

经验交流

一种制备高纯度 M13 系噬菌体 RFDNA 的简便快速方法

王辛中 周顺伍 齐顺章

(北京农业大学动物生物化学教研室)

M13 是利用广泛的克隆载体。目前制备高纯度 M13 RFDNA 载体一般用超速离心法,此法费时,设备又昂贵。1982 年 D. S. Holmes 介绍了一种不用超速离心的方法。我们主要参照这种方法及其他方法,改用酸酚抽提制备 M13RF DNA, 并以其为载体做 DNA 序列分析,结果表明此法简单、快速、产率高。所得载体纯度高也能满足序列分析的要求。

材 料 与 方 法

M13m⁹p RF DNA (北京大学生物系胡美浩先生赠)。pBR322 为本室自制。

M13RFDNA 的分离纯化

1. JM101 感受态细胞的制备与 M13 转染
从 JM101 基本培养基琼脂平板上挑一单菌落接种于 20ml YT 培养基(蛋白胨 8g/L、酵母浸提物 5g/L、氯化钠 5g/L)中。37℃ 振荡过夜。取过夜培养物按 1% 比例接种于 50ml YT 培养基中, 37℃ 振荡培养, 至 OD₆₆₀ 为 0.4—0.5 时, 离心收集菌体。以 25ml 50mM CaCl₂ 溶液悬浮菌体, 轻轻混匀, 放置冰浴 20 分钟后, 6,000 离心 10 分钟, 收集菌体。再将菌体悬浮于 2.5ml 50mM CaCl₂ 溶液中, 4℃ 贮存备用。

取 M13mp9 RF DNA 2μl (0.016ng/μl) 加入 200μl 上述感受态细胞中, 冰浴 50 分钟, 然后转入 42℃ 水浴中保温 2 分钟, 再加入 200μl 对数生长期中的 JM101、2% X-gal 50μl、100mM IPTG 10μl、0.7% 琼脂 5mL, 混匀, 铺于 1.5% 琼脂板上。同时做对照板一块。两

块板同时于 37℃ 保温, 4 小时后试验板上可见蓝色“噬菌斑”出现。

2. M13 感染菌体的培养及收集

挑上述蓝色“噬菌斑”一单菌落, 接种于 2ml YT 培养基中, 37℃ 振荡过夜。然后将 2ml 培养物于 65℃ 水浴中加热 15 分钟, 杀死细菌。倾入 20ml 对数生长前期的新细菌培养物中, 37℃ 振荡培养 7—8 小时。将细菌再按上法杀死, 再用以浸染 200ml 对数生长前期的新细菌培养物, 37℃ 振荡培养, 至 OD₆₆₀ 为 0.8—1.0 时, 加入氯霉素 (150μg/ml) 扩增 3 小时后, 6,000g 离心收集菌体, 用 50mM Tris-HCl pH8.0/10mM EDTA/50mM 葡萄糖缓冲液洗涤菌体一次, 再将菌体悬浮于 50ml 上述缓冲液中。

3. M13 RF DNA 粗提物的制备, RNase A 处理及 Sepharose 2B 凝胶柱分离, 按文献 [5] 进行。

4. M13 RF DNA 的纯化

在 M13 RF DNA 的粗提物中, 加入 1/20 体积 1M NaAc (pH4.0) 和 1/20 体积 1.5M NaCl 进行酸化。用等体积含 0.1% 8-羟基喹啉的酸酚 (50mM NaAc pH4.0 缓冲液平衡) 抽提两次。乙醚除酚三次。加入 1/20 体积的 1M Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液, 调为中性, 乙醇沉淀。离心将沉淀物真空干燥, 即为纯化的 M13 RF DNA, 将其溶于适量的 TE (10mM Tris-HCl pH8.0/1mM EDTA) 缓冲液中备用。

琼脂糖凝胶电泳: 以 0.7% 琼脂糖 (含

0.5 μ g/ml 溴乙锭)凝胶板进行平板电泳。凝胶板为 20 × 10 × 0.2cm, 电极缓冲液为 TBE 缓冲液 (89 mM Tris、89mM 硼酸、2.5 mM EDTANa pH8.3) 电压 150V、电泳 15 分钟、取出胶板在紫外灯下观察并拍照。

DNA 序列分析: 用 EcoRI 和 BamHI 按常规操作酶切 pBR322 及本法制备的 M13 RF DNA (M13mp9), 按文献 [6] 分别回收 pBR322 的小片段及 M13mp9 的大片段。

按常规方法重组 pBR322 小片段及 M13mp9 大片段, 获得重组子。

用重组子转化 JM101, 在加有 X-gal 及 IPTG 的平板上得到无色菌落。

在培养基中挑一无色单菌落进行培养, 从培养物的上清液中获得单链模板^[7]。

用获得的单链模板按 Sanger 末端终止法^[2]进行 DNA 序列分析。以国产医用 X-光片、室温自显影 2 天。

结果与讨论

本法制备 M13mp9 时, 以酸酚除去非共价闭环 DNA 能获得较纯的 M13mp9 (图 1 见封 2)。经三次酸酚抽提后, 其中共价闭环带比开环 DNA 带明显。以此提纯的 M13mp9 转化大肠杆菌, 转化率为 10⁶ 以上。

用此法获得的 M13mp9, 按 Sanger 末端终止法分析 pBR322 小片段 (图 2 见封 2), 图谱清晰, 易于读取。如果电泳时采用连续加样, 分离效果好时, 每块板可读出约 200 个碱基序列。这充分表明, 用此法制备的 M13mp9 质量是高纯度的。

本法采用多次感染方式, 比一次接种菌体后直接培养至氯霉素扩增, 可获得较高产量的 M13 RF DNA (见图 3、5)。这是因为未被浸染的细菌比被浸染的细菌生长速度快 2—3 倍^[8]。多次感染, 可使全部细菌尽量被噬菌体浸染, 以免减少未浸染的快速生长细胞数。

M13 RF DNA 像其它质粒 DNA 一样, 可加入氯霉素扩增 (见图 3、4)。但扩增时间不宜过长 (3 小时左右)。如果扩增时间过长, 则

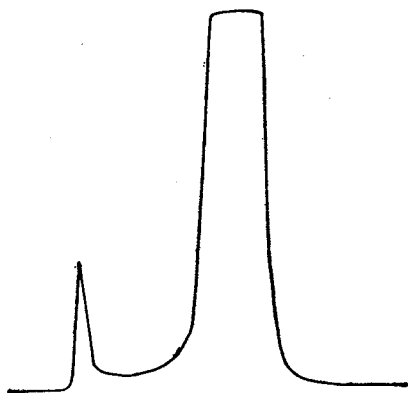


图 3 Sepharose 2B 柱层析分离

M13 RF DNA 与细胞 RNA (第一峰为 M13 RF DNA) 柱体积 1.5 × 20cm 上柱样品体积 1ml, 洗脱液 TE pH 8.0, 洗脱速度 0.5ml/秒, 多次感染方式, 不加氯霉素扩增。

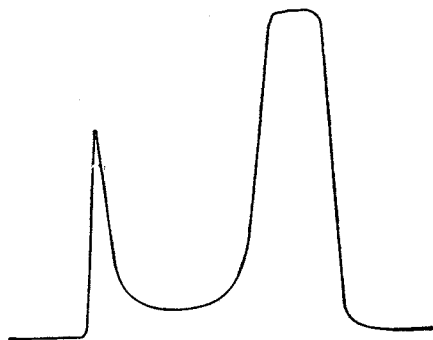


图 4 Sepharose 2B 柱层析分离 M13 RF DNA 与细胞 RNA

(第一峰为 M13 RF DNA) (洗脱条件同图 3) 多次感染方式, 加氯霉素扩增 3 小时。

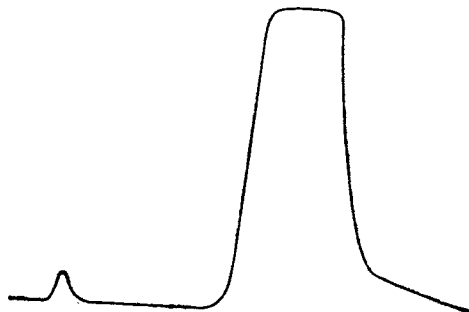


图 5 Sepharose 2B 柱层析分离 M13 RF DNA 与细胞 RNA

(第一峰为 M13 RF DNA) 一次感染, 加氯霉素扩增。

由于噬菌体大部分成熟, M13 RF DNA 以单链形式分泌到细胞外, 而使 M13 RF DNA 的

产率降低。

我们多次的实验结果是每 1000ml 培养物可获得 500 μ g M13mp9 DNA。足以满足 DNA 序列测定之用。

参 考 文 献

- [1] Sanger, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, **143**, 161, 1980.
- [2] Sanger, F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463, 1977.
- [3] Joachim Messing: *Methods in Enzymology*, Vol. 101

20, Academic Press, New York, 1982.

- [4] Holmes, D. S. *Analytical Biochemistry*, **127**, 428, 1982.
- [5] 卜明等:《生物化学与生物物理进展》, **1**, 65, 1983.
- [6] Wu Ray et al.: *Methods in Enzymology*, Vol. 68 175 Academic Press, New York, 1979.
- [7] Larry Simp: Dideoxy chain terminating method of DNA Sequence analysis, in "*Genes and Antigens of Parasites*" a laboratory manual (ed. by C. M. Morel), 1984.
- [8] 孙晋武:《微生物通报》, Vol. **10**(5) 6, 1983.

[本文于 1986 年 6 月 27 日收到]

学术态动

第六届国际支原体学术会议简况

1986 年 8 月 26 日至 8 月 31 日第六届国际支原体学术会议在美国亚拉巴马州伯明翰市召开。这次会议有美、英、法、加拿大、以色列、西德、日本、中国等 24 个国家的代表参加,共计 200 人左右。会上有 89 篇论文分别以大会报告、分组报告、专题报告等方式进行,同时还展出科学墙报 160 多篇(我国展出 5 篇)。会议内容主要包括:支原体基因结构与功能;支原体致病性的实验动物模型;支原体膜的结构与功能;支原体膜抗原;支原体病毒;植物及昆虫支原体;支原体致病性的分子基础;快速测定支原体感染;人肺炎支原体致病性的研究等等。会议期间还组织专题讨论会,如:研究支原体的基因工程技术、尿素支原体及螺旋支原体的致病性、支原体污染细胞培养液、ELISA 方法讨论等。笔者仅就参加会议期间所了解的有关支原体膜的结构与功能以及猪肺炎支原体有关研究情况作一简要介绍。

1. 支原体膜的结构与功能

这一问题包括支原体膜脂结构与分子性质的研究,例如支原体膜脂与脂质体类脂交换动力学,结果表明,脂质体可改变支原体膜上类脂的组成。在支原体细胞培养液中若加入钙离子,可导致支原体膜脂形成六角形 II 结构。³¹P-NMR 与 ¹H-NMR 研究莱氏衣原体膜上糖脂相变行为,发现莱氏衣原体细胞培养基中加入油酸,膜上单葡萄糖甘油二酯含量可控制膜脂从脂双层向六角形 II 转变。超灵敏 DSC 实验发现,莱氏衣原体细胞、细胞膜及膜磷脂制备的脂质体与完整莱氏衣原体细胞及细胞膜的相变曲线有一定的差别。这一实验结果对前人工作结果提出了修正。副流感病毒与支原体细胞膜融合时,受膜上固醇及磷脂组成的影响。外源脂肪酸对莱氏衣原体膜电位的影响,结果表明,棕榈酸、油酸及亚油酸均可使膜电位降低,其中以亚油酸作

用最为显著。冰冻断裂电子显微镜研究莱氏衣原体膜上糖脂相变行为,发现单葡萄糖甘油二酯在高温时可由脂双层转变为六角形 II 结构。莱氏衣原体膜上糖脂鉴定,发现有糖磷脂存在等。

支原体膜上 ATP 酶的分子性质一直为大家所注意。有人将莱氏衣原体 B 菌株膜上 (Na⁺-Mg²⁺)-ATP 酶分离纯化后,重组于不同磷脂脂质体上,结果发现,ATP 酶重组活性在 PC 及 PE 脂质体上比 PS 和 PG 脂质体上为高。鸡败血支原体膜上存在两种 ATP 酶,即在 pH7.0 时为 ⁺H-ATP 酶,而在碱性 pH 时具有 ⁺Na-ATP 酶活性。用免疫学技术发现鸡败血支原体膜上与膜脂结合的 ATP 酶具有类似 F₀-F₁ATP 酶的性质。猪肺炎支原体膜上 ATP 酶为镁离子激活, DCCD、寡霉素均不能抑制,只有 NBD 与 Quercetin 才有抑制作用。此外还有人采用基因工程技术研究支原体膜上 ATP 酶的结构与性质。

2. 猪肺炎支原体致病性的研究

猪肺炎支原体是引起猪喘气病的病原体,全世界广泛流行,在农业上造成很大损失,至今尚无有效防治措施。会议反映出对猪肺炎支原体致病性的研究日益受到重视。从诊断、治疗以及寻找致病性抗原均开展了一些工作。在诊断方面,采取血清学方法,包括 ELISA、间接血凝实验、猪喘气病早期诊断血清学反应等等。

猪肺炎支原体致病性的分子基础,近年来不少人认为致病性与膜上抗原物质有关,有人采用单克隆抗体技术鉴定猪肺炎支原体膜上表面抗原,探讨抗原与膜脂相互作用及抗原的免疫特性。用凝胶电泳,免疫吸附等技术鉴定猪肺炎支原体膜抗原性质,探讨不同类型抗原与致病性的相关性。用单克隆抗体技术发现

(下转第76页下)

为本刊试办“研究快报”专栏告作者

目前科技期刊发表论文的周期长,不仅影响学术交流,也不利于作者获得首次发表的机会,这是科研工作者所关心的问题。本刊愿为改变此种状况尽一点力量,拟从 1987 年起试办“研究快报”专栏,以简报的形式尽快地刊出科研工作报告。凡符合刊出要求的稿件,保证自收到之日(以邮戳为凭)起 5—7 个月内刊出;不符合要求者,两个月内负责退稿。

对“研究快报”专栏的稿件具体要求如下:

1. 须附单位推荐发表的证明信;
 2. 快报以文字为主,一般不附图(如有极少数附图,作者应按出版要求用绘图纸绘制好);
 3. 文字应简明扼要,不得超过一千字。请用 16 开 400 格绿或蓝条稿纸写清楚、工整,一式两份;
 4. 另纸打印给出英文标题和作者姓名的汉语拼音。
- 凡符合上述要求的稿件,审查通过后,尽快处理,优先发表。

《生物化学与生物物理进展》编辑部

“一种制备高纯度 M13 系噬菌体 RFDNA 的简便快速方法”一文的图 1 及图 2

图 1 M13P⁺RF DNA
琼脂糖凝胶电泳图

a. Sepharose 2B 柱
层析第一峰
b. 酚抽提三次后
的 M13RF DNA

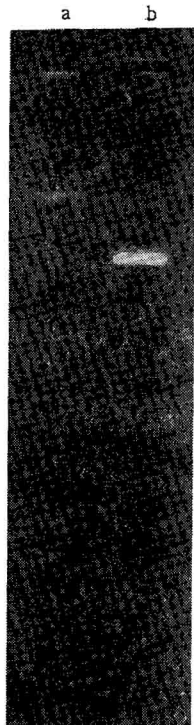


图 2 pBR322 小片段
顺序电泳图谱

8% 聚丙烯酰胺凝
胶, 8M 尿素, 胶厚
0.4mm, 1300V, 3mA,
右侧四道为电泳 1 小时
结果, 左侧四道为电泳
2 小时结果

