



中华人民共和国国家标准

GB/T 40170—2021

质粒抽提及检测通则

Principle of plasmid extraction and testing

2021-05-21 发布

2021-12-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本文件起草单位：中国测试技术研究院生物研究所、通用生物系统(安徽)有限公司、深圳市分析测试协会、甘肃中商食品质量检验检测有限公司、深圳市第二人民医院、成都市食品药品检验研究院、甘肃省商业科技研究所有限公司。

本文件主要起草人：周李华、雍金贵、王利娜、喻明军、崔康乐、马丽侠、骆晓文、蒋子敬、王维坤、顾大勇、叶德萍、杨杰、何海宁。



质粒抽提及检测通则

1 范围

本文件规定了质粒抽提及检测的术语和定义、缩略语、原则、抽提、检测、质量控制、样品保存、报告及废弃物处理。

本文件适用于质粒的抽提及检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 4789.3 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数

GB/T 19495.1 转基因产品检测 通用要求和定义

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

GB/T 34265 Sanger 法测序技术指南

GB/T 34796 水溶液中核酸的浓度和纯度检测 紫外分光光度法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

质粒 plasmid

细菌、酵母菌和放线菌等生物中染色体(或拟核)以外的一个或多个闭合环状的双链 DNA 分子。

注:存在于细胞质中,具有自主复制能力,能使其在子代细胞中也能保持恒定的拷贝数,并表达所携带的遗传信息。

3.2

核糖核酸酶 A RNaseA

一种催化水解核糖核酸的核糖部分 3'和 5'磷酸二酯键,形成具有 2',3'-环一磷酸衍生物寡聚核苷酸的核酸酶。

3.3

细菌内毒素 bacterial endotoxin

由亲水性的杂多糖和一个共价结合的类脂 A 组成的复合物。

注:该复合物位于革兰阴性菌细胞壁上,在细菌破裂或分解时释放,可降低细胞转染率,导致机体发热、低血压、呼吸窘迫、血管内凝血及内毒素性休克综合征。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)



DNase: 脱氧核糖核酸酶(Deoxyribonuclease)
HPLC: 高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography)
RNA: 核糖核酸(Ribonucleic Acid)

5 一般性原则

质粒作为基因工程重组技术的常用载体,质粒的质量(浓度、构型、纯度、内毒素含量)是蛋白表达、细胞转染效率的关键。获得高纯度的质粒,需要实验者理解质粒提取原理,针对不同菌种、不同性质和大小的质粒,选用恰当的方法,有效地控制提取过程中的各种影响因素。

6 抽提原理

利用离子去污剂、强碱等试剂裂解宿主细胞,使得质粒从细胞中释放出来,再弃除质粒中的蛋白、基因组 DNA 等杂质,经异丙醇或乙醇沉淀 DNA,最终得到纯化质粒。

7 抽提方法

7.1 抽提方法的选择

7.1.1 影响因素

质粒抽提时应结合菌种以及含有的质粒的特性、实际应用等综合选择抽提方法和试剂,可考虑包括但不限于以下因素:

- 大质粒在抽提过程中容易受损,宜用温和裂解法,操作轻柔,最大程度缓冲高渗透压的细菌质粒释放时的压力;
- 小分子质量质粒可以选用相对较剧烈的方法来分离;
- 一些菌株用去污剂或加热裂解时可释放较多的糖类,这类菌株制备质粒时,需注意裂解温度;
- 具有限制性核酸内切酶 A 的菌株建议采用酚-氯仿进行抽提;
- 在细菌繁殖的对数生长期中期加入氯霉素可以增加质粒的拷贝数。

7.1.2 抽提方法分类及特点

根据抽提原理,可将质粒抽提方法分为四类,即硅胶柱法、磁珠法、酚-氯仿法和离子交换法。基本原理及特点见表 1。

表 1 几种质粒抽提原理及特点

方法	原 理	特 点
硅胶柱法	高盐条件下,硅胶与 DNA 分子有高亲和力,低盐或双蒸水洗脱 DNA	适用于高通量质粒小量抽提
磁珠法	采用一种纳米磁珠微珠材料,该磁珠经硅羟基修饰后, DNA 分子可与之发生特异性结合	适用于微量样品的提取,效率高,便于自动化操作
酚-氯仿法	酚使蛋白质变性并抑制 DNase 活性,氯仿去除过量酚、利于有机相与液相分层,异丙醇具有强疏水作用,用于沉淀 DNA	质粒三级结构完整,适用于高质量质粒抽提

表 1（续）

方 法	原 理	特 点
离子交换法	低盐低 pH 条件下,DNA 与离子交换剂结合,高盐高 pH 条件下洗脱 DNA	适用于大规模质粒抽提,超螺旋比例高

7.2 操作步骤

7.2.1 硅胶柱法

硅胶柱法抽提操作步骤按照商业吸附柱抽提试剂盒说明书进行。

7.2.2 磁珠法

磁珠吸附法抽提操作步骤按照商业磁珠法抽提试剂盒说明书进行。

7.2.3 酚-氯仿法

酚-氯仿法抽提操作步骤按照附录 A 进行。

7.2.4 离子交换法

离子交换法抽提操作步骤按照附录 B 进行。

8 检测

8.1 检测项目

质粒的检测包括液体外观、序列验证、浓度测定、纯度检测、超螺旋比例检测、残余 RNA 和残余基因组 DNA 检测、细菌内毒素检测、限制酶酶切分析、细菌检测等项目,根据不同的项目采用不同的检测方法。

8.2 检测项目的选择

根据试验用途,选择不同的检测项目。一般用于分子克隆、测序、定点突变、印迹杂交、文库构建、探针合成、转染或转化等建议对质粒浓度、纯度、超螺旋程度、残余 RNA、残余基因组 DNA 检测和限制酶酶切分析。用于转染试验(哺乳动物细胞)、病毒传导、CAR-T 等细胞治疗相关病毒载体的生产制备、基因疫苗和基因治疗研究、抗体或蛋白生产、动物学研究等宜增加内毒素检测和细菌检测试验。

8.3 检测方法

8.3.1 液体外观

肉眼观察,参考结果见附录 C。

8.3.2 序列验证

按照 GB/T 34265 执行,对质粒进行序列测定,参考结果见附录 C。

8.3.3 浓度测定

按照 GB/T 34796 执行,参考结果见附录 C。

8.3.4 纯度检测

按照 GB/T 34796 执行, OD_{260}/OD_{280} 在 1.8 至 2.0 之间, OD_{260}/OD_{230} 在 2.0 至 2.5 之间, 琼脂糖凝胶电泳法检测无其他杂带, 肉眼可见, 可用于后续试验。参考结果见附录 C。

8.3.5 超螺旋比例

采用高效液相色谱法检测质粒超螺旋比例, 利用超螺旋质粒和 RNA, 基因组 DNA 碎片的疏水性质的差异, 将待测样超螺旋质粒和其余 DNA、RNA 分离。方法、设备运行参数按照附录 D 执行, 根据检测结果计算目标峰面积占有所有峰面积的比值。参考结果见附录 C。

8.3.6 残余 RNA、残余基因组 DNA 的检测

采用琼脂糖凝胶电泳法对残余 RNA、残余基因组 DNA 进行检测, 肉眼可见, 且限制酶酶切分析后不消失。参考结果见附录 C。

8.3.7 细菌内毒素检测

采用鲎试剂检测法检测细菌内毒素, 检测方法见中华人民共和国药典: 2020 年版, 四部, 细菌内毒素检查法。参考结果见附录 C。

8.3.8 限制酶酶切分析

质粒用限制性酶酶切后, 进行琼脂糖凝胶电泳分析, 参考结果见附录 C。

8.3.9 细菌检测

按照 GB 4789.3 中的大肠菌群计数-平板计数法进行, 同时以涂布生理盐水平板为对照, 无菌落生长。参考结果见附录 C。

9 质量控制

9.1 人员

质粒抽提和检测技术人员应由具备分子生物学、微生物学及相关教育背景的人员担任。

涉及质粒抽提及检测的技术人员应该完全了解菌种培养的相关工作, 应掌握质粒检测等相关理论知识和相关试验基础。

检测人员应该接受适当的内部或者外部培训, 培训的内容应该包括但是不限于:

- 菌种培养技术, 包括无菌实验室操作技能;
- 掌握质粒分子生物学特性;
- 环境控制;
- 定期进行人员的测量能力考核。

9.2 仪器设备

检测仪器应符合预期要求的性能参数和规格。

仪器设备的使用应严格按照标准操作程序进行操作。主要分析设备的操作规程应制定得详细、清楚。

定期对仪器设备进行检测或校准。

9.3 试剂

质粒抽提及检测涉及的相关试剂需从具备专业资质并经过验证核实的供应商处采购,且具备检验合格证明文件。

检测试剂应严格按照使用方法正确使用。

检测试剂的使用应具有严格的文件记录制度,包括试剂的标识、使用时间等信息。

9.4 实验室通用要求

应满足生物安全一级(BSL-1)实验室要求,遵循分区明确、单一流向、因地制宜、方便使用的原则,避免交叉污染。

实验室 DNA 污染一般来源于气溶胶。因此,质粒抽提和检测以及实验室工作区域的组织及良好的试验操作应基于:

——严格的工作流程;

——样品的“单向流动”原则,具体要求应符合 GB/T 19495.1 中的规定。

10 样品保存

质粒贮存于-20℃冰箱,避免反复冻融。长期保存建议放置-80℃超低温冰箱。

11 报告

质粒抽提后应附抽提和检测报告单或等等的指导性文件,格式见附录 E。文件内容应至少包括以下部分:

- a) 名称;
- b) 总量;
- c) 外观;
- d) 浓度;
- e) OD_{260}/OD_{280} ;
- f) OD_{260}/OD_{230} ;
- g) 超螺旋比例;
- h) RNA 残留;
- i) 基因组 DNA 残留;
- j) 细菌检测;
- k) 细菌内毒素检测;
- l) 测序;
- m) 限制酶酶切分析;
- n) 标签;
- o) 保存条件及期限。



12 废弃物处理

废弃物处理按照 GB/T 27403 和 GB/T 19495.2 中的规定执行。

附录 A
(规范性)
酚-氯仿法

A.1 试验试剂

- A.1.1 葡萄糖(Glucose, $C_6H_{12}O_6$)。
- A.1.2 三羟甲基氨基甲烷[Tris(hydroxymethyl)methyl aminomethane THAM, Tris, $C_4H_{11}NO_3$]。
- A.1.3 盐酸(Hydrochloric acid, HCl)。
- A.1.4 乙二胺四乙酸二钠(Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na_2EDTA , $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$)。
- A.1.5 核糖核酸酶 A(RNase A)。
- A.1.6 氢氧化钠(Sodium hydroxide, NaOH)。
- A.1.7 十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS, $C_{12}H_{25}SO_4Na$)。
- A.1.8 醋酸钾(Potassium acetate, CH_3COOK)。
- A.1.9 冰醋酸(Acetic Acid, CH_3COOH)。
- A.1.10 盐酸胍(Guanidine Hydrochloride, Gu-HCl, CH_6ClN_3)。
- A.1.11 乙醇(Ethanol, C_2H_5O)。
- A.1.12 异丙醇(Isopropanol, C_3H_8O)。
- A.1.13 苯酚(Phenol, C_6H_5OH)。
- A.1.14 三氯甲烷(Trichloromethane, 氯仿, $CHCl_3$)。
- A.1.15 异戊醇(Isoamyl alcohol, 3-甲基丁醇, $C_5H_{12}O$)。
- A.1.16 磁珠悬浮液(内含特异性吸附质粒的磁珠)。
- A.1.17 溶液 1(pH8.0): 50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris-Cl, 10 mmol/L EDTA, 100 μ g/mL RNase A。
- A.1.18 溶液 2: 200 mmol/L NaOH, 1% SDS。
- A.1.19 溶液 3(pH5.5): 3 mol/L 醋酸钾。
- A.1.20 Buffer W2: 20 mmol/L Tris-Cl, 75% 乙醇。
- A.1.21 TE 溶液(pH8.0): 10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA。
- A.1.22 75% 乙醇溶液(C_2H_5OH)。
- A.1.23 RNase A 溶液, 10 mg/mL, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 避免反复冻融。

A.2 操作步骤

- A.2.1 分步收集 2 mL~4 mL 菌液到 2 mL 离心管中, 12 000 r/min, 离心 1 min, 弃上清。
- A.2.2 向离心管中加入 250 μ L 溶液 1(已加入 RNase A), 涡旋振荡使细胞重悬。
- A.2.3 向离心管中加入 250 μ L 溶液 2, 温和翻转离心管 6 次~10 次, 使菌体充分裂解, 液体变得澄清。
- A.2.4 向离心管中加入 350 μ L 溶液 3, 温和翻转离心管 6 次~10 次, 此时可观察到管内出现白色絮状物, 12 000 r/min 室温离心 10 min。
- A.2.5 取上清于新的 2.0 mL EP 管中, 并记录体积。

- A.2.6 加等体积的苯酚/氯仿溶液,充分振荡混匀,12 000 r/min 离心 10 min。
- A.2.7 重复 A.2.6。
- A.2.8 小心吸取上清于新的 2.0 mL EP 管中,加等体积的异丙醇混匀,12 000 r/min 离心 10 min。
- A.2.9 小心弃去上清。
- A.2.10 加入 1 mL 75%乙醇清洗沉淀,12 000 r/min 离心 1 min,弃去上清。
- A.2.11 置于超净工作台将残留乙醇吹干,加 50 μ L~100 μ L ddH₂O 溶解,−20 ℃保存。

附录 B

(规范性)

离子交换法

B.1 试验试剂

- B.1.1 葡萄糖(Glucose, $C_6H_{12}O_6$)。
- B.1.2 三羟甲基氨基甲烷[Tris(hydroxymethyl)methyl aminomethane THAM, Tris, $C_4H_{11}NO_3$]。
- B.1.3 盐酸(Hydrochloric acid, HCl)。
- B.1.4 乙二胺四乙酸二钠(Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na_2EDTA , $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$)。
- B.1.5 核糖核酸酶 A(RNase A)。
- B.1.6 氢氧化钠(Sodium hydroxide, NaOH)。
- B.1.7 十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS, $C_{12}H_{25}SO_4Na$)。
- B.1.8 醋酸钾(Potassium acetate, CH_3COOK)。
- B.1.9 冰醋酸(Acetic Acid, CH_3COOH)。
- B.1.10 盐酸胍(Guanidine Hydrochloride, Gu-HCl, CH_6ClN_3)。
- B.1.11 乙醇(Ethanol, C_2H_6O)。
- B.1.12 氯化钠(Sodium chloride, NaCl)。
- B.1.13 3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS, $C_7H_{15}NO_4S$)。
- B.1.14 聚乙二醇辛基苯基醚[Triton X-100, $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$]。
- B.1.15 异丙醇(Isopropanol, C_3H_8O)。
- B.1.16 Buffer P1(pH8.0): 50 mmol/L Tris-Cl, 10 mmol/L EDTA, 100 μ g/mL RNase A。
- B.1.17 Buffer P2: 200 mmol/L NaOH, 1% SDS。
- B.1.18 Buffer P3(pH5.5): 3 mol/L 醋酸钾。
- B.1.19 Buffer QBT(pH7.0): 750 mmol/L NaCl, 50 mmol/L MOPS, 0.15% Triton X-100。
- B.1.20 Buffer QC(pH7.0): 1.0 mol/L NaCl, 50 mmol/L MOPS, 15% 异丙醇。
- B.1.21 Buffer QF(pH8.5): 1.25 mol/L NaCl, 50 mmol/L MOPS, 15% 异丙醇。
- B.1.22 TE 溶液(pH8.0): 10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA。

B.2 操作步骤

- B.2.1 从转化的细菌平板中挑取单菌落,接种到 4 mL 液体培养基(含相应的抗生素),37 $^{\circ}C$, 220 r/min 培养 6 h。
- B.2.2 取 100 μ L 上述菌液接种到 300 mL 选择性培养基中,37 $^{\circ}C$, 220 r/min, 培养 16 h。
- B.2.3 收集 B.2.2 中菌液于 500 mL 离心杯中,4 $^{\circ}C$, 8 000 g 离心 10 min。
- B.2.4 弃上清,并倒扣在吸水纸上,加入 30 mL,4 $^{\circ}C$ 预冷的 Buffer P1(已加入 RNase A),反复吹打沉淀直至完全混匀。
- B.2.5 加入 30 mL 细胞裂解液 Buffer P2,轻柔地上下颠倒混匀 4 次~6 次,在室温下孵育时间不要超过 5 min。
- B.2.6 加入 30 mL 预冷的 Buffer P3,立即颠倒混匀 6 次~8 次(动作要轻柔),在冰上孵育 10 min,4 $^{\circ}C$, 8 000 g 离心 20 min。
- B.2.7 在层析柱的顶端加滤纸,沿滤纸边缘缓慢加入 20 mL 的 Buffer QBT(平衡层析柱)。
- B.2.8 将 B.2.6 中的上清小心移到层析柱中(不可将沉淀搅动),让液体自由流下。

- B.2.9 加入 20 mL Buffer QC 清洗层析柱一次。
- B.2.10 加入 20 mL Buffer QF 洗脱 DNA,准备对应的 50 mL 的离心管分别收集洗脱液。
- B.2.11 加入 0.7 倍体积异丙醇,上下颠倒混匀,在冰上孵育 30 min 以上。
- B.2.12 4 ℃,8 000 *g* 离心 20 min。
- B.2.13 小心弃去上清。注意:不要将沉淀倒掉。
- B.2.14 加入 2 mL 75%乙醇清洗沉淀,4 ℃,8 000 *g* 离心 10 min,弃上清。
- B.2.15 重复 B.2.14。
- B.2.16 置于超净工作台将残留乙醇吹干,加入 500 μ L 的 TE 溶液或灭菌水溶解 DNA。



附 录 C

(资料性)

质粒检测参数及参考结果

质粒检测参数及参考结果见表 C.1。

表 C.1 质粒检测参数及参考结果一览表

检测项目		参考结果
液体外观		肉眼观察清澈、透明
序列验证		与目标序列一致,100%正确
浓度检测		根据定制可稀释或浓缩,一般 0.1 μg/L~1 μg/μL
纯度检测	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	1.8 ~2.0
	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	2.0 ~2.5
	有无其他杂带	无
超螺旋比例		大于或等于 80%
残余 RNA		琼脂糖凝胶电泳不可见
残余基因组 DNA		琼脂糖凝胶电泳不可见
细菌内毒素		细胞转染用,<0.1 EU/μg DNA
限制酶酶切分析		可见目的条带
细菌检测		无菌落生长

附 录 D
(规范性)
高效液相色谱法

采用高效液相色谱法检测质粒超螺旋比例,操作步骤如下:

- 将疏水层析柱 Source 15 PHE column 连接到高效液相色谱系统,检测波长 260 nm,柱温为室温,流速 1 mL/min;
- 用 1.5 mmol/L 硫酸铵、10 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0)的溶液平衡层析柱;
- 液体质粒为待测共试样液,供试样液和平衡溶液按照 1 : 10 混匀,作为上样液;
- 取 30 μ L 稀释后的上样液进样,并使用平衡液洗脱 0.8 min;
- 再用 10 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0)的溶液洗脱 0.7 min;
- 接着用 1.5 mmol/L 硫酸铵、10 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0)的溶液洗脱 5.5 min;
- 收集吸光度和电导率数据;
- 计算目标峰面积占有所有峰面积的比值。

附 录 E
(资料性)
质粒报告单

质粒报告单的格式见表 E.1。

表 E.1 质粒报告单格式

序 号	参 数	结 果
1	名 称	
2	总 量	
3	外 观	
4	浓 度	
5	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	
6	OD ₂₆₀ / OD ₂₃₀	
7	超螺旋比例	
8	RNA 残留	
9	基因组 DNA 残留	
10	细菌检测	
11	细菌内毒素检测	
12	测 序	
13	限制酶酶切分析	
14	标 签	
15	保存条件及期限	



参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2020年版.四部.北京:中国医药科技出版社,2020.
-

