

经验交流

改善大分子质粒 DNA 重组效率的新方法*

谭德勇 邓双胜 孟 玲 替瑞光

(云南大学生物系, 昆明 650091)

摘要 采用两次连接法对一个质粒载体为 7.65 kb, 插入子为 1.47 kb 的片段进行重组连接, 使连接效率大大提高. 此方法对于大分子的质粒 DNA 重组是非常有效的.

关键词 质粒 DNA, 重组效率, 二次连接法

在进行质粒 DNA 的重组时, 小分子质粒 DNA 易于重组, 而大分子的质粒 DNA 较难重组成功. Dugaiczky 等的研究指出, 线状 DNA 连接时, 既可以形成环状, 也可以形成线状多聚体, 取决于参数 j 和 $i^{1/2}$. j 即是 DNA 分子的一个末端在另一个末端附近的有效浓度, 它与 DNA 分子的长度 l 和分子中随机卷曲区段的 DNA 长度 b (受缓冲液离子强度 Z 的影响) 有关, 数学表达式为:

$$j = [3/(2lb)]^{3/2} \tag{1}$$

对于给定长度的 DNA 分子来说 j 是一个常数, 与 DNA 的浓度无关. i 是溶液中所有互补末端浓度的测量值, 它与 DNA 的摩尔浓度 M 有关, 数学表达式为:

$$i = 2N_0M \times 10^{-3} \tag{2}$$

N_0 为阿佛加德罗常数. 线状 DNA 连接时, j 值越大, DNA 分子越易于自身环化, i 值越大, 分子间越易于形成聚合体. 以质粒作载体与外源 DNA 重组时, 首先要使载体与外源 DNA 之间聚合, 而尽量减少载体的自身环化, 这就要求 i 值大, j 值小; 当形成二聚体后, 则希望反应趋向自身环化, 这就要求 j 值大 i 值小. 根据 (1) 式, 线状载体 DNA 与外源 DNA 形成二聚体后, 线状 DNA 分子变长, j 值变小, 这是不利于自身环化的. 因此, 在同一个反应中是不可能使聚合反应和环化反应都

达到最佳条件. 这就是为什么大分子质粒 DNA 重组较困难的原因. 一般实验指导建议通过调节 DNA 的浓度和插入子和载体的摩尔浓度比以克服上述困难^[1], 但实际上这是很困难的. 我们采用二次连接法克服了这一困难, 使大分子质粒 DNA 的重组效率大大提高.

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pC53-SN3^[2] 由美国 Hopkins 大学 Vogelstein 教授赠送, pBM 由实验室用 pBluscript sk (+/-) 和 pMSG 重组而得^[4]. 宿主菌 HB101 由华西医科大学孙芝琳教授提供. 限制性内切酶购于华美生物医学工程公司. T4 DNA 连接酶购于 Promega 公司.

1.2 方法

DNA 连接按说明书操作. 质粒转化采用氯化钙法^[3].

二次连接重组法: 第一次连接反应, 在 10 μ l 的反应体系中, 含有 1 μ g 载体 DNA 片段, 0.4 μ g 的插入子 DNA 片段 (插入子: 载体 = 2: 1), 1 μ l 缓冲液, 5U 的连接酶. 16 $^{\circ}$ C 过夜. 连接产物用 1 $\times$ TE (10 mmol/L

* 云南省教委基金和云南省科委应用基础研究基金资助项目.
收稿日期: 1996-04-02, 修回日期: 1996-08-02

Tris•HCl, 1 mmol/L EDTA pH 8.0) 补充到 100 μ l, 加 2 倍体积乙醇沉淀, 10 μ l 1 $\times$ TE 溶解沉淀, 取 5 μ l 加入到 40 μ l 的反应体系中, 加入 4 μ l 的缓冲液, 5U 的连接酶, 22 $^{\circ}$ C 反应 2 h. 连接产物全部用于转化.

2 结果和讨论

质粒 pC53-SN3 和 pBM 的重组示意图见图 1, pC53-SN3 和 pBM 用限制性内切酶 XbaI 和 SalI 消化后分别得到 7.65 kb 和 1.47 kb 两片段, 其中 7.65 kb 的片段含有复制起点和 Amp 抗性用于转化筛选, 1.47 kb 片段为待插入片段.

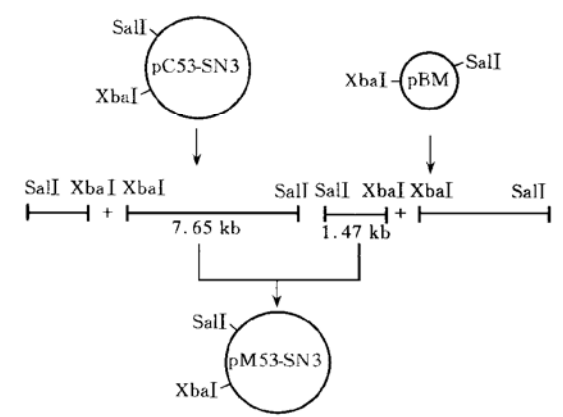


图 1 质粒 DNA 重组方案

当用 T4 DNA 连接酶进行第一次连接时, 用 0.8% 的琼脂糖进行电泳检查表明载体 DNA 和插入子 DNA 之间形成了二聚体(图2),

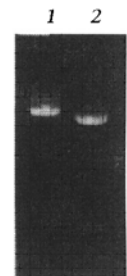


图 2 第一次连接产物的电泳分析
1: 连接片段; 2: 未连接片段.

但将连接产物转化大肠杆菌时, 则没有一个克隆形成 (图 3a), 表明形成的二聚体没有环

化. 将连接产物进行第二次连接后再转化大肠杆菌, 转化可获得许多克隆 (图 3b), 表明第二次连接时使线状 DNA 得以环化. 将转化获得的克隆扩增后提取质粒 DNA 进行 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分析, 10 个克隆中分离的质粒 DNA 都一样大小 (结果未显示). 进一步进行限制性内切酶分析其中的 4 个克隆, 其中的 3 个克隆均为所需的转化子.

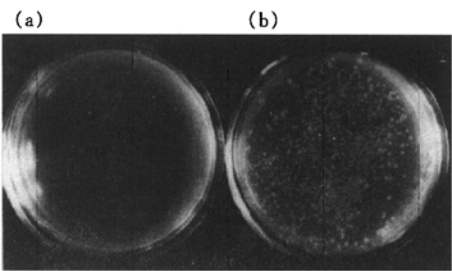


图 3 一次连接和两次连接法克隆效果比较
(a) 一次连接产物克隆; (b) 二次连接产物克隆.

在连结反应中, 高浓度的 DNA 有利于分子间的聚合, 而低浓度的 DNA 有利于分子的自身环化^[1]. 质粒 DNA 的重组反应中, 既要使分子间发生聚合又要分子内能自身环化, 这就要求有一个合适的浓度使这两个反应都能进行. 然而重组反应常常都是微量反应, 一般都不进行系列的浓度条件摸索. 对于小分子质粒 DNA 的重组, 由于重组线状分子的 j 值较大, 用高浓度的 DNA 促进分子间聚合的同时分子内也能自身环化, 而大分子质粒由于 j 较小, 自身环化困难, 在有利分子间聚合的 DNA 浓度条件下分子内的环化的可能性很小, 这就是大分子质粒重组较困难的原因. 本法在一次连接反应中用较高的 DNA 浓度促进分子间的末端连接, 然后用较低的 DNA 浓度, 由于不利于分子间的反应, 而相对有利于分子内的环化, 因而克服了前述困难, 使大分子质粒的重组效率大大提高. 我们用常规方法进行了很长时间的实验, 摸索不同的浓度和载体/插入子比例, 以及 50 μ l 和 100 μ l 反应体积等条件均遭失败, 采用本法一次就获得成功, 由此表明这

是一个构建大分子环状质粒DNA的有效方法.

参 考 文 献

1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1. 25~ 1. 107

2 Baker S J, Markowitz S, Fearon E R *et al.* Suppression of human colorectas carcinoma cell growth by wild-type p53. Science, 1990, **249**: 912~ 915

3 孟 玲, 谭德勇, 王焕校. CaCl₂ 法质粒转化最佳条件的探讨. 云南大学学报 (自然科学版), 1996, **16** (2): 106~ 108

4 谭德勇, 邓双胜. 不用接头进行异末端 DNA 重组的方法. 云南大学学报 (自然科学版), 1996, **16** (2): 103 ~ 105

Improving the Recombination Efficiency of Larger Plasmid DNA by Two-ligation. TAN Deyong, DENG Shuangsheng, MENG Ling,

ZAN Ruiguang (*Department of Biology, Yunnan University, Kunming 650091, China*).

Abstract A method of improving the recombination efficiency of larger plasmid DNA is introduced. The major manipulation of this method is that the ligation reaction between insertor and vector is separated from cycle reaction of ligation, and they carry out in different reaction condition. Using this method, the efficiency of the recombination between 7.65 kb vector and 1.47 kb insertor is improved obviously. It is a good method for recombination of larger plasmid DNA.

Key words plasmid DNA, recombinatin efficiency, two-ligation

PS II 反应中心 D1 蛋白的小肽抗体的制备和鉴定*

李晓鹏 杜林方¹⁾ 梁厚果 吴宛菽
(四川联合大学生物系, 成都 610064)

摘要 用人工合成的 PS II 反应中心 D1 蛋白中 (229~ 240) 的 12 肽, 与牛血清白蛋白偶联后做为抗原免疫家兔, 获得抗菠菜 D1 蛋白抗体. 免疫双扩散法测得其具有较高的效价, 蛋白印迹检测结果显示该抗体仅与 D1 蛋白有免疫亲和反应. 表明此抗体可作为检测 D1 蛋白及其光抑制时降解产物的探针.

关键词 D1 蛋白 (229~ 240) 12 肽, PS II 反应中心, 抗 D1 蛋白多克隆抗体, 蛋白质印迹

光系统 II 反应中心 (PS II RC) 负责光能的转换、电子和质子的产生以及分子氧的释放这一过程的启动. 1987 年, Nanba 和 Satoh^[1] 首次分离得到 D1-D2-Cyt b559 反应中心复合物, 证实由叶绿体 psbA 和 psbD 基因编码的 D1 和 D2 多肽是 PS II RC 的主要功能蛋白. 它们结合着 P680, 脱镁叶绿素 a (Pheo a) 和 β-胡萝卜素 (β-Car)^[2], 并且含有 PS II 电子传递链中最重要的组分 Z 和 D^[3], 还为与水裂解相关的锰簇提供结合位点^[4,5]. 其中的 D1 蛋白

又称 Q_B 结合蛋白或除草剂结合蛋白, 在光照下快速周转代谢, 半衰期 (与所照光的光强相关) 仅约 30 或 60 min^[6], 而强光下发生的光抑制现象也与 D1 蛋白的降解相关^[7]. 为了研究光对 D1 蛋白快速周转代谢的调控, 分析光抑制时 D1 蛋白降解的产物, 弄清 PS II 反应中心各亚基间的相对空间位置和组织结构, 我们

* 国家自然科学基金资助项目 (39400009).
¹⁾ 通讯联系人.
收稿日期: 1996-06-12, 修回日期: 1996-10-03