

重组质粒 pCB 的构建

顾懋治 江福美 蔡名杰 吴祥甫

(中国科学院上海生物化学研究所)

质粒是基因工程中的重要运载体之一。按照一定的目的,人工建造适合特殊需要的重组质粒,已成为遗传工程技术的重要方面^[1]。质粒构建包括:质粒分离纯化;限制酶切割;选择所需的质粒 DNA 片段;用连接酶进行体外连接;转化受体细菌和重组质粒的筛选。我们选择带四环素和氨基苄青霉素耐药标记的质粒 pBR322 和带卡那霉素耐药标记的质粒 pCR1 进行体外重组,以期建立方便易行的质粒重组技术。本文将报道带有四环素、氨基苄青霉素、卡那霉素耐药标记的重组质粒 pCB 的构建。

一、方 法

大肠杆菌 504 (F^- 、 Δlac 、 tsx^- 、 trp^- 、 $thyA^-$ 、 $strA^-$ 、 deo^-) 菌株,带有 pCR 1 质粒,由法国巴斯德研究所赠给;大肠杆菌 8021 菌株,带有 pBR 322 质粒,由中国科学院生物物理研究所赠给;大肠杆菌 C_{600} 菌株,由英国爱丁堡大学赠给。

1. 质粒 DNA 制备 大肠杆菌 504(pCR1) 或大肠杆菌 8021 按 2% 接种量接入 200 毫升 PBYP 培养基(每升含蛋白胨 8 克、酵母浸膏 5 克、牛肉膏 5 克、葡萄糖 4 克、氯化钠 5 克, pH 7.2)中,在 37°C 振荡培养至对数生长期后期,加入氯霉素,使最终浓度为 170 微克/毫升,继续振荡培养过夜。培养液冰冷后,离心收集菌体,用 0.05M Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)洗涤一次,离心收集的菌体即悬于 5 毫升 25% 蔗糖-0.05 M Tris(pH 8.0)溶液中,缓缓加入 5 毫克溶菌酶(2 毫克/毫升配于 0.05 M Tris-0.005 M EDTA-0.05 M NaCl pH 8.0 溶液),同时加入 0.25 M EDTA

(pH 8.0)溶液 2 毫升,室温轻轻转动 15—30 分钟,待细菌悬液粘度增加后,在冰浴中冰冷。用冰冷的滴管将细菌悬液缓缓地加入到等体积冰冷的裂解液中,并用滴管吸吹使之混合(裂解液配制为:1 克 Brij 58, 0.4 克去氧胆酸钠溶于 100 毫升 0.05 M Tris-0.0625 M EDTA pH 8.0 缓冲液中),此混合物很快呈较透明的粘稠状。3 万转/分钟,离心 30 分钟后,吸取上层淡黄色清裂解液;向清裂解液中加入 RNAase A,使最终浓度为 50 微克/毫升(RNAase A 按 1 毫克/毫升配制于 0.01 M pH 5.0 醋酸钠缓冲液中,并预先经 90°C, 15 分钟处理三次,灭活可能存在的 DNAase 活性) 37°C 保温 15 分钟,然后用氯仿-异戊醇(24:1)或苯酚处理 3—4 次,抽取质粒 DNA,抽提所得的 DNA 溶液对 0.01 M Tris-0.001 M EDTA-0.2 M NaCl 溶液(pH 8.0)透析过夜。透析过的质粒 DNA 溶液用 2N NaOH 调至 pH 12.5,在冰冷或室温下维持 3 分钟后,立即用 2N HCl 调至 pH 7.0,使染色体 DNA 变性,然后用甲酯化白蛋白硅胶土(MAK)柱分离^[2],除去变性的染色体 DNA,得到较为纯化的质粒 DNA 溶液,对 0.01 M Tris-0.001 M EDTA pH 8.0 溶液透析后,将质粒 DNA 溶液在 -20°C 保存备用。这样制备的质粒 DNA 可以保存半年以上,转化活力和电泳图谱均不改变。

2. EcoR 1 酶解^[3] 用 EcoR 1 酶解质粒 pBR 322 和质粒 pCR 1 DNA,获得具有相同粘着末端的二个质粒的线状 DNA 分子。酶解条件:分别取 100 微升质粒 pBR322 DNA 和质粒 pCR1 DNA 溶液(浓度均为 50 微克/毫升),混合后加入 3 微升 1M 氯化镁和 3 微升 EcoR 1 酶

(EcoR 1 酶为我所东风生化试剂厂生产,活力为 20,000 单位/毫升), 37℃ 保温 1 小时, 然后 65℃ 保温 5 分钟, 终止酶反应, 酶解样品立即冰冷。

3. T₄ DNA 连接酶连接 上述酶解样品在冰冷条件下加入 6 微升 3M Tris-HCl(pH 8.0), 1 微升 1M 氯化镁, 1.5 微升 1M 巯基赤藓醇, 5 微升 3mM ATP, 2 微升 T₄ 连接酶(由中国科学院生物物理研究所赠给, 活力为 25,000 单位/毫升), 反应混合物在 0℃ 放置 18 小时, 完成质粒 pCR1 DNA 和 pBR 322 DNA 的共价连接。

4. 转化、扩增和筛选 转化试验的受体菌为大肠杆菌 C₆₀₀ 菌株。过夜培养的大肠杆菌 C₆₀₀, 按 2% 接种量接入 50 毫升 PBY 培养基中, 37℃ 振荡培养至对数前期, 培养液冰冷后低温离心收集菌体, 将菌体悬于 50 毫升冰冷的无菌 CaCl₂ (50m M CaCl₂-50 微克胸腺嘧啶/毫升) 溶液中, 0℃ 放置 10 分钟后离心收集菌体, 再悬于 5 毫升上述 CaCl₂ 溶液中, 冰浴放置 30 分钟内使用。取 0.2 毫升上述经 CaCl₂ 处理的菌液加入到前述用 T₄ 连接酶连接的样品中, 0℃ 放置 10 分钟后, 转至 37℃ 保温 5 分钟, 立即加入 2.7 毫升 PBY 培养基, 在 37℃ 振荡培养 45 分钟, 然后全部转入 20 毫升含四环素 5 微克/毫升、氨基苄青霉素 10 微克/毫升、卡那霉素 10 微克/毫升的 PBY 培养基中, 37℃ 继续培养 24 小时, 以扩增耐四环素、氨基苄青霉素、卡那霉素的转化体。培养液稀释后取 0.1 毫升涂于含四环素 10 微克/毫升、氨基苄青霉素 10 微克/毫升、卡那霉素 10 微克/毫升的 PBY 琼脂平皿上, 37℃ 培养 24 小时, 待菌落形成后挑取 50 个菌落, 再在含四环素 20 微克/毫升、氨基苄青霉

素 50 微克/毫升、卡那霉素 25 微克/毫升的 PBY 琼脂平皿上检查这些菌落的耐药性, 发现所选出的 50 个菌落都具耐四环素、氨基苄青霉素、卡那霉素的性状。挑取单个菌落转接于斜面保存。

二、结果和讨论

1. 耐药性试验 在 50 个菌株中选择一个菌株在含不同抗菌素浓度的琼脂平皿上进行耐药性试验, 证实了该菌株对这三种抗菌素具耐药性, 见表 1, 我们命名该菌株为 C₆₀₀(pCB)。

2. 琼脂糖凝胶电泳鉴定 按前述质粒分离纯化的方法由 C₆₀₀(pCB) 培养液制备质粒 pCB, 经琼脂糖凝胶电泳后, 溴吡啶(2 微克/毫升)染色半小时, 在紫外分析灯下观察, 可以见到一条清晰的质粒 DNA 区带。用水平板琼脂糖凝胶电泳比较质粒 pCR1、pBR 322、pCB 并比较这三个质粒 DNA 的 EcoR 1 酶解电泳图谱, 见封三图 1。可以看到质粒 pCB DNA 分子较质粒 pCR1 和 pBR 322 DNA 分子均大, 同时质粒 pCB DNA 用 EcoR1 酶切, 可得到二个片段, 其中一个片段与质粒 pBR 322 相同, 另一个片段与质粒 pCR1 相同。证明质粒 pCB 是由质粒 pBR 322 和 pCR1 重组构成。

3. 电镜观察 也证实了质粒 pCB DNA 分子较质粒 pCR1 和质粒 pBR322 DNA 分子为大。见封三图 2。

4. 再转化实验 以大肠杆菌 C₆₀₀ 作受体菌, 用纯化的重组质粒 pCB 进行转化试验, 证明质粒 pCB DNA 具有转化活力。转化体仍保持 C₆₀₀ (pCB) 菌的耐药性。

可见, 我们用质粒 pBR 322 和质粒 pCR1 经

表 1 C₆₀₀(pCB) 耐药性实验结果

菌 株	四 环 素		氨基苄青霉素		卡 那 霉 素	
	25 微克/毫升	50 微克/毫升	50 微克/毫升	100 微克/毫升	25 微克/毫升	50 微克/毫升
504(pCR1)	-	-	-	-	+	+
8021(pBR 322)	+	+	+	+	-	-
C ₆₀₀ (pCB)	+	+	+	+	+	+
C ₆₀₀	-	-	-	-	-	-

[注] +表示菌生长正常, -表示菌不生长。

体外重组得到了重组质粒 pCB。重组质粒带有四环素、氨基苄青霉素和卡那霉素耐药标记,分离纯化的 pCB 质粒具有转化活力。琼脂糖凝胶电泳图谱说明 pCB 质粒包含有质粒 pBR 322 和 pCR1 DNA 片段,其分子大小应为 pBR322 DNA 分子和 pCR1 DNA 分子量之和,电镜观察也与电泳结果相符,证明质粒 pCB 是质粒 pBR 322 和质粒 pCR 1 的重组体。

近年来, DNA 重组技术已有大量报道^[4],我们在构建重组质粒 pCB 时,作了一些改进。质粒分离纯化主要采用了 Clewell^[5] (1972) 报道的方法得到清裂解液,结合甲酯化白蛋白硅藻土柱分离得到较为纯化的质粒 DNA,方法比较简便。Mandel^[6] (1970) 用 CaCl_2 处理受体菌得到感受态细菌,这一方法已在 DNA 重组工作中普遍采用。但因在 H1 生长培养基中,受体菌生长较差。近年来文献中已有报道用 LB 培养基代替 H1 培养基^[7]。我们用 PB Y 培养基也得到了较好的转化效果。转化过程完成后,细菌

在含抗菌素浓度较低的 PB Y 培养基中扩增 24 小时,这样不但能减少带非重组质粒的细菌的比例,而且可以扩增带重组质粒的转化体。我们认为这对带重组质粒的转化体的选出是有利的。总之,本文报道的质粒重组方法简便,效果较好。

电镜照片由我所戴培梓同志制作,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Bahl, C. P., Mariani, K. J. et al.: *Gene*, **1**, 81—92, 1976.
- [2] 敖世洲,王二力、高美华、沈卫英:《生物化学和生物物理学报》,待发表。
- [3] Tanaka, T., Weislum, B.: *J. Bacteriol.*, **121**, 354—362, 1975.
- [4] Sinsheimer, R. L.: *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 415—438, 1977.
- [5] Clewell, D.B.: *J. Bacteriol.*, **110**, 667—676, 1972.
- [6] Mandel, M., Higa, A.: *J. Mol. Biol.*, **53**, 159—162, 1970.
- [7] Cohn, R. H. et al.: *Cell*, **9**, 147—161, 1976.

[本文于 1979 年 5 月 18 日收到]

用 T_4 RNA 连接酶连接两个四核苷酸 AGAG 和 pGUCU

申同健 杨岐生 陆传宗

(中国科学院生物物理研究所)

自从发现 T_4 RNA 连接酶催化寡核苷酸片段之间的连接反应^[1-3]以来,它在核酸合成方面的应用日益广泛。由于它催化合成的产率较高,没有显著的逆向降解反应,不要求模板,所以是很有希望的工具酶。然而,迄今为止,用它成功地连接的核糖核酸片段,接点处的核苷酸多半是腺嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸^[1-4],含有鸟嘌呤核苷酸的例子较少。

在我们合成酵母 tRNA^{ala} 第 42—49 核苷酸片段工作中,需要将四核苷酸 AGAG 和 pGUCU 相连接,接点两侧的核苷酸恰好都是鸟嘌呤核苷酸。当时还未见用 T_4 RNA 连接酶成功地连

接此种接点的报道。我们在初步工作中发现,在通常 T_4 RNA 连接酶的反应条件^[1-4]下不能有效地连接这个接点,而当降低反应温度后连接却进行得相当顺利,可以获得较高的产率。

材 料 和 方 法

四核苷酸 AGAG^[5],四核苷酸 GUCU^[6]均由本室三、四组提供。 T_4 RNA 连接酶先后由本室、上海连接酶制备组、北京大学和北京连接酶制备组提供。 T_4 多核苷酸激酶由上海细胞研究所、上海生物化学研究所提供。 γ - ^{32}P -ATP 按 Schendel 法^[7]制备,比放射性在 10^8 — 10^9 cpm/

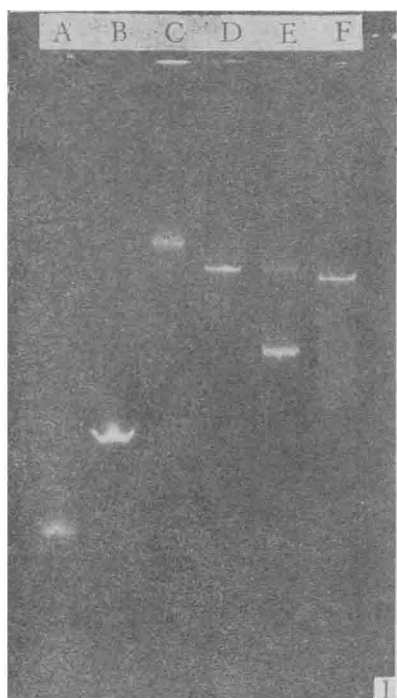


图1 平板琼脂糖凝胶电泳图谱

A: 质粒 pBR 322, B: 质粒 pBR 322 用 EcoRI 酶解 C: 质粒 pCB, D: 质粒 pCB 用 EcoRI 酶解, E: 质粒 pCR1 F: 质粒 pCR1 用 EcoRI 酶解, 电泳条件: 0.7% 琼脂糖, 电压 80V, 用 0.04M Tris-醋酸缓冲液 (pH 8.0), 电泳进行 5 小时。



图2 重组质粒 pCB 电子显微照片 50,000 ×

用里程计测量了五个 pCB 质粒的不同电镜照片, 得到平均分子长度为 $5.3\mu(5.0\mu-5.5\mu)$ 。换算成平均分子量约为 10.97×10^6 道尔顿, 相当于文献报道的 pCR1 (8.7×10^6 道尔顿) 和 pBR 322 (2.6×10^6 道尔顿) 两质粒分子量之和。

