

## 异丙醇进一步纯化质粒 DNA (去除 RNA 污染)

- 采用异丙醇或乙醇介导结合的柱法质粒 DNA 提取试剂盒，如美基的 P1156，MD004，MD005，天根 DP117，DP120 等产品，得到的质粒 DNA 通常存在一定量 RNA 污染，特别是中低拷贝载体，以及 YT/TB 等培养的菌液。进行紫外分光光度计测量时，核酸浓度与电泳条带亮度不符合，OD 浓度远高于电泳条带的亮度。这是因为得到的质粒 DNA 中存在降解 RNA 污染 (25-100nt)，由于 RNA 条带已降解成小分子，与 EB/染色染色效率低，大多数情况下，胶图也看不出 RNA 降解的条带。
- 本方案采用异丙醇 (0.7 倍) 进行再沉淀浓缩，除可以提高质粒浓度，还可以显著减少 RNA 污染，让 OD 浓度与电泳亮度更加符合。
- 本方案还可选的 Triton X-114，经典的去内毒素试剂进一步抽提内毒素，可以大幅度降解内毒素水平。达到注射和敏感细胞的转染要求。

1. 取纯化质粒 DNA 至 2ml 离心管中，补超纯水至 1.0ml，加入 0.1ml 3M 醋酸钠，pH5.5 (或 5M NaCl，或 Buffer LN3)，颠倒混匀 3-5 次。

2. (Triton X-114 抽提内毒素) 加入 0.1ml Buffer ER2 至质粒溶液中，颠倒混匀 10~15 次。冰上或冰箱 (2-8 度) 中放置 10~15 分钟，其间颠倒混匀数次。42~50°C 水浴 5 分钟。室温下，13,000 x g 离心 5 分钟。把上清液转移至新的离心管 (高速离心管) 中。

42~50°C 水浴后，Buffer ER2 与内毒素结合在一起形成液泡结构不溶于水，在离心后在离心管底部分层成红色溶液层。若离心后若没有形成分层，再颠倒混匀 5-6 次，重复离心操作，并确保离心机处于室温或已完全恢复室温。取出离心管时，轻轻取出。Buffer ER2 与内毒素分子形成的液滴密度只稍高于上清液，很容易受外力因素影响分层。有少量液滴悬浮在上清液中，静置 3-5 分钟后使之沉淀后再转移上清液。转移少量的 ER2 液滴不影响 DNA 产量。若下游应用非常敏感，建议再重复一次抽提。

3. 加入 0.7 倍体积的异丙醇至上清液中，颠倒混匀 20~30 次，室温下，13,000 x g 离心 15 分钟，小心倒弃上清液。

倒弃上清液要小心，不要丢失 DNA 沉淀。离心后，DNA 沉淀物有可能看不到，特别是处理中低拷贝数载体时，DNA 产量太少形成的沉淀更不可见。为方便观察，可以用标签笔在离心管上作下标识 (离辐心最远的一端)，以方便观察沉淀所在的方位。受离心机角度影响，质粒 DNA 可能会均匀地粘附在最远端的管壁上，从管底至液面的区域内都有。

4. 加入 1.0ml 70%乙醇至沉淀中。涡旋 5 秒，再颠倒混匀数次。13,000 x g 离心 3 分钟，小心倒弃上清液。

5. 短暂离心收集残液，小心吸弃所有残液，打开盖子空气干燥 10 分钟。

6. 加入适量的灭菌水或无内毒素水(自备)至质粒中，轻轻振荡让沉淀重悬，室温静置 10 分钟让质粒充分溶解，其间颠倒混匀数次。把质粒保存于 -20°C。