$(A)^-$-RNA 的3′端所带的AMP残基在10个以下[4]。这说明3′端含有游离 OH 基的单链 RNA 能在此酶的作用下接上 poly(A)片段，也说明 ATP:RNA 腺苷酰转移酶能使 poly(A)链沿3′端方向延伸。

### 3. poly(A)-RNA 的反转录

只有3′端具有 poly(A) 的 RNA，在 oligo $(dT)_{12}$ 引物存在下才能经过反转录酶的作用生成与之互补的 DNA，我们将经酶作用连接了 poly(A) 片段的 RNA 及未经酶作用的 RNA，分别进行反转录反应，结果（表2）表明未经 poly(A) 化的 RNA 基本上不能进行反转录反应，而经此酶作用后连接上 poly(A) 的RNA 在反转录酶作用下，都能使 $^{32}$P-dAMP 有较高的参入，其中 BSMV-XJ poly$(A)^-$-RNA 也参入了部分 dAMP，这可能是由于其3′端具10个以下 AMP 残基。我们用凝胶电泳鉴定了与Y-tRNA互补的 DNA 长度。图3说明，Y-tRNA-cDNA 含70个核苷酸残基。

表2 一些 RNA 的反转录作用

| RNA | $^{32}$p-dAMP参入cpm |
|---|---|
| Y-tRNA | 470 |
| poly (A)-Y-tRNA | 15370 |
| S-tRNA | 550 |
| poly(A)-S-tRNA | 15050 |
| BSMV-Poly$(A)^-$-RNA | 4220 |
| BSMV-poly$(A)^+$-RNA | 25870 |

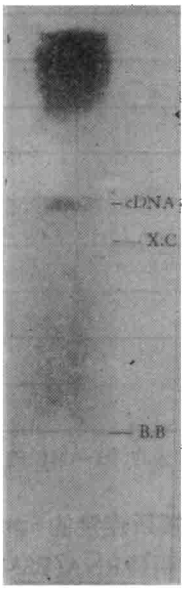


图3 poly (A) 化后的酵母 tRNA 的 cDNA 的放射自显影
10% 聚丙烯酰胺凝胶 600V，5mA 3.5 小时。

## 参 考 文 献


[1] Devos, R. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **62**, 401, 1976.
[2] Devos, R. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **447**, 319, 1976.
[3] Wittig, B. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **5**, 1165, 1978. 1978.
[4] 谢德贞等：《大麦条纹花叶病毒(新疆株)中多聚腺苷酰 RNA 含量，感染活性及多聚腺苷酸链长分布的测定》(待发表)。
[5] Sippel, A. E.: *Eur. J. Biochem.*, **37**, 31, 1973.
[6] 潘铁城等：《生物化学与生物物理学报》，**15**，2，1983。


[本文于1983年6月28日收到]

# 一种简易的制备和纯化质粒 DNA 的方法


王 年 何永山* 蔡良琬
(中国医学科学院，基础医学研究所，北京)


近年来随着遗传工程的飞速发展，DNA 重组技术被广泛应用，许多实验室在制备一定纯度、产量较高、方法简便的质粒 DNA 方面作了许多工作。国外大多数实验室普遍采用 CsCl 等密度梯度超离心法[1,2]，但国内受仪器限制，应用较少。我们比较了 PEG 沉淀质粒 DNA[3,4,5]，

* 吉林省地方病第一防治研究所进修人员。

羟基磷灰石法制备质粒 DNA[6]，快速抽提质粒 DNA[7]，以及 M. A. K 柱制备质粒 DNA 等方法[8]，它们都各有利弊。

本实验室对 L. P. Elwell 的实验条件稍作改进[9]，温和地制备清亮裂解液并抽提质粒 DNA，然后应用 Sephacryl S-1000 作凝胶过滤[10]，获得了纯度高、产量大，无染色体 DNA 和 RNA 的质粒 DNA。

## 一、材　料

1. 质粒 pAT-153($Ap^r$, $Tc^r$) 菌种由中国科学院微生物研究所提供。

2. Sephacryl S-1000，瑞典Pharmacia 公司生产。

3. Triton X-100，英国 BDH 公司生产。

4. 限制性核酸内切酶，美国 BRL 公司和美国 Biolabs 公司生产。

5. 其余试剂均为北京化工厂产品。

## 二、方　法

**1. 细菌的培养和收集:**

应用带有 pAT-153 质粒的大肠杆菌菌株，37℃ 培养于琼脂斜面，次日接种于 20μg/mlAp 和 Tc 琼脂平皿，37℃ 过夜培养，并筛选单菌落。

取单菌落在无菌条件下接种于 5ml PBY 培养液(含蛋白胨 8g，牛肉膏 5g，NaCl 4g，葡萄糖 4g，酵母膏 5g 1000ml pH7.5) 37℃ 过夜培养。

次日将 5ml 菌液转种于 50ml PBY 培养液中，37℃培养 2 小时后再转入 450ml PBY 培养液中，37℃培养 2—2.5 小时，加入氯霉素粉，使终浓度达 170mg/l，以扩增质粒拷贝数，37℃ 振荡培养 12—14 小时(全部操作应在无菌条件下进行)。

离心收集菌体 (3500 r.p.m 4℃ 20 分钟)，用TE 缓冲液(50m*M* Tris，1m*M* EDTA-$Na_2$，pH8.0) 洗涤，离心后悬浮于 50ml 25% 蔗糖、50m*M* Tris、1m*M* EDTA-$Na_2$ pH8.0 的缓冲液中。

**2. 清亮裂解液的制备:**

悬浮液中加入 2ml 溶菌酶液(溶菌酶 5mg/ml，0.25*M* Tris-HCl pH8.0 缓冲液)温和混匀，置于冰浴中 10—15 分钟。缓慢加入 4ml0.25*M* EDTA-$Na_2$(pH8.0)，温和混匀，置于冰浴中 10 分钟。

缓慢的加入 20ml Triton X-100 (0.1% Triton X-100，50m*M* Tris，6m*M* EDTA · $Na_2$ pH8.0) 温和的混匀，置于冰浴中 20 分钟。

最后加入 5*M* NaCl，使终浓度为 1*M*，4℃ 放置 4 小时或过夜，中间摇动数次。再超离心 (25,000 r,p,m，4℃) 1 小时，除去大部分细胞器和染色体 DNA，RNA 等。

**3. 酶处理和酚抽提:**

收集超离心后的上清液，加入经100℃处理 5 分钟后的 RNaseA。(0.1mg/ml)，37℃ 消化 1 小时；再加入 Pronase E(0.1mg/ml)，37℃ 消化 30 分钟。

取重蒸酚用等体积的 TES 缓冲液(30m*M* Tris-HCl，5m*M* EDTA · $Na_2$，50m*M* NaCl pH 8.0)饱和并调pH至 8.0—8.5。配成酚，氯仿、异戊醇液 (25:24:1)，其中含 0.1%8-羟基喹啉。

取等体积酚混合液，抽提酶处理后的清液 2—3 次。离心收集水相，加入 2.5 倍体积的 95%冷乙醇，混匀后于低温冰箱中过夜。次日离心 (12000 r.p.m.)20 分钟，收集沉淀，于 4℃ 抽干，再溶于 4ml 80m*M* Tris，85%$H_3PO_4$、1*M* NaCl pH8.0 的缓冲液中，贮于冰箱中备用。

**4. Sephacryl S-1000 柱分离及纯化质粒:**

常规装柱 (20 × 450mm)，柱床高 32cm，用上述 Tris-$H_3PO_4$ 缓冲液平衡，流速为 10—12ml/小时，柱外水体积为 21ml。

取 2ml pAT-153 质粒 DNA 抽提物(约含质粒 DNA 100μg)，加入 0.5ml 甘油，混匀后缓慢地加于柱床上部。当样品进入凝胶床，用 Tris-$H_3PO_4$ 缓冲液洗脱，流速为每小时 10ml 左右，并以紫外吸收分析仪监测，分部收集各洗脱峰(图 1)。

将分部收集的流出液，分别于 0.7%Agarose

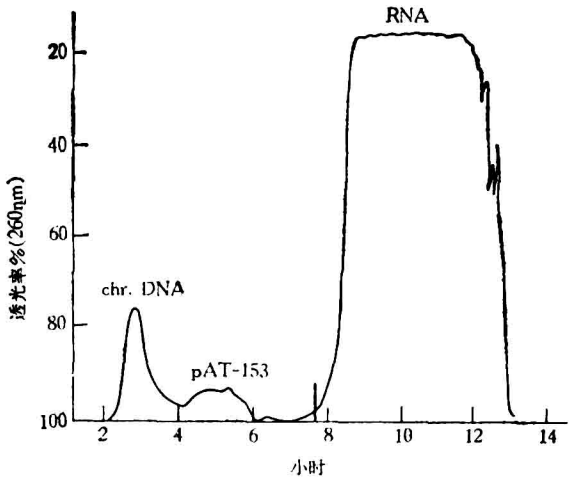


**图 1 Sephacryl S-1000 柱层析分离质粒 DNA**

凝胶平板电泳鉴定。结果见图 2。

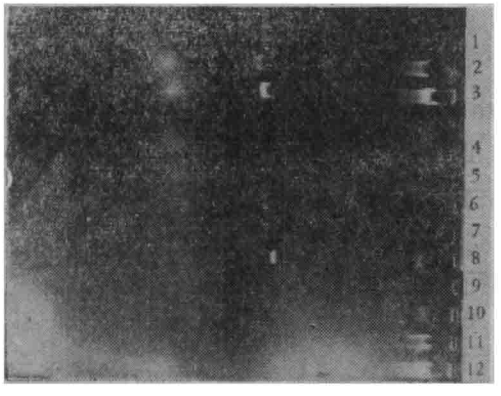

**图 2 琼脂糖凝胶电泳鉴定纯化后的质粒 pAT-153**

电泳条件：缓冲液 40m*M* Tris-乙酸，2 m*M* EDTA, $Na_2$, pH 8.0。0.7% *Agarose* 凝胶板，30v 过夜。E. B. 染色。样品 1：pAT-153 对照。样品 2，3：没经过 Sephacryl S-1000 纯化的样品。含有大量染色体和 RNA。样品 4、5：经 Sephacryl S-1000 过柱后收集的 RNA。样品 6、7：经 Sephacryl S-1000 纯化的质粒 pAT-153。样品 8.pBR322 对照(PBR322 不纯)。样品 9～12：经 Sephacryl S-1000 过滤后收集的染色体峰。

集中已纯化的 PAT-153 质粒，乙醇沉淀，离心收集质粒 DNA，溶于 50m*M* Tris-HCl pH8.0 的缓冲液中备用。

本实验室应用 Sephacryl S-1000 制备纯化的质粒 pAT-153 作载体，与 HBVadr DNA 重组克隆已获得成功（HBVadr 为乙型肝炎病毒 adr 亚型）。

目前应用 Sephacryl S-1000 制备纯化的各种载体质粒已被应用于遗传工程的重组、克隆和序列分析及表达的工作中。

## 三、结果与讨论

Sephacryl S-1000 凝胶是由烯丙基葡聚糖与N'N'-亚甲基丙烯酰胺共价交联制备的。它相当于 0.5% Agarose 凝胶，在 pH3-11 条件下，常用的缓冲系统均能选作洗脱剂。

经用本法制备纯化的质粒 DNA 具有以下优点：

1. 不具备 CsCl 超离心条件的实验室，选用 Sephacryl 凝胶过滤(制备清亮裂解液时的超离心，可改用高速离心 20,000r. p. m 30—60 分钟)，能获得较纯样品，即使分离分子量较大的质粒 DNA，只要掌握加样量与适当增加柱高，也可获得纯质粒。

2. 本方法不用碱变性处理，采用 Elwell 的条件，使用温和的 Triton X-100 裂解，经 RNaseA 处理，再经凝胶过滤，可获得大量 ccc-DNA质粒，避免和减少了 O. C. 和线性质粒 DNA 的形成。

3. 染色体和 RNA 去除比较完全。由于裂解条件温和，溶菌酶处理后染色体、RNA 及 DNA 未受到很大破坏，通过超速离心时大部分细胞器连同染色体、RNA 均被除去。由于 Sephacryl S-1000 相当于 0.5% Agarose 凝胶，样品中残剩的染色体和 RNA，在凝胶过滤以后可按分子量大小一一分离。因此本法也适用于大分子染色体的提纯。

4. 应用不同型号的 Sephacryl 凝胶如 S-400，S-500 等的分级范围，还可分离 DNA 的酶解片段和染色体。目前我们正在进一步摸索分离条件。

5. 实验流程短，Sephacryl S-1000使用方便并可反复使用。产量较高，每升培养物可获得 250$\mu$g 以上的纯化质粒。

Sephacryl 凝胶的使用条件尚待不断的改进和充实。实验证明只要掌握好一定的样品量(<5%柱床体积)、柱床较高和缓慢的流速，均能达到满意的分离效果。

目前此方法已成为本实验室提取质粒

DNA 的常规方法之一。

本文采用如下缩写：克隆：基因无性繁殖；$Ap^r$：氨基苄青霉素抗性；$Tc^r$：四环素抗性；c.c.c DNA 质粒：共价闭合环状质粒 DNA；o.c DNA 质粒：开放环状质粒 DNA；chr. DNA：染色体 DNA。

## 参 考 文 献


[1] Radloff, R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 1514, 1967.

[2] Kahn, M. et al.: *Methods in Enzymol.*, **68**, 268, 1979.

[3] Meyers, J. A. et al.: *J. Bacteriol.*, **116**, 1064, 1973.

[4] Humphreys, G. O. et al.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **383**, 457, 1975.

[5] Johnston, J. B. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **75**, 13, 1977.

[6] Colman, A. et al.: Eur. *J. Biochem.*, 91, 303, 1978.

[7] Birnboim, H. C. et al., Nucleic Acids Research, 7, 1513, 1979.

[8] 敖世洲等：《生物化学与生物物理学报》**12**，(3)，243，1980。

[9] Elwell, L. P. et al.: *Antibiotics in Laboratory Medicine* (Larian Victo ed.), Baltimore, Willians and Wilkins. 433, 1980.

[10] *Pharmacia Fine Chemicals. Catalogue.*, 1983.


[本文于1983年8月7日收到]

（上接第 28 页）

得相距较远的蛋白质分子之间通过它们发生间接的相互作用。这就是膜上蛋白分子间的远程作用，其力程可达 150 Å，远超过分子间正常的范氏力。蛋白质分子之间还有一种互相排斥的短程力。陈长谦教授的学生通过计算认为：正是这种通过脂分子的远程作用使得本来在双层膜内随机分布的蛋白质分子分别聚集成团，产生了所谓的簇分布。蛋白质分子在簇内的分布由吸引力及相互排斥的短程力的平衡所维系。它们在簇内运动所需的能量并不大，如果要脱离这个簇而运动，所需能量则很大。

蛋白质分子在膜中的分布的最好表示方式是粒子分布函数，它与蛋白质本身的能量、蛋白与脂的相互作用等因素有关，条件改变则分布函数也就改变。

有人发现加入药物后可以加速蛋白从膜上的随机分布到簇分布的过程。蛋白质在膜上聚集成簇的现象可以加以利用，例如，把胰岛素受体放入膜内，可以成簇后进入细胞，从而可作用于核膜。

[胡坤生 整理]

## 参 考 文 献


[1] Seelig, J. and Seelig, A. *Biochemistry*. **13**, 4839—45, 1974.

[2] Gaffney, B. et al.: *J. Magn. Reson.*, **16**, 1—28, 1974.

[3] David F. Bocian and Sunney I. Chan: *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **29**, 307—35, 1978.

[4] Marčelja, S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **367**, 165—76, 1974.

[5] Schindler, H. et al.: *Biochemistry*, **14**, 2883—87, 1975.

[6] Chrzeszczyk, A. et al.: *Biochim Biophys. Acta*, **470**, 161—69. 1977.

[7] Godici, P. E. et al.: *Biochemistry*, **13**, 362—68. 1974.

[8] Kroon. P. A. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **433**, 282—93. 1976.

[9] Michael, Glaser, Sunney I. Chan: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **65** (3), 721—728, 1970.

[11] Philippe Brûlet and Harden M. McConnell: *Bio-* **13**, (21), 4381—4385. 1974.

[11] Philippe Brûlet and Harden M. McConnell: *Biochem. Biophys. Research Communication*, **68** (2), 363—368, 1976.

[12] J. Seelig and A. Seelig: *Q. Rev. Biophys.*, **13**, 19—61, 1980.