

3 讨 论

在本分析方法中采用超滤法制备样品^[2], 超滤管内的超滤膜可截留相对分子质量 10 000 以下的蛋白质与蛋白污染物, 可免去采用酸或有机溶剂沉淀法, 是样品衍生前净化的一种快速、简便的方法。

血液内 Gln 极易在室温下衰减, 因此, 采取后的血浆超滤后即存放在 -80°C 低温冰箱, 一月内无改变。

衍生剂邻苯二甲醛是最广泛而适用的柱前衍生剂^[3], 但浓度不宜高, 衍生时间不宜超过 3 min, 否则其他氨基酸杂峰过多, 影响 Gln 的分离效果, 硼酸缓冲液平时应放在 37°C 恒温箱内保存, 否则缓冲液内硼砂易有结晶沉淀。

参 考 文 献

- 1 Martin F, Suzudi A, Hirel B. Analytical Biochemistry, 1982; **125**: 24
- 2 仲 宁, 李永田, 张金辉. 色谱, 1994, **5**: 369
- 3 Roth M. Anal Chem. 1971; **43**: 880

Determination of Plasma Glutamine by High Performance Liquid Chromatography. Liu Fangnan, Sheng Xueqin, Chen Yongming (Laboratory of General Surgery, Nanjing General Hospital of PLA, Nanjing 210002, China).

Abstract Plasma glutamine was measured, following ultrafiltration by high performance liquid chromatography with a mean recovery of 96.75%, linearity of the measurement was in the range of 130 to 1300 $\mu\text{mol/L}$ ($r=0.9906$). Normal values in healthy adults was (694.97 ± 102.31) $\mu\text{mol/L}$ in male and (623.79 ± 99.27) $\mu\text{mol/L}$ in female with a significant difference ($P < 0.05$). The method is simple, efficient in performance and can be applied in the study of bowel structure and function and in routine measurements in nutritional support.

Key words high performance liquid chromatography, ultrafiltration, glutamine

一种构建重组杆状病毒的简易方法

李迎秋 施先宗¹⁾ 吴文言 龙繁新 王珣章

(中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

摘要 对传统构建重组杆状病毒的方法作了如下改进: 先用磷酸钙共沉淀法单独将质粒 DNA 转进昆虫 Sf 细胞中, 其中重组质粒采用聚乙二醇沉淀法纯化, 12~24 h 后再用低剂量的病毒攻击细胞。改进后的方法简便、省时、经济、重组率高, 适于一般实验室使用。

关键词 重组杆状病毒, 磷酸钙共沉淀, 感染复数, 聚乙二醇沉淀法

构建重组杆状病毒的传统方法是通过共转染, 即用磷酸钙共沉淀法将质粒 DNA 与病毒 DNA 同时导入昆虫细胞, 两种 DNA 在转染细胞内发生等位基因交换, 5~10 d 后可得到重组毒株。其中, 高质量的 DNA 是有效转染的

关键^[1]。采用 CsCl-溴化乙锭密度梯度离心法纯化载体质粒及提取完整的病毒 DNA 需要有一定的经验, 且操作繁琐, 费时。尽管这种共

¹⁾ 华中师范大学昆虫学研究所, 武汉 430070.

收稿日期: 1995-11-17, 修回日期: 1996-03-13

转染法存在一些不尽人意之处,但较之于将病毒线性化等其他方法^[2],其费用低,仍然是国内一般实验室所使用的常规手段.为克服其缺点,我们根据经验作了一些改进,改进后的方法操作较传统方法简单、费用低,且重复性好,适于国内一般实验室使用,现介绍于下:

首先,用磷酸钙共沉淀法先单独将质粒 DNA 转进昆虫 Sf 细胞中,12~24 h 后再用低剂量的病毒攻击细胞,2~3 d 后即可见重组病毒,具体操作如下:用仅含转移载体质粒的转化液 0.5 ml 转化处于对数生长期的细胞,培养 4~6 h 后,弃去转化液,加新鲜培养基培养 12~24 h.然后,用感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 约为 0.1~1 的病毒液 (可用如前制备的质粒转化液稀释) 攻击转化的细胞.病毒吸附 1 h 后弃去病毒液,加入新鲜培养基继续培养,2~3 d 后可见重组病毒.

我们以病毒粒子代替病毒 DNA 进行重组杆状病毒的构建,主要依据是目前重组杆状病毒多根据同源重组的原理而构建^[1],而同源重组的前提是细胞中有一定量的完整的病毒 DNA.用病毒感染当比用裸露的病毒 DNA 转染更有效,因为在病毒复制之时,有可供同源重组之用的高质量病毒 DNA,而用病毒 DNA 转染涉及到超螺旋 DNA 的多寡及病毒进入细胞后未被降解的 DNA 的量等一系列问题.省略病毒 DNA 的提取,至少可以节省一周时间,操作也大为简化.至于病毒感染定在 12~24 h 之后且用 MOI 为 0.1~1 的病毒量,主要考虑到质粒转化必须在病毒复制之前,并根据 Kool 等^[3]作瞬时表达检测 (transient expression assay) 分析杆状病毒复制起始点的实验结果而选定的.

其次,我们采用 PEG 8000 沉淀法纯化转移载体质粒,代替传统的 CsCl 密度梯度离心法,具体方法参照文献 [4].经我们反复试验,证明采用聚乙二醇沉淀法纯化的重组质粒,其纯度符合要求,用来作共转染,可得到较高的重组率.该法简便、快速、廉价,且适

量的聚乙二醇可促进 DNA 进入细胞,从而提高病毒重组率.

总之,用这种改进的方法构建重组杆状病毒,与传统方法相比,由于省略病毒 DNA 的提取,至少可以节省一周时间,操作也大为简化;且采用 PEG8000 沉淀法代替传统的 CsCl 密度梯度离心法来纯化转移载体质粒,具有避免环境污染、操作简便、费用低、重复性好等优点.改进后的方法缩短了重组病毒出现所需的时间,适于国内一般实验室采用.

参 考 文 献

- 1 Summers M D, Smith G E. 1987. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station, Bulletin No. 1555
- 2 施先宗, 陈曲侯. 生物化学与生物物理进展, 1995; 22: 132
- 3 Kool M, Voeten J T M, Goldbach R W *et al.* J Gen Virol, 1994; 74: 2661
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* 1989. Molecular cloning, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1989: 1.40~1.52

A Simple Method for Constructing Recombinant Baculovirus. Li Yingqiu, Shi Xianzong, Wu Wenyan, Long Qingxin, Wang Xunzhang (State Key Laboratory for Biological Control, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China).

Abstract Traditional method of constructing recombinant baculovirus was modified: Transfer only recombinant plasmid DNA which was purified by PEG precipitation into insect cells first, then attack these cells with low dose virions 12~23 hours later. This method is simple, convenient, time saving, economical and has a high ratio of recombinant viruses. It is suitable for general laboratories.

Key words recombinant baculovirus, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ coprecipitation, multiplicity of infection, PEG precipitation