（有毒哦，呵呵）。用 1 倍体积的乙醇沉淀，沉淀中所含的盐和 RNA 就很少了，完全去除上清液后就可以直接加 TE 溶解质粒，后续的限制性酶切、转化完全没有问题。节约时间！个人的一点经验，仅供参考。

5. 提取质粒中 RNA 没有去除。  
——主要原因是 RNase 失效，或效率不高。建议：1. 更换 RNase A，并保证其储存条件是正确的；2. 对于手工提取质粒，可单独增加一步去除 RNA 的步骤，即溶液 III 反应后，离心的上清中加 RNase，室温 37°C 去 RNA 10min~30min，但需要保证你的 RNase A 是经过失活 DNase 的，同时较高温度（如 50 度）会更加快速完全的去除 RNA，但本人经验，经过高温处理的质粒质量也不高。
6. 传统手工大提质粒，使用 PEG8000 纯化的问题。  
—— A. PEG8000 不需要灭菌，当然，你要确认你的 PEG8000 是分子生物学使用级别（我们一直使用的 SIGMA 的）； B. 有战友说 PEG8000 纯化后的得率很低，可能需要确认一下问题：加入 PEG8000 前，质粒溶液是否是 TE，而不是含有大量其它杂盐得溶液。在 PEG8000 纯化前，质粒溶液应该是经过乙醇或异丙醇沉淀，且经过 70% 乙醇漂洗过的；沉淀步骤应在冰上或 4 度进行。 C. 关于 PEG8000 处理后离心看不见沉淀的问题：PEG8000 的沉淀是透明的，有时可以看到沉淀，而有时很难辨出沉淀，但后续酚仿抽提时会在水相和有机相间出现大量白色沉淀层。
7. 试剂盒提取质粒，质粒浓度不理想的问题。  
——检查漂洗液，是否配置太久，而且在使用后没有旋紧盖子。
8. 培养基、抗生素、质粒提取都没有问题，而细菌菌液提取不到质粒。  
——如果是氨苄抗性的话，有可能是质粒丢失造成的。主要是培养时间较长，导致培养基中的 beta-内酰胺酶过多，作用时间过长，同时培养基 pH 值降低，氨苄青霉素失活，从而使无质粒的菌株大量增殖。解决的办法：可以添加葡萄糖，缩短培养时间，改用羧苄青霉素。
9. 原先测序鉴定没有问题的细菌，37 度摇菌后发现质粒大小或序列出现异常。  
——这种情况出现的几率较小，回想以前曾经遭遇过两次。常出现在较大质粒或比较特殊的序列中，质粒一次是编码病毒 RNA 聚合酶的表达/转录质粒，一次是 AdEasy 系统中的大质粒 pAdeasy-1，37 度培养后发

现质粒变小。前一个质粒进行测序证实其中有 500bp 的序列丢失。后一个质粒酶切发现缺失了约 6kb。解决办法：**a.**降低培养温度，在 20~25 度下培养，或室温培养可明显减少发生概率；**b.**使用一些特殊菌株，如 **Sure** 菌株，它缺失了一些重组酶，如 **rec** 类等，使得质粒复制更加稳定。

另外还有一些个人经验，一并列出，供大家参考：

1. 如果用试剂盒提取质粒（如 **Foregene Plasmid Mini Kit**），首先集菌时不要以为菌浓度越高越好，那是与后面的碱裂解液和复性液的量有关系的，然后就是加了溶液三后不要剧烈的摇动，会造成质粒和蛋白的铰链降低产量，还有甩去漂洗液时要时间长一点，干燥后，加 **Buffer EB** 离心即可，对后面的酶切连接的影响很小。
2. 质粒抽提过程很大程度受菌生长情况决定。刚活化的菌比负 80 度保存菌种所培养来的菌液状态好，保存久的菌株可能会造成质粒浓度低，质粒丢失等不明原因。判断生长的菌液是否正常，凭个人经验可以用肉眼观察，在光线明亮处摇荡新鲜培养液，如果发现菌液呈漂絮状，好！如果发现成泥水状，即看不到絮状，只是感觉很浑浊，那么多半提不出好的质粒，或者全无。菌液不宜生长太浓，摇床速度不宜过高。达到 **OD600 1.5** 就 **OK** 了，尤其是对于试剂盒提取要注意，另外如果只是简单的酶切验证根本无需酚氯仿抽提（安全考虑，慎重），只要溶液 I II III 比例恰当，转管过程仔细吸取不会有太多杂质。泥水状的菌液大部分是其他非大肠杆菌的生长，造成这种现象的原因我也至今不明白，根据我能解释的就是菌被污染了。

另外根据经验，还有两种方法可以在提质粒前判断菌生长是否正常：

1. 利用你的嗅觉。你只要平时做实验仔细点就能闻出大肠杆菌的气味，新鲜的大肠杆菌是略带一点刺鼻的气味，但不至于反感。而在泥水状的菌液中你只要一凑过去就感觉到其臭无比或者没有气味，可以和正常菌液对照。

2. 肉眼观察活化菌株。对于生长不正常的菌液进行划线验证或者稀释到浓度足够低涂板，第二天观察单克隆生长情况，LB 平板生长的 DH5A 正常形态在 37°C 16 小时后直径在 1mm 左右，颜色偏白，半透明状，湿润的圆形菌斑，如果观察到生长过快，颜色又是泛黄的话基本上不正常了。