

- 5 Feramisco J R, Smart J E, Burrige K, *et al.* Co-existence of vinculin and a vinculin-like protein of higher molecular weight in smooth muscle. *J Biol Chem*, 1982, **257** (18): 11024~ 11031

Rapid Amplification of 3' cDNA End of BmKIT3 by Two-step PCR. ZHU Shun-Yi, LI Wen-Xin (*Department of Virology and Molecular Biology, Wuhan University, Wuhan 430072, China*).

Abstract A modified method of 3'-RACE (rapid amplification of 5'-cDNA ends) can rapidly amplify

3'-end of a cDNA only by using a specific primer and Oligo dT. Contrast with the typical 3'-RACE, two-step PCR not only have the advantages of less cost and shorter experimental time, but can also improve specificity of PCR. This method especially fits for rapid cloning and characterization of the genes encoding the peptides with biological activity.

Key words PCR, 3' cDNA end, *Buthus martensii* Karsch

一种快速简便的 CaCl_2 质粒转化方法

肖庚富 齐义鹏¹⁾ 李莉 易巍

(武汉大学病毒学及分子生物学系, 武汉 430072)

摘要 介绍一种质粒 DNA 快速转化方法. 质粒 DNA 加入感受态细胞, 冰浴 3~ 10 min, 涂布预热至 37℃ 的平板, 即可获得与常规转化方法相当的转化效率. 操作步骤由 5 步减至 2 步, 时间由 2 h 减至 3~ 10 min. 同时探讨了 Ca^{2+} 浓度、4℃ 保存时间等因素对感受态细胞转化效率的影响.

关键词 质粒, 转化, 感受态细胞

学科分类号 Q785

质粒转化是分子克隆中最常用的关键技术之一. 1972 年、1973 年 Cohen^[1,2] 用 CaCl_2 法成功地将 R 因子和重组质粒 DNA 导入大肠杆菌细胞. 此后, CaCl_2 法作为一项经典转化技术沿用至今, 其间虽有小的改进, 但都旨在提高转化效率. 转化过程一般需要 2 h 左右. 本文对大肠杆菌感受态细胞的制备、保存、质粒转化条件进行了较为系统的研究, 提出了快速、简便的质粒转化方法.

1 材料和方法

1.1 材料

受体菌 TG1、DH5 α 由本室常规保存. 质粒 pBlue 为 Stratagene 公司产品; 质粒 pCA13、pBHG11 为 Microbix Biosystems 公司产品; 质粒 pC53-SN3 由约翰·霍普金斯肿瘤中心 Vogelstein 教授赠送.

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌感受态细胞的制备

常规法: 取活化菌液 1.5 ml, 10 000 r/min 离心 15 s, 加冰预冷的 75 mmol/L CaCl_2 500 μl 重悬细胞, 冰浴 30 min, 再 10 000 r/min 离心 15 s, 加

CaCl_2 100 μl 重悬细胞. 用前新制或 4℃、-70℃ 冻存. 参见文献 [4, 5].

后冰浴法: 同上, 但在第一次离心加钙后, 省去冰浴 30 min 程序, 再次离心加钙, 置入 4℃ 冰箱, 保存 30 min 以上后使用.

1.2.2 质粒的转化

常规法: 100 μl 感受态细胞中加质粒 DNA 0.5 μl (0.01 ng), 冰浴 30 min, 42℃ 休克 90 s, 再冰浴 2 min, 加 400 μl LB 培养基, 37℃ 复苏 45 min. 取适量 (本实验中用 50 μl) 涂布抗生素平板. 37℃ 培养 12~ 16 h. 参见文献 [3, 4].

快转法: 100 μl 感受态细胞中加质粒 DNA 0.5 μl (0.01 ng), 冰浴 3~ 10 min. 取适量 (本实验中用 10 μl 或 50 μl) 涂布已预热至 37℃ 的抗生素平板. 37℃ 培养 12~ 16 h.

2 结果和讨论

Ca^{2+} 浓度是影响转化的重要因素. 我们首先比较了不同 Ca^{2+} 浓度制备的感受态细胞大肠杆菌

¹⁾ 通讯联系人. E-mail: mvlwu@whu.edu.cn

收稿日期: 1999-01-10, 修回日期: 1999-04-13

TG1 对同一质粒 pBluescript 的转化效率, 结果见图 1.

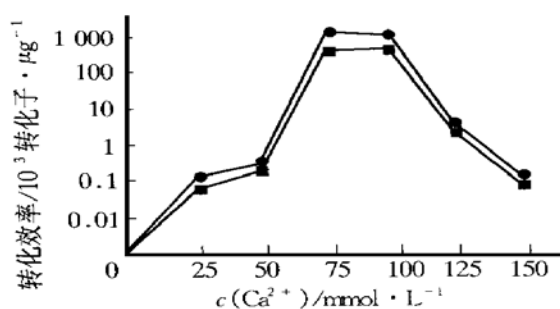


图 1 钙离子浓度对转化效率的影响

●—●: 常规法; ■—■: 快速法.

从图 1 看出, 随着 Ca^{2+} 浓度增高, 转化效率提高, 75~100 mmol/L 时达到峰值. 在 CaCl_2 溶液中添加 10 mmol/L KCl 和 10 mmol/L MgCl_2 未见明显提高转化效率.

还发现制备感受态细胞时采用后冰浴法, 当保存时间为 30 min 时, 感受态细胞 TG1 对质粒 pBlue 的转化效率和常规法差异无显著性意义. 感受态细胞继续在 4℃ 冰箱保存, 随着时间延长, 转化效率提高, 3 d 左右达到峰值, 随后逐渐下降, 2 周时转化效率仍有 $5 \times 10^4/\mu\text{g}$.

Dagert 等^[5] (1979 年) 的研究表明感受态细胞 4℃ 保存以不超过 2 d 为宜. 我们认为 4℃ 存放 2~4 d 转化效率较高, 2 周之内使用均可.

我们用 75 mmol/L CaCl_2 后冰浴法制备感受态细胞, 用 4℃ 保存 3 d 的细胞探讨了快速转化方法的条件.

比较了冰浴时间对转化效率的影响. 冰浴 3~60 min 转化效率差异无显著性意义, 冰浴 180 min 效率反而下降至 70%.

比较了平板温度对转化效率的影响. 4℃、20℃ 平板效率分别为 37℃ 的 15.5% 和 46.5%.

结果表明: 冰浴 3~10 min 后涂布预热至 37℃ 的平板, 是较为合适的快速转化条件. 按照这一条件, 我们比较了快速转化方法与常规转化方法的效率. 结果如表 1、表 2.

对质粒 pBlue 而言, 无论转化 TG1, 还是 DH5α, 快转法和常规法均可获得超过 10^5 转化子/ μg 的转化效率. 在实验中我们确保采用 2 种方法时涂布的质粒质量 (μg) 数相等, 即常规法 500 μl 细胞涂布 50 μl , 快转法 100 μl 细胞涂布 10 μl , 这样计算转化效率快转法略低于常规法. 当 2 种方

法涂布的转化混合物体积 (μl) 数相等, 即常规法 500 μl 细胞涂布 50 μl , 快转法 100 μl 细胞涂布 50 μl 时, 快转法所得转化子数多至难以计数.

表 1 2 种方法对不同受体菌转化效率比较

菌株	转化效率/转化子数· μg^{-1}		
	常规法 50 μl	快转法	
		10 μl	50 μl
TG1	6.5×10^5	2.6×10^5	+++
DH5α	2.4×10^5	1.5×10^5	+++

注: 质粒 pBlue.

表 2 2 种方法对不同质粒转化效率比较

质粒 (片段长度/ kb)	转化效率/转化子数· μg^{-1}		
	常规法 50 μl	快转法	
		10 μl	50 μl
pBlue (2.96)	6.5×10^5	2.6×10^5	+++
pCA13 (6.95)	2.4×10^5	2.1×10^5	+++
pC53-SN3 (8.4)	4.1×10^5	2.0×10^5	+++
pBHG11 (34.3)	1.8×10^5	1.1×10^5	+++

注: 受体菌 TG1.

快转法和常规法一样, 对大质粒 pBHG11 的转化效率比小质粒相对较低, 但均可获得超过 10^5 转化子/ μg 的转化效率.

任意挑取质粒 pC53-SN3 快转法转化大肠杆菌 TG1 所得的转化菌落 36 个, 小量提取质粒 DNA, DNA 琼脂糖凝胶电泳, 均呈相同的质粒带型, 任取 6 个质粒, 用 *Bam*HI 酶切, 均可释放出 1.8 kb 野生型 p53 基因. 结果表明快转法具有和常规法相同的质粒转化特点.

综上, 我们得出如下结论:

a. 采用快转法, 操作步骤由 5 步 (冰浴、休克、冰浴、复苏、涂布培养) 减至 2 步 (冰浴、涂布培养), 时间由 2 h 减至 3~10 min. 快转法可获得与常规法相当的转化效率 (大于 10^5 转化子/ μg), 足以满足常规分子克隆的需要.

b. 制备感受态细胞时, Ca^{2+} 浓度以 75~100 mmol/L 为最佳, 先冰浴与后冰浴差异无显著性意义, 感受态细胞 4℃ 可保存 2 周, 2~4 d 转化效率最高.

整个方法无需特殊仪器设备, 如 42℃ 恒温水浴槽、超低温冰箱等, 也无需特殊试剂, 却可以大大地节省操作时间.

参 考 文 献

- 1 Cohen S N, Chang A C, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, **69** (8): 2110~2114
- 2 Cohen S N, Chang A C, Boyer H W, *et al.* Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, **70** (11): 3240~ 3244
- 3 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社 (Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. Beijing: Science Press), 1992. 49~ 56
- 4 齐义鹏. 基因及其操作原理. 武汉: 武汉大学出版社 (Qi Y P. *Genes and Principle of Gene Manipulation*. Wuhan: Wuhan University Press), 1998. 300~ 308
- 5 Dagert M, Enrich S D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*, 1979, **6** (1): 23~ 28

A Rapid and Simple Protocol for the Transformation of Plasmid DNA Using CaCl_2 . XIAO Geng-Fu, QI Yi-Peng, LI Li, YI Wei (*Department of Virology and Molecular Biology, Wuhan University, Wuhan 430072, China*).

Abstract A rapid and simple protocol for the transformation of plasmid DNA using CaCl_2 is reported. 3 ~ 10 min incubation of cells with DNA on ice and spreading onto agar plates pre-warmed to 37 °C, resulting in more than 10^5 colonies/ μg plasmid DNA. The effect of Ca^{2+} concentration and store time at 4 °C on transformation efficiency is also discussed.

Key words plasmid, transformation, competent cells

一种改进的蛋白质超薄凝胶电泳方法*

郭泽坤 张 涌

(西北农业大学发育生物学实验室, 陕西杨凌 712100)

摘要 介绍了一种将聚丙烯酰胺凝胶固定在电泳夹板上的蛋白质电泳方法. 通过此方法蛋白质电泳可以在 0.4 mm 厚的聚丙烯酰胺凝胶上进行. 实验证明, 经此方法处理的玻板结合凝胶非常牢固, 在电泳后的所有处理步骤中都不会发生凝胶脱落现象.

关键词 电泳, 聚丙烯酰胺, 蛋白质, 超薄凝胶电泳

学科分类号 Q78

电泳技术是利用带电粒子在电场作用下以不同的速度向电荷相反方向运移的现象来对某些化学或生物化学组分进行分离分析的. 它已经成为生物化学和分子生物学实验中对蛋白质和核酸分子进行检测的最常规工具. 目前蛋白质电泳通常采用垂直平板, 分离介质为聚丙烯酰胺凝胶, 凝胶厚度一般在 0.75~ 1.5 mm. 但由于电泳过程中产生的焦耳热, 将在凝胶中央产生一个径向的温度梯度, 从而导致带电粒子产生径向的运移速度梯度, 结果使区带展宽, 降低分辨率^[1]. 凝胶越厚, 径向温度梯度越大, 电泳条带越宽, 所以凝胶厚度是影响电泳分辨率的一个主要原因. 降低凝胶厚度到 0.5 mm 以下, 不但在染色和成像过程中极易破碎, 而且还容易发生粘板. 虽然对玻板进行硅烷化处理可解决这个问题, 但又会因电泳过程中产生的电渗现象, 使凝胶从负极流出. 目前人们将薄胶结合在一个固相载

体上来解决上述所有问题, 一般都采用 FMC 公司 (Rockland, ME 04841, USA) 的 GelBond 膜, 但此膜的价格极其昂贵, 并且很难买到与国内普遍使用的 20 cm × 20 cm 玻板相配套的产品. 本文在这里介绍一种简便的方法, 直接对电泳方板表面进行化学处理, 为其涂渍一层亲水性的薄膜, 在凝胶聚合过程中, 该膜上所带双键也参加聚合, 因此能够牢固地结合聚丙烯酰胺凝胶.

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

本实验使用的电泳槽为 DYY-III21 型多用途电泳槽 (北京六一仪器厂). 凝胶成像采用 GDS-8000

* 国家自然科学基金资助项目 (39570526).

Tel: (029) 7092176; E-mail: Zhangyl@public.xa.sn.cn

收稿日期: 1998-11-13, 修回日期: 1999-03-29