

• 生物技术与方法 •

双磁珠法质粒 DNA 提取技术及应用

喻春函, 宋辉, 曹文刚, 肖晓文*, 杜军*

北京擎科生物科技股份有限公司研究院, 北京 100000

喻春函, 宋辉, 曹文刚, 肖晓文, 杜军. 双磁珠法质粒 DNA 提取技术及应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4708-4717.

YU Chunhan, SONG Hui, CAO Wengang, XIAO Xiaowen, DU Jun. Plasmid DNA extraction by double magnetic beads method and its application[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4708-4717.

摘 要: 质粒是基因合成与测序领域中使用最为频繁的基因运载工具, 然而传统的质粒 DNA 提取方法面临提取通量低、生产成本高等问题, 无法满足日益增长的需求。本研究基于质粒提取原理, 开发了双磁珠法(double-magnetic-bead method, DMBM)质粒提取技术, 探究了磁珠投入量、质粒 DNA 片段大小、菌液投入量等因素对质粒提取的影响, 并且对比了本技术与商业化质粒 DNA 提取试剂盒提取 DNA 质量、提取通量及提取成本。结果表明, 双磁珠法质粒 DNA 提取技术可满足不同细胞密度、不同片段长度的质粒 DNA 提取。此外, 该技术搭载 96 通道全自动核酸提取仪, 提取的质粒 DNA 纯度更高、提取时间缩短 80%、提取成本缩减 57.1%, 从而实现了质粒 DNA 提取的高通量、低成本, 有效助力基因合成与测序。

关键词: 质粒提取; 双磁珠法; 高通量提取; 低成本

Plasmid DNA extraction by double magnetic beads method and its application

YU Chunhan, SONG Hui, CAO Wengang, XIAO Xiaowen*, DU Jun*

Research Institute, Beijing Tsingke Biotech Co., Ltd., Beijing 100000, China

Abstract: Plasmids are the most commonly used gene carriers in the field of gene synthesis and sequencing. However, the main problems faced by traditional plasmid DNA extraction technology are low extraction throughput and high production cost, so they cannot meet the growing demand. In this study, a double-magnetic-bead method (DMBM) for plasmid extraction was developed based on the principle of plasmid extraction. The effects of the input of magnetic beads, the size of plasmid DNA fragments, and the volume of bacterial on plasmid DNA extraction were explored. In addition, the quality, throughput, and cost of plasmid DNA

*Corresponding authors. E-mail: XIAO Xiaowen, xiaoxiaowen@tsingke.com.cn; DU Jun, dujun@tsingke.com.cn

Received: 2023-04-11; Accepted: 2023-06-22; Published online: 2023-06-27

extraction were also compared between this technique and the commercial plasmid DNA extraction kits. The results showed that the DMBM can meet the needs of extracting plasmid DNA with different cell densities and fragment lengths. Moreover, the sensitivity and quality of plasmid extraction by the DMBM method were both superior to those of the centrifugal adsorption column method. In addition, this technique could be applied on a 96-channel automated nucleic acid extractor, resulting in higher purity of the extracted plasmid DNA, 80% reduction in extraction time, and 57.1% reduction in cost. It also reduces manual operations, achieving high-throughput and low-cost plasmid DNA extraction, thus may facilitate gene synthesis and sequencing.

Keywords: plasmid DNA extraction; double-magnetic-bead method (DMBM); high-throughput extraction; low cost

质粒 DNA (plasmid DNA, pDNA) 是基因工程、细胞工程、蛋白质工程中最常见的运载工具, 质粒提取已成为生物学研究中最常用的技术^[1-2]。高质量的质粒 DNA 是生物医药生产中的核心组成部分, 需求量巨大。目前, 市面上商业化质粒 DNA 核酸提取试剂主要采用固相纯化法, 分为离心柱法和磁珠法。相比于传统的核酸抽提方法, 固相纯化法提取流程更加简单和高效, 解决了液相抽提法存在的缺陷, 如分离不完全、使用大量有毒有害试剂等问题^[3]。传统的离心柱法核酸提取技术主要问题是依赖离心设备、费时费力。提取过程中多次离心, 导致离心柱法无法实现高通量、自动化, 限制其在基因合成与测序、疾病检测、基因诊断等领域的运用^[4-5]。单磁珠法核酸提取技术操作过程更加简单, 提取效率更高, 但也无法彻底解决提取过程依赖离心设备的问题, 这同样限制了其在工业化生产中的运用。

磁性纳米材料因其表面可修饰性, 可适用于不同目标物质的捕获、纯化、检测, 如核酸、蛋白纯化, 抗体、抗原检测等^[6-8]。近年来, 核酸检测的快速发展也推动了磁性纳米材料在核酸提取中的大规模应用。其中, 应用于核酸提取的磁珠, 表面修饰了丰富的硅羟基或羧基, 在胍盐(盐酸胍、异硫氰酸胍等)或醇溶剂环境中会特异性地吸附核酸^[9-10]。在外加磁场的控制下可实现

磁珠的定向移动和富集, 核酸吸附在磁珠上, 从蛋白、多糖等杂质中分离, 并经过特定溶剂洗涤纯化, 得到高纯度的核酸^[11-12]。目前磁珠法提取技术已大量应用于各种样本的核酸提取, 但在实际应用过程中因样本处理的特殊性和复杂性, 现行常规核酸提取技术依赖于离心过程, 导致这些技术无法实现高通量和自动化^[13]。本研究基于质粒 DNA 提取的原理和步骤, 设计了 2 种不同功能的磁珠, 磁珠 I 用于去除菌体裂解后菌体碎片, 磁珠 II 用于核酸分子的特异性分离, 配合全自动化核酸提取仪验证质粒小量提取的可行性。双磁珠法(double-magnetic-bead method, DMBM)质粒 DNA 提取技术适用于质粒 DNA 全自动化提取的试剂和设备, 为质粒 DNA 提取的自动化和规模化提供了发展方向和技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

菌株为大肠杆菌 DH5 α , 由北京擎科生物科技股份有限公司(以下简称“擎科生物”)提供; pUC19 质粒, 由擎科生物提供; pHBM 质粒, 由擎科生物提供。

1.1.2 主要试剂

TSP501-200 高纯度质粒 DNA 小量提取试

剂盒,由擎科生物提供;TSN-K06 双磁珠法质粒提取试剂盒,试剂盒主要试剂包括重悬液 S1 [50 mmol/L 葡萄糖、25 mmol/L Tris-Cl、10 mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA), pH 8.0],裂解液 S2 [0.2 mol/L NaOH、1% 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)],复性液 S3 (3 mol/L 醋酸钾、2 mol/L 醋酸),由擎科生物提供;TSE501-ArtiCan^{ATM} SYBR qPCR Mix,由擎科生物提供;六水合氯化铁,购自 Aladdin;七水合硫酸亚铁,购自 Aladdin;正硅酸乙酯,购自 Aladdin;柠檬酸三钠,购自国药试剂;氨水,购自国药试剂;抗坏血酸,购自国药试剂;无水乙醇,购自国药试剂。

1.1.3 主要设备

智能数显多功能水浴锅,巩义市予华仪器有限责任公司;电动搅拌器,上海司乐仪器有限公司;超净工作台,苏州净化设备有限公司;全温振荡器,苏州培英实验设备有限公司;凝胶成像仪,北京君意东方电泳设备有限公司;水平电泳槽,北京君意东方电泳设备有限公司;高速冷冻离心机,艾本德(上海)实验室科技有限公司;全自动核酸提取仪,擎科生物;ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.1.4 双磁珠法质粒 DNA 提取技术原理

质粒提取主要有碱裂解法、煮沸裂解法、CsCl-EB 密度梯度平衡离心等;其中,碱裂解法是最常用的质粒提取方法,优点是操作简单、速度快、成本低和产量高,适于大多数菌株,所得产物经纯化后可用于基因工程、细胞工程和蛋白工程中,是分子生物学实验获取质粒的常规手段,受到大量研究者的认可^[14-17]。本实验在碱裂解法的基础上开发出双磁珠法质粒 DNA 提取技术,配合全自动化核酸提取仪,高度契合市场上现行的碱裂解法小量质粒提取场景,在不改变碱裂解法试剂的基础上,实现质粒提取的高通量、

自动化和低成本提取,有效降低了双磁珠法技术适配现有质粒提取方法的难度。培养好的 DH5 α 菌株在裂解液 S2 作用下,有效成分 SDS 与细胞碎片、蛋白杂质等物质结合,经过复性液 S3 中钾离子的作用,形成不溶的钾盐沉淀复合物,此复合物表面因结合大量钾离子而呈正电性。本研究开发的双磁珠法 DNA 提取技术,使用的磁珠 I 是带有大量负电荷的多羧基磁珠,可与正电性钾离子复合物发生静电荷吸附和配位作用,特异性吸附杂质,通过磁分离设备将杂质与上清液分离;磁珠 II 表面修饰了丰富的硅羟基,可在醇溶剂环境中特异性吸附核酸,基于此原理可实现质粒 DNA 的特异性分离。

1.2 方法

1.2.1 磁珠制备

称取 14.0 g 六水合氯化铁和 7.0 g 七水合硫酸亚铁,溶解于 100 mL 去离子水中,加入到反应釜中,在无氧条件下高速搅拌。随后,加入 50 mL 氨水,50 °C 反应 30 min,加入 1.0 g 柠檬酸钠和 0.2 g 抗坏血酸,升温至 80 °C 继续反应 30 min。反应结束后,将磁珠用纯水洗涤干净保存在 0.5% 的柠檬酸钠和 0.1% 的抗坏血酸的溶液中,形成磁珠 I 溶液^[18-19]。

称取 24.5 g 六水合氯化铁和 14 g 七水合硫酸亚铁,溶解于 100 mL 去离子水中,加入到反应釜中,在无氧条件下高速搅拌。随后,加入 50 mL 氨水,50 °C 反应 30 min 后,升温至 80 °C 继续反应 30 min。反应结束后,将产物用 50% 的乙醇溶液进行磁分离洗涤,直至洗涤液呈中性。将得到的产物取 10 g 分散于无水乙醇中,转移到反应釜中,加入正硅酸乙酯和氨水,在室温下搅拌 3 h。将得到的磁珠用纯水洗涤干净,保存在 70% 异丙醇溶液中,组成磁珠 II 溶液^[20]。

1.2.2 细菌培养

将菌种接种于含有 1.0 mL 已灭菌的 LB 液

体培养基(含有氨苄青霉素)的96孔板深孔板中, 37 °C、220 r/min 摇床培养过夜。

1.2.3 质粒提取

(1) 双磁珠法质粒DNA提取(全自动化提取仪)

将过夜培养的菌液于 3 000×g 离心收集菌体, 加入 200 μL 重悬液 S1 振荡使菌体分散。使用 300 μL S2 裂解菌体 2 min, 加入 300 μL 复性液 S3 和磁珠I溶液室温振荡 5 min。利用 96 孔板磁力架磁吸 3 min, 转移上清液至新 96 孔板中, 加入 500 μL 磁珠II溶液振荡混匀 5 min, 磁力架磁吸 1 min, 去掉上清液。加入 800 μL 洗涤液振荡 1 min, 磁吸 1 min, 去掉上清液, 重复洗涤 1 次。最后, 加入 100 μL 洗脱液, 室温振荡 3 min, 磁吸 1 min, 收集上清液。

(2) 离心吸附柱法质粒提取

取 1 mL 菌液, 3 000×g 离心收集菌体, 加入 200 μL 重悬液 S1 振荡使菌体分散。使用 300 μL S2 裂解菌体 2 min, 加入 300 μL 复性液 S3, 温和地上下翻转 6–8 次。充分混匀, 12 000×g 离心 15 min。转移上清至吸附柱中, 12 000×g 离心 1 min, 弃废液。加入 800 μL 洗涤液 12 000×g 离心 1 min, 弃废液, 重复洗涤 1 次。取出吸附柱, 放入干净的 1.5 mL 离心管中, 20–25 °C 静置 2–5 min, 使残留的乙醇挥发。在吸附膜的中间部位加入 100 μL 洗脱液, 20–25 °C 静置 2 min, 12 000×g 离心 2 min, 收集滤出液。

1.2.4 磁珠I用量优化

根据双磁珠法质粒提取流程, 在菌体碎片去除步骤调整磁珠I的用量, 通过磁珠I去除杂质后得到的上清液和提取得到的质粒的质量确定磁珠I去除杂质的性能。

1.2.5 荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescent quantitative PCR, qPCR)体系

实时荧光定量 PCR 体系采用擎科生物 TSE501-ArtiCan^{ATM} SYBR qPCR Mix。PCR 体系

为 20 μL, 其中 2×缓冲液 10 μL, 0.4 mmol/L dNTPs, 2 mmol/L Mg²⁺, 0.5 mmol/L 上、下游引物, 0.2 mmol/L SYBR 荧光染料。扩增条件: 95 °C 1 min; 95 °C 10 s, 60 °C 20 s (采集荧光), 40 个循环。以 Ct 值衡量提取质粒 DNA 含量。

2 结果与分析

2.1 磁珠粒子性质表征

依据双磁珠设计原理, 通过配位作用和静电荷吸附作用, 将柠檬酸根修饰到磁核表面形成亲水性较强的羧基磁性粒子——磁珠I。图 1 左图是磁珠I的透射电镜图片, 粒子粒径在 10–20 nm 之间, 平均粒径为 15 nm, 粒子轮廓清晰、分布均匀, 无明显团聚现象。图 1 右图是磁珠II的透射电镜图片, 磁珠II的磁核表面修饰了 1 层二氧化硅, 透射电镜下可观察到二氧化硅壳层结构。磁珠II的粒径约为 30 nm, 粒子轮廓模糊、部分团聚。

2.2 磁珠表面电位表征

图 2 表征的是磁珠I和磁珠II在不同 pH 溶液中表面电位的变化。柠檬酸钠的羧基基团通过静电荷吸附作用和配位作用固定在四氧化三铁表面, 使磁珠I呈现明显的负电性, 如图 2 所示, 在溶液 pH 为 1.0–14.0 环境中磁珠I表面电位在 –26 mV 到 –80 mV 之间, 即磁珠I始终呈现强负电

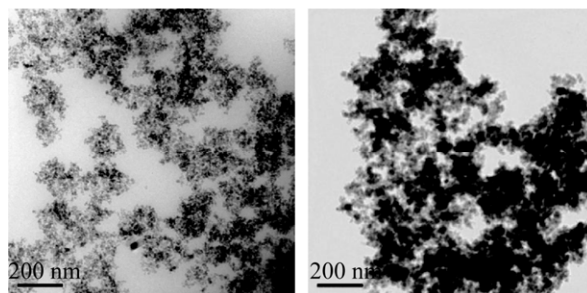


图 1 磁珠I(左)和磁珠II(右)透射电镜图

Figure 1 Transmission electron microscope of magnetic beads I (left) and II (right).

性。随着溶液 pH 值升高,磁珠I表面的羧基基团逐渐解离产生羧酸根离子并且释放 H^+ 离子,使磁珠I的负电性逐渐增强^[16]。磁珠II表面修饰了1层二氧化硅,在 pH 值由1到14变化时,磁珠表面电位由8 mV 逐渐变为-32 mV,磁珠II等电点为2.7,非极端 pH 条件下也呈弱负电性。

2.3 双磁珠法质粒 DNA 提取

为了验证双磁珠法质粒 DNA 提取的可行性和普适性,研究中选取两种不同片段大小的质粒用双磁珠法进行提取。琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法检测结果显示,双磁珠法成功提取 pHBM 质粒(5 648 bp)和 pUC19 质粒(2 686 bp) DNA,提取平均产量分别为 9.2 μ g 和 8.3 μ g,纯度分别为 $OD_{260/280}=1.86$ 和 1.90,重复提取质粒 DNA 产量和纯度无明显差异(图 3)。综合以上结果,双磁珠法适用于常规片段大小质粒 DNA 的提取,提取产量稳定、纯度高。

2.4 磁珠I用量对质粒 DNA 提取的影响

依据磁珠I吸附杂质的原理,调整磁珠I的用量,探究双磁珠法最佳的质粒 DNA 提取条件。如图 4 所示,相同菌体密度条件下($OD_{600}=1.5-1.8$),随着磁珠 I 用量增加,提取的质粒 DNA

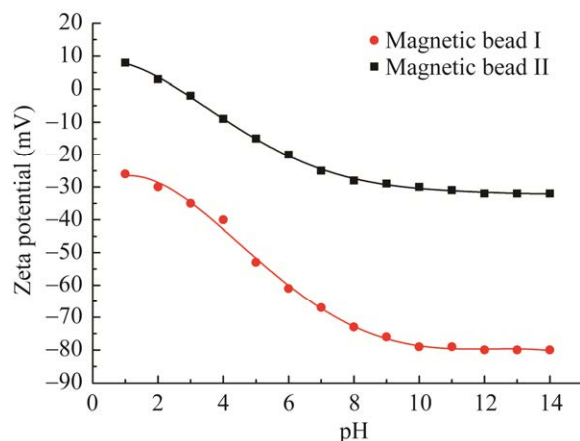


图2 溶液 pH 对磁珠表面电位的影响
Figure 2 Effect of pH on surface charge of magnetic beads.

的产量呈现出先增加后降低的变化趋势,分光光度计核酸定量换算所得的 DNA 总产量依次为 0.6、0.9、8.2、6.0 μ g。磁珠I用量为 10 mg 时,质粒 DNA 总产量最高,超螺旋质粒占比在 95%以上,质粒 DNA 的纯度好($OD_{260/280}=1.74-1.95$)。磁珠I使用量小于 10 mg 时,磁珠I分子数目不足,细胞碎片和蛋白杂质去除不彻底,上清液杂质残留过多,抑制了磁珠II对核酸分子的特异性吸附,导致质粒 DNA 产量显著减少, DNA 的纯度降低($OD_{260/280}=1.52-1.75$)。磁珠I使用量大于 15 mg 时,磁珠本身占据了过多的提取体系容积,导致磁吸后可转移的上清液体积减小,残留质粒 DNA 增加,最终质粒产量显著降低,下降幅度为 20%-25%。综上所述,恒定菌体密度和体积条件下($OD_{600}=1.50-1.80$, 1 mL),磁珠I的最佳用量为 10 mg。

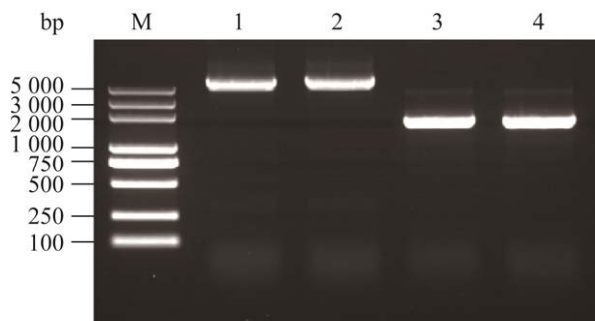


图3 双磁珠法质粒 DNA 提取
Figure 3 Plasmid DNA extraction with double magnetic beads method. M: DNA marker; 1-2: pHBM; 3-4: pUC19.

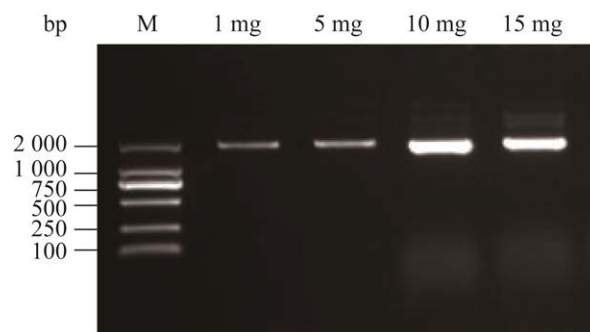


图4 磁珠I用量对质粒 DNA 提取的影响
Figure 4 Effect of magnetic beads I on plasmid DNA extraction. M: DNA marker.

2.5 菌液量对质粒 DNA 提取的影响

为了探究在磁珠用量恒定条件下,双磁珠法对不同菌液量的质粒 DNA 提取的兼容性,研究中固定磁珠用量,使用不同体积的菌液($OD_{600}=1.60$, 1–2 mL)进行质粒 DNA 提取。图 5 结果表明,1 mL 菌液(A: 1、2、3、4 共 4 个平行组)和 2 mL 菌液(B: 5、6、7、8 共 4 个平行组)条件下,双磁珠法均可以成功提取出质粒,提取所得质粒 DNA 质量分别为 3.1 μg 和 7.5 μg 。纯度 $OD_{260/280}$ 范围为 1.74–1.95。因此,双磁珠法兼容不同菌液量质粒 DNA 的提取。

2.6 双磁珠法和离心吸附柱法质粒 DNA 提取比较

双磁珠法利用 96 孔板进行质粒 DNA 提取,不依赖离心等过程,可解决传统吸附柱法无法高

通量和自动化的难题。为了探究其提取性能是否达到传统吸附柱法的效果,通过设置 2 组独立平行实验,结果发现两种方法均可稳定提取出质粒 DNA,4 次重复之间无明显差异,如图 6 所示, A 图 1、2、3、4 为离心吸附柱法提取的 4 个平行组, B 图 5、6、7、8 为双磁珠法提取的 4 个平行组。相比于双磁珠法(5.8 μg ; $OD_{260/280}=1.82$),离心吸附柱法提取的质粒 DNA 产量略高(6.5 μg ; $OD_{260/280}=1.65$),但电泳图中有明显的拖尾现象,表明双磁珠法提取的质粒 DNA 纯度更高。

2.7 荧光定量 PCR 扩增反应

通过双磁珠法和离心吸附柱法分别提取 4 个样本,将提取的质粒通过荧光定量 PCR 扩增反应进行对比。由图 7 和表 1 可知,两种提取方法得到的质粒都有明显的扩增曲线;其中双磁珠法

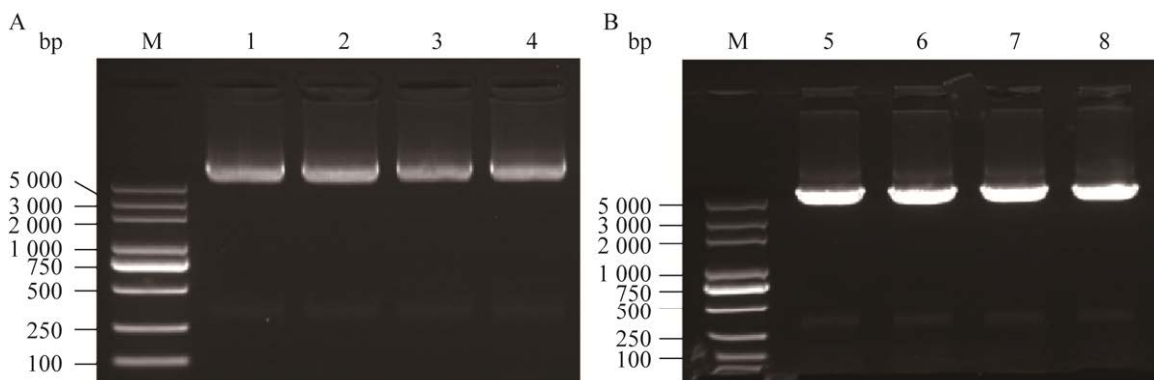


图 5 菌体密度对质粒 DNA 提取的影响

Figure 5 Effect of bacteria density on plasmid DNA extraction. A: 1 mL bacteria (1, 2, 3, 4); B: 2 mL bacteria (5, 6, 7, 8).

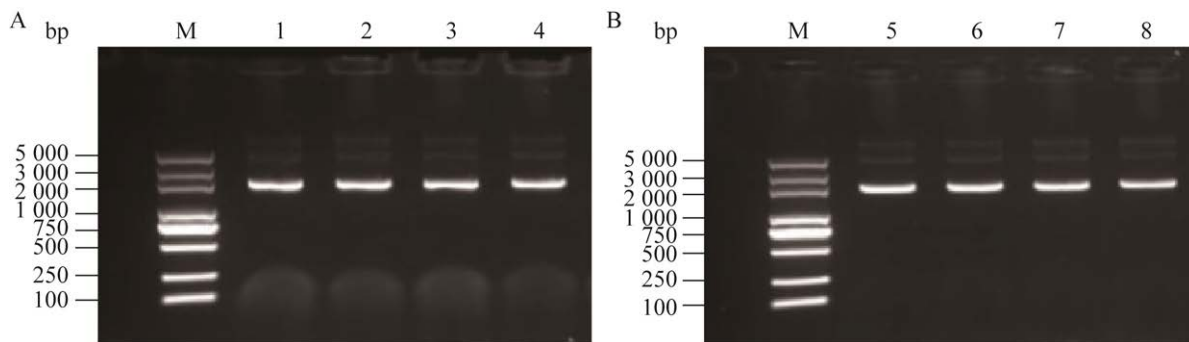


图 6 离心吸附柱法(A)和双磁珠法(B)提取性能对比

Figure 6 Comparison of plasmid DNA extraction between centrifugal adsorption column method (A: 1–4) and double magnetic beads method (B: 5–8). M: DNA marker.

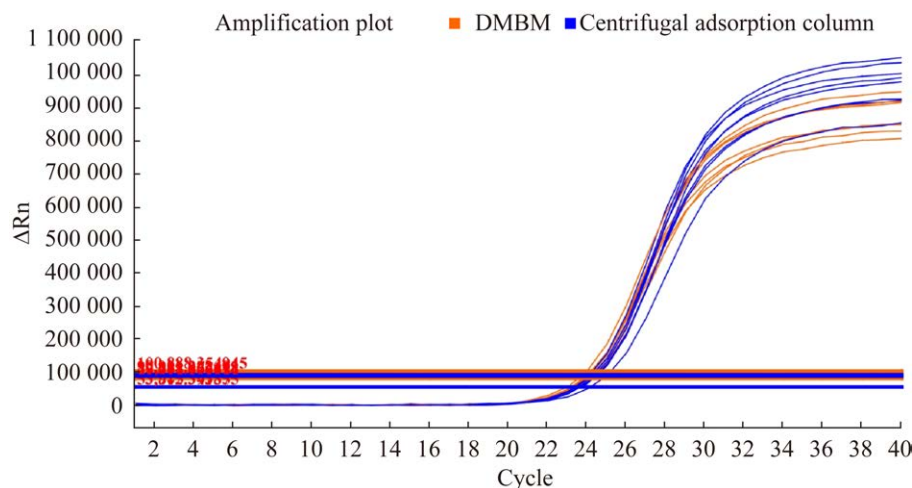


图 7 不同方法提取质粒的荧光定量 PCR 扩增反应曲线
Figure 7 Fluorescence quantitative PCR amplification curve of different methods for extracting plasmids.

表 1 实时荧光定量 PCR 结果
Table 1 Real-time quantitative PCR

Sample number	Double magnetic beads method (Ct value)	Centrifugal adsorption column method (Ct value)
Sample 1	24.05	24.20
Sample 2	23.88	24.30
Sample 3	23.38	23.64
Sample 4	24.04	24.71
Average value (\bar{x})	23.84	24.21
Standard deviation (σ)	0.31	0.44
Coefficient of variation (CV)	0.01	0.02

提取质粒的 Ct 值整体上略低于离心吸附柱法提取质粒的 Ct 值,说明双磁珠法提取的质粒纯度更高,离心吸附柱法提取的质粒残留有更多的杂质会抑制 qPCR 反应。结合 2.6 节中的结果和定量 PCR 反应结果分析,可知双磁珠法提取质粒的质量要优于离心吸附柱法提取质粒的质量。

表 2 和图 8 所示为双磁珠法和离心吸附柱法

提取不同浓度的样本扩增结果。两种提取方法对提取的菌液样本及其系列稀释品的检测结果具有线性相关性,扩增效率在 90%–110%之间, $R>0.98$ 。相同稀释浓度下,双磁珠法的提取质粒的 Ct 值均低于离心吸附柱法;梯度稀释后,双磁珠法提取下限比离心吸附柱法更低;这两个结果表明双磁珠法提取质粒的灵敏度和质量都要高于离心吸附柱法。

2.8 提取效率和成本分析

双磁珠法质粒 DNA 提取采用全自动化核酸提取仪完成提取流程,配套 96 孔深孔板可同时完成 96 个质粒的小量提取,提取过程中无需人工干预加样、移液等操作。质粒提取过程中所使用的试剂、耗材、磁珠等均源自国产原料,成本较低,为了保证提取的稳定性以及批量化操作,目前未对磁珠的重复使用次数进行探究。离心吸附柱法提取质粒是通过人工操作配套高速离心机进行完成,期间涉及到多次取样、加液、离心等操作,耗时长且操作繁琐。本研究以提取 96 个样本为基础,对比了双磁珠法和离心吸附柱法的提取效率、提取成本等。结果表明,搭配全自动核酸提取仪的双磁珠法 30 min 内完成 96 个质粒

DNA 小量样本提取,单个样本提取成本为 2.0 元,见表 3。离心吸附柱法搭配 24 孔高速离心机,总共耗时约 150 min,单个样本提取成本为 3.5 元。综上,双磁珠法质粒 DNA 提取技术配套全自动核酸提取仪,提取效率提高 80%,提取成本缩减 57.1% (表 3)。

表 2 不同提取方法得到的样本及其不同梯度稀释 qPCR 检测结果

Table 2 qPCR of different gradient dilution by different extraction methods

Dilution ratio	Double magnetic bead method	Centrifugal adsorption column method
10 ⁰	24.26	24.70
10 ¹	27.40	28.01
10 ²	30.67	31.28
10 ³	33.83	34.05
10 ⁴	36.58	37.40
10 ⁵	38.80	UN
10 ⁶	UN	UN

UN: No signal is detected.

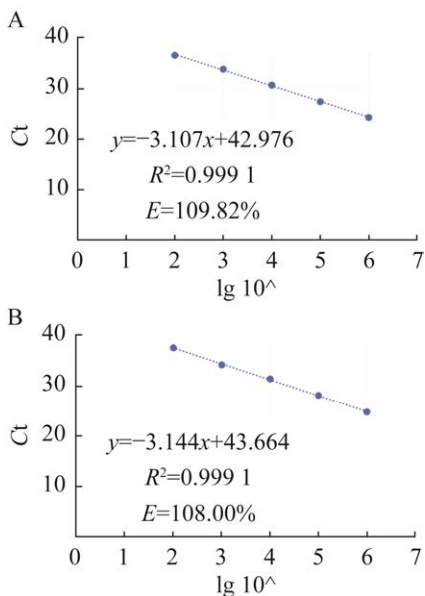


图 8 双磁珠法(A)和离心吸附柱法(B)提取的样本扩增结果和回归分析

Figure 8 Amplification results and regression analysis of samples extracted by double magnetic beads method (A) and centrifugal adsorption column method (B).

表 3 双磁珠法和离心吸附柱法提取成本和提取时间比较

Table 3 Comparison of cost and extraction time of DMBM and centrifugal adsorption column extraction methods

Contrast parameter	Extraction time (min/96 samples)	Extraction cost (yuan/individual sample)
Centrifugal adsorption column method	150	3.5
Double magnetic bead method	30	2.0

3 讨论与结论

本研究针对传统固相 DNA 提取方法通量低、成本高的问题,开发了双磁珠法质粒 DNA 提取技术,配合多通道自动化核酸提取仪,实现了基因合成与测序领域少量质粒 DNA 样本高通量、低成本、高质量提取,有效解决了测序和基因合成领域中质粒 DNA 样本提取的难题。

双磁珠法质粒 DNA 提取技术在质粒小量提取中,能够针对不同菌液量、不同片段大小的质粒进行高效提取,符合基因合成与测序应用的实际要求。紫外分光光度计法显示双磁珠法获得的质粒样本纯度 $OD_{260/280}=1.82$, 优于离心吸附柱法的质粒样本纯度 $OD_{260/280}=1.65$, 荧光定量 PCR 循环阈值(Ct 值)进一步证实双磁珠法提取的有效质粒 DNA 浓度更高,这暗示了传统离心吸附柱法提取的质粒 DNA 存在某些组分抑制了 qPCR 扩增,从而导致其 Ct 值偏高。双磁珠法质粒提取技术配合全自动核酸提取仪 30 min 内完成 96 个质粒样本的提取,单个样本提取成本仅为 2 元,提取时长、人工成本、试剂成本均低于离心吸附柱法。此外,双磁珠解决了质粒 DNA 提取过程中的高度依赖离心设备和人工的问题,磁珠I基于静电吸引和配位原理,特异性吸附裂解后的菌体杂质,自动化磁分离技术转移

上清液, 高效替代当前的离心沉淀去除杂质的方式; 磁珠Ⅱ专一性吸附质粒 DNA, 结合自动化磁分离技术将磁珠上的质粒洗涤纯化, 整个分离过程更加简单、柔和, 最终获得纯度更高的质粒。因此, 针对处理多个样本的质粒 DNA 提取场景, 本研究开发的双磁珠法质粒 DNA 提取技术具有显著的优势, 轻松实现降本增效的需求, 符合当前行业发展大趋势。

现阶段在质粒小量提取中, 基于全自动核酸提取仪的双磁珠法质粒 DNA 提取技术已经应用于高通量测序质粒样本的提取, 大幅降低了质粒提取流程中人工和时间成本, 并解除了离心机通量低引起的限制。后续针对质粒大量提取的需求, 将继续开发大容量、高通量的全自动核酸提取仪, 解决百升级、千升级质粒自动化提取难题^[21-23]。

在分子生物学技术结合机械自动化、信息化和智能化的协同发展过程中, 分子生物学实验室实现自动化和智能化已成为必然趋势。未来, 全自动核酸提取技术将继续朝着智能化、集成化和高效化的方向发展。一方面, 设备将配备更为先进的传感器和控制系统, 以实现更精确的操作和更高的提取效率。另一方面, 全自动核酸提取技术将与其他技术相结合, 如基因测序和微流控等, 形成更为完善的提取和检测体系^[24]。双磁珠法质粒提取技术对实现质粒提取流程的全程自动化具有决定性的意义, 在分子诊断、测序、基因和蛋白质工程、药物筛选和疫苗原料制备等领域具有极大的应用前景^[25-28]。

REFERENCES

- [1] BEHROUZ TB, HOSSEIN M, MOHAMMAD RA. Comparison of plasmid and chromosomal *omp1* gene-based PCR and two DNA extraction methods for diagnosing *Chlamydia trachomatis* in endocervical swab samples[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2012, 2: S612-S616.
- [2] STEPHEN R, STOCKDALE. Incorporating plasmid biology and metagenomics into a holistic model of the human gut microbiome[J]. Current Opinion in Microbiology, 2023, 73: 102307.
- [3] 张彩权. 四氧化三铁磁性复合微球的制备及其在全血基因组 DNA 自动化提取中的应用[D]. 西安: 西北大学硕士学位论文, 2010.
ZHANG CQ. Preparation of magnetic composite ferroxide microspheres and its application in automatic extraction of genomic DNA from whole blood[D]. Xi'an: Master's Thesis of Northwest University, 2010 (in Chinese).
- [4] ZHAO XY, HUANG YX, LI X, YANG WH, LV YY, SUN W, HUANG JJ, MI SL. Full integration of nucleic acid extraction and detection into a centrifugal microfluidic chip employing chitosan-modified microspheres[J]. Talanta, 2022, 250: 123711.
- [5] ULRICH D. Potential of plasmid only based reverse genetics of rotavirus for the development of next-generation vaccines[J]. Current Opinion in Virology, 2020, 44: 1-6.
- [6] HUANG XC, FU RJ, QIAO S, ZHANG J, XIANYU YL. Nanotechnology-based diagnostic methods for coronavirus: from nucleic acid extraction to amplification[J]. Biosensors & Bioelectronics: X, 2023, 13: 100289.
- [7] PATRICK AK, JORDAN NC, RYAB G, HUEY J. N, PONGKUAN S, L. ANDREW L. Incorporation of automated buffer exchange empowers high-throughput protein and plasmid purification for downstream uses[J]. SLAS Technology, 2023.
- [8] FANG YL, WANG Y, ZHU LX, LIU HR, SU XY, LIU Y, CHEN Z, CHEN H, HE NY. A novel cartridge for nucleic acid extraction, amplification and detection of infectious disease pathogens with the help of magnetic nanoparticles[J]. Chinese Chemical Letters, 2022: 108092.
- [9] AN GS, CHOI SW, CHAE DH, LEE HS, KIM HJ, KIM Y, JUNG YG, CHOI SC. γ -Fe₂O₃@SiO₂ core-shell structured nanoparticle: fabrication via surface treatment and application for plasmid DNA purification[J]. Ceramics International, 2017, 43(15): 12888-12892.
- [10] HONEYWOOD MJ, JEFFRIES-MILES S, WONG K, HARRINGTON C, BURNS CC, STEVEN OBERSTE M, BOWEN MD, VEGA E. Use of guanidine thiocyanate-based nucleic acid extraction buffers to inactivate poliovirus in potentially infectious materials[J]. Journal of Virological Methods, 2021, 297: 114262.
- [11] SOSA-ACOSTA JR, SILVA JA, FERNÁNDEZ-

- IZQUIERDO L, DÍAZ-CASTAÑÓN S, ORTIZ M, ZUAZNABAR-GARDONA JC, DÍAZ-GARCÍA AM. Iron oxide nanoparticles (IONPs) with potential applications in plasmid DNA isolation[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2018, 545: 167-178.
- [12] 邓晨. 基于磁性微粒纯化法医样本 DNA 方法的建立[D]. 西安: 西北大学硕士学位论文, 2012.
- DENG C. Establishment of DNA purification method for forensic samples based on magnetic particles[D]. Xi'an: Master's Thesis of Northwest University, 2012 (in Chinese).
- [13] WOLF Á, ROMEDER-FINGER S, SZÉLL K, Galambos P. Towards robotic laboratory automation plug & play: survey and concept proposal on teaching-free robot integration with the lapp digital twin[J]. *SLAS Technology*, 2023, 28(2): 82-88.
- [14] WANG X, ZHAO L, WU XX, LUO HX, WU D, ZHANG M, ZHANG J, PAKVASA M, WAGSTAFF W, HE F, MAO YK, ZHANG YT, NIU CC, WU M, ZHAO X, WANG H, HUANG LJ, SHI DY, LIU Q, NI N, et al. Development of a simplified and inexpensive RNA depletion method for plasmid DNA purification using size selection magnetic beads (SSMBs)[J]. *Genes & Diseases*, 2020, 8(3): 298-306.
- [15] DA SILVA RJ, MACIEL BG, MEDINA-LLAMAS JC, ELIZABETH CHÁVEZ-GUAJARDO A, ALCARAZ-ESPINOZA JJ, PINTO de MELO C. Extraction of plasmid DNA by use of a magnetic maghemite-polyaniline nanocomposite[J]. *Analytical Biochemistry*, 2019, 575: 27-35.
- [16] EI-ASHRAM S, AI NASR I, SUO X. Nucleic acid protocols: extraction and optimization[J]. *Biotechnology Reports*, 2016, 12: 33-39.
- [17] SHAN Z, ZHOU ZW, WU Q, CHEN H. An automated and miniaturized from *Escherichia coli* using magnetic bead separation method[J]. *Jsau*, 2011, 29(2): 230-234.
- [18] JAL PK, PATEL S., MISHRA BK. Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions[J]. *Talanta*, 2004, 62(5): 1005-1028.
- [19] 肖晓文, 喻春函, 曹文刚, 杜军. 磁性微球、制备方法及应用: CN114177893A[P]. 2022-12-02.
- XIAO XW, YU CH, CAO WG, DU J. Magnetic microsphere, preparation method and application: CN114177893A[P]. 2022-12-02 (in Chinese).
- [20] 徐琰清. 单分散二氧化硅以及四氧化三铁/二氧化硅复合颗粒的制备[D]. 上海: 华东师范大学硕士学位论文, 2011.
- XU YQ. Preparation of monodisperse silica and ferric oxide/silica composite particles[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China Normal University, 2011 (in Chinese).
- [21] GOMES D, COSTA D, QUEIROZ JA, PASSARINHA LA, SOUSA A. A new insight in gellan microspheres application to capture a plasmid DNA vaccine from an *Escherichia coli* lysate[J]. *Separation and Purification Technology*, 2021, 274: 119013.
- [22] JIA BL, JEON CO. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives[J]. *Open Biology*, 2016, 6(8): 160196.
- [23] NOIRCLERC-SAVOYE M, GALLET B, BERNAUDAT F, VERNET T. Large scale purification of linear plasmid DNA for efficient high throughput cloning[J]. *Biotechnology Journal*, 2010, 5(9): 978-985.
- [24] KATES PA, COOK JN, GHAN R, NGUYEN HJ, SITASUWAN P, LEE LA. Incorporation of automated buffer exchange empowers high-throughput protein and plasmid purification for downstream uses[J]. *SLAS Technology*, 2023: S2472-6303(23)00005.
- [25] PEDRO H, OLIVEIRA, JUERGEN M. Marker-free plasmids for biotechnological applications-implications and perspectives[J]. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(9): 539-547.
- [26] OBERACKER P, STEPPER P, BOND DM, HÖHN S, FOCKEN J, MEYER V, SCHELLE L, SUGRUE VJ, JEUNEN GJ, MOSER T, HORE SR, von MEYENN F, HIPPE K, HORE TA, JURKOWSKI TP. Bio-on-magnetic-beads (BOMB): open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation[J]. *PLoS Biology*, 2019, 17(1): e3000107.
- [27] SUCKLING L, MCFARLANE C, SAWYER C, CHAMBERS SP, KITNEY RI, MCCLYMONT DW, FREEMONT PS. Miniaturisation of high-throughput plasmid DNA library preparation for next-generation sequencing using multifactorial optimisation[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2019, 4(1): 57-66.
- [28] PANCZA B, SZATHMÁRY M, GYURJÁN I, BÁNKUTI B, TUDÓS Z, SZATHMÁRY S, STIPKOVITS L, SIPOS-KOZMA Z, ÁSVÁNYI B, VARGA L, SZENTHE K, BÁNÁTI F. A rapid and efficient DNA isolation method for qPCR-based detection of pathogenic and spoilage bacteria in milk[J]. *Food Control*, 2021, 130: 108236.

(本文责编 陈宏宇)