

测定的核酸量大于 1 M KCl 柱洗脱液中所得到的量,这是由于酶水解液中含有较多的小分子核酸,以及地衣酚法测定易受许多因素(如蛋白质、氨基酸和糖类)的干扰等原因所致。

试验蒙邹承鲁同志指导及室内同志帮助,微生物所二室蔡发兴同志提供核糖核酸样品,在此一并致谢。

参 考 文 献

[1] Lowary, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265,

1951.

[2] Mejbbaum, W.: *J. Physical Chem.*, 258, 117, 1939.

[3] George, N. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 31 (1), 112—118, 1972.

[4] E. 查加夫, J. N. 达维生主编:《核酸》(中译本),第二卷,第 5 页。黄德民译,科学出版社,1955 年。

[5] Chen, P. S. et al.: *Analytical Chemistry*, 28, 17567, 1956.

[6] Kirby, K. S.: *Biochem. J.*, 64, 405, 1956.

[本文于 1980 年 5 月 19 日收到]

噬菌体 λ plac 5 DNA 的制备与鉴定

李金照 朱以桂 崔道珊

(中国科学院生物物理研究所)

噬菌体 λ plac5 DNA 的制备与鉴定是为了进一步分离乳糖操纵子。噬菌体 λ plac5 DNA 是 λ DNA 的变种,在它的分子上插入有一段乳糖操纵子。此操纵子位于 λ plac5 DNA 分子长度的 39.6% 与 48.1% 之间,包括 I 基因的一部分, P. O. Z 基因的全部和部分 γ 基因,约 3950 个碱基对^[1]。乳糖操纵子的发现及其调控机理的阐明是近代分子遗传学的重大成果。由于它的调控机制已经研究得很清楚,常被用来和外源 DNA 一起重组到质粒上,利用它的调控机制使外源 DNA 在大肠杆菌内得以起动。转录和表达。

材 料 与 方 法

大肠杆菌 CSH66, 它的染色体上整合有噬菌体 λ CI 857 S7plac 5 DNA 作为前噬菌体,在 32℃ 培养条件下,噬菌体 DNA 同寄主染色体一同复制并遗传给后代。因为噬菌体的抑止子是温度敏感型的,在 42℃ 作用下失活, λ plac5 DNA 便由染色体上激活下来,大量复制自己。 λ plac5 DNA 还带有 S7 变异,此变异使得 λ plac 5 噬菌体仅在大肠杆菌内大量复制自己,但不能裂解细胞壁。为了释放出噬菌体,必须加氯

仿,人工强迫裂解。

1. CSH 66 菌的单斑筛选 用限制性琼脂培养基制成固体平板(限制性琼脂培养基:每升含 K_2HPO_4 10.5 克, KH_2PO_4 4.5 克, $(NH_4)_2SO_4$ 1 克, 柠檬酸钠 0.5 克, 琼脂 15 克, 无菌后加 1 毫升 20% $MgSO_4$, 0.5 毫升 1% 维生素 B1, 10 毫升 20% 葡萄糖),培养基含有 Xgal 指示剂 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) 0.05 毫克/毫升(参照 Miller 方法)^[2]。用接种针取 CSH 66 菌少许在上述平板上画线,画线要连续,并将接种针迅速通过火焰后再画,以达到稀释作用。34℃ 温箱培养 24 小时,挑出平板上的深蓝色单菌斑,作为制备 λ plac5 DNA 的菌株。

2. 噬菌体 λ plac5 DNA 的制备 取 CSH 66 菌蓝色单斑接入 100 毫升 2 YT 培养基里(每升含蛋白胨 16 克, 酵母膏 10 克, 氯化钠 5 克), 34℃ 摇床培养过夜;次日将过夜菌全部接入 1000 毫升 2 YT 培养基中, 34℃ 摇床培养 2 小时,生长到 O. D $\approx$ 0.8, 取下培养瓶,在 42℃ 诱导 15 分钟,再放回摇床,在 37℃ 培养 6 小时。以 8000 转/分离心 20 分钟 (MSE-18 高速离心机 6 $\times$ 100 毫升转头) 收集菌体, 菌体悬浮

于 50 毫升 tris 缓冲溶液里 (0.01M tris pH7.9, 0.05M NaCl, 0.001M EDTA 0.01M $MgCl_2$), 加 5 毫升三氯甲烷, 37℃ 振荡半小时破壁, 15,000 转/分离心 20 分钟 (MSE-18 离心机, 8×50 毫升转头), 除去染色体 DNA 及细胞碎片, 上清液含有噬菌体颗粒, 效价达 10¹⁴/毫升。将上清液以 30,000 转/分离心 2 小时 (MSE-756 × 100 毫升转头) 收集噬菌体颗粒, 悬浮于 2 毫升 0.01 M tris 缓冲溶液里, 进行氯化铯梯度离心, 以 30,000 转/分离心 1.5 小时 (MSE-75) 进一步纯化噬菌体, 在氯化铯 1.5—1.7 密度之间的位置上有一乳蓝色的带, 即噬菌体颗粒带, 吸出此带并经透析后, 用酚法提取其 DNA (氯化铯梯度离心和核酸的抽提按 Miller 法)^[2]。最后得到 1.5 毫升的 λ plac5 DNA, 浓度可达 0.8 毫克/毫升。

3. 琼脂糖电泳 琼脂糖电泳条件参照 Robert 叙述的方法^[3]。琼脂糖的浓度为 1%、酶的反应条件为 20 微升缓冲溶液 (50mM tris pH7.4, 10mM $MgCl_2$, 50mM NaCl) 加 2 微升 λ plac 5 DNA, 加 2 微升 EcoRI, 37℃ 保温半小时, 加 10 微升终止液。

4. 电镜观察 λ plac 5 DNA 电镜观察按照我们以前所做的 BAB 法进行^[2]。上相溶液含 1 微升 λ plac 5 DNA (0.8 毫克/毫升), 0.25 毫升 2M NH_4AC 2.5 × 10⁻³% BAB (即市售新洁尔灭消毒剂) 0.5 微升, 重蒸水 0.75 毫升。下相溶液为 0.25 M NH_4AC 。

异源双链电镜法参照 Ferguson 法^[4]。 λ DNA、 λ plac 5 DNA 各取 2 微升, 加入 38 微升重蒸水, 加 1 微升 1 M EDTA, 5 微升 1 M NaOH, 25℃ 保温 10 分钟。加工微升 2 M tris-HCl pH 4, 调反应液 pH 为 8.5, 加 50 微升甲酰胺, 在 25℃ 静止 2 小时复性。上相含上述复性混和液 100 微升, 50% 甲酰胺, 0.1 M tris, 0.01 M EDTA pH 8.5, 50 毫克/毫升细胞色素 C, 下相含 15% 甲酰胺, 0.01 M tris, 0.001 M EDTA。取 40 微升上相液, 缓缓加到倾斜角为 15° 的载玻片上, 使其分散至下相展层; 一分钟后, 用覆盖 Formvar 膜的铜网粘取样品, 用 5 × 10⁻⁵ M 醋酸双氧铀

染色 2 分钟、无水酒精脱水后用铂铱丝旋转喷涂。

结果与讨论

乳糖操纵子的显色反应: λ plac5 DNA 分子上带的乳糖操纵子是 $i^-z^+y^+$ 基因型, 因为 i 基因失去作用, 不论培养基里有无半乳糖诱导, 细菌仍然产生 β -半乳糖苷酶; 携带这种基因型的乳糖操纵子细菌称为组成型细菌。Xgal 指示剂不能起诱导作用, 但能与 β -半乳糖苷酶反应, 被水解为深蓝色物质。因此, 细菌菌落出现深蓝色, 即证明该菌含有 $i^-z^+y^+$ 基因型乳糖操纵子。利用此法, 选出纯的噬菌体 λ plac 5 单斑。

琼脂糖电泳鉴定: λ plac5 DNA、 λ DNA 经 E. co. RI 酶作用后的电泳图谱如图 1, 两者经 E. co. RI 酶作用后, 在凝胶柱上都呈 6 条带, 但带的位置有变动。图 2 示凝胶柱上片断的位置和相对应的 DNA 分子上片断的位置, 在 λ plac5 DNA 上缺少 λ DNA 的第五条带, 对应于 λ DNA 的第二条带下面, λ plac 5 DNA 出现一条新带, 并且 λ plac 5 DNA 的第一条带低于 λ DNA 的第一条带。从 DNA 分子上的 E. co. RI 酶切点看, 差异是 λ plac5 DNA 的第一个切点

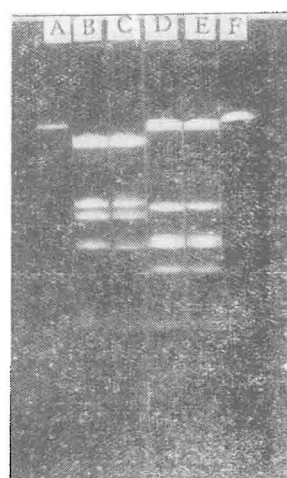


图 1 λ plac 5 DNA、 λ DNA 经 E. co. RI 酶消化后的电泳图谱

A: λ plac 5 DNA 为对照, B, C 为 λ plac 5 DNA + E. co. RI, D: λ DNA 对照, E, F 为 λ DNA + E. co. RI.

λ Plac 5 DNA λ DNA

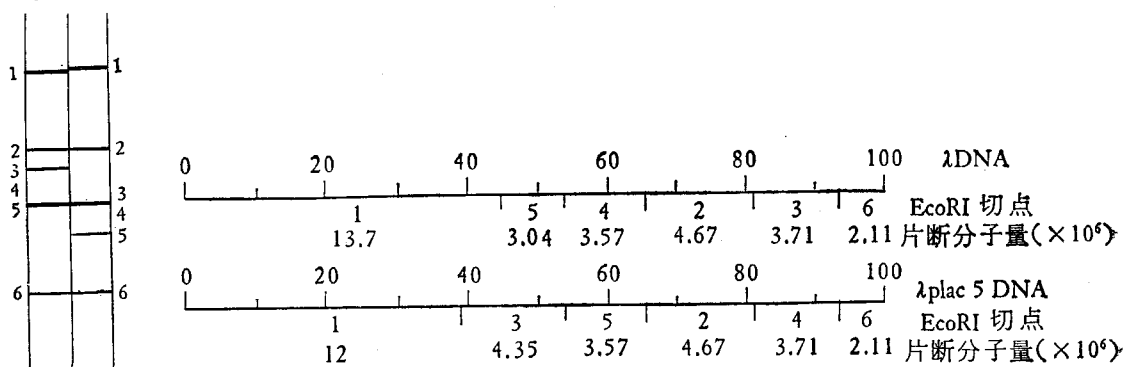


图 2 λplac 5 DNA, λDNA 片断在凝胶柱上的位置和在 DNA 分子上的位置上的示意图

位置(从分子左端始)比 λDNA 的第一个切点向左移,两者其它 E. co. RI 切点位置都相同。凝胶柱上片断位置的变动,反映了第一个切点位置的变化。这种变化,证明 λplac 5 DNA 上的乳糖操纵子是处在第一个和第二个切点之间,即是凝胶柱上的第三片断。

电镜鉴定: 图 3(见封三)为 λplac 5 DNA 分子的电镜照片,长约为 11.4 微米。图 4(见封三)为 λplac 5 DNA 和 λDNA 杂交分子,在杂交分子链长的 40%—50% 之间有一个单链环,其余部分均为同源区;单链环为乳糖操纵子插入到 λDNA 分子的位置。

以上实验结果,可以证明制备的样品与

λplac 5 DNA 的性质符合。

参 考 文 献

- [1] Shopiro, J. et al.: *Nature*, **224**, 768, 1969.
- [2] Miller, T. H.: *Experiments in Molecular Genetics*, p. 133, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1972.
- [3] Robert, B. H. et al.: *Journal of Virology*, **14**, 1235, 1974.
- [4] Ferguson, J. et al.: *Advanced. Techniques in Biological Electron Microscopy*, **II**, p. 123, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1978.
- [5] 朱以桂、崔道珊、李金照:《病毒学集刊》, 1980.

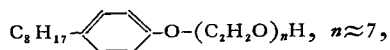
[本文于 1980 年 9 月 23 日收到]

乳化剂 op-115 在液体闪烁计数中的应用*

吴金水 孙耀琛 王遗宝 金亚放 贾文霞 陈 荣

(上海市农科院作物所农业物理研究室)

液体闪烁乳状液测量法已广泛应用于生物学、医学、农业、考古、地质水文等领域中的软 β 放射性同位素水溶性样品测量。国内一直使用进口 Triton X-100 等产品,远不能满足需要。为立足于国内,我们和上海市农药所协作,研制合成了非离子型表面活性剂 op-115,其分子结构式为



与 Triton X-100 相近,苯环一侧为异辛基疏水基团,

另一侧为亲水基团,具有较好的乳化作用。经试验证明,op-115 可以用于一般的液体闪烁测量,性能接近进口同类产品。现将主要结果报道如下。

材料、仪器和实验方法

一、试验材料:

* 本文曾于 1980 年 6 月 19 日在上海召开 op-115 鉴定会宣讨论。

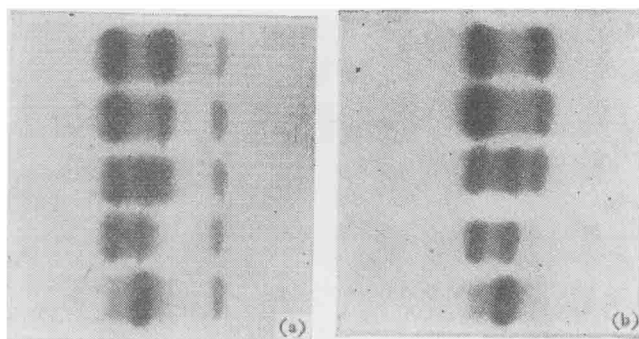


图1 血红蛋白电泳

高原鼠兔 Hb_I-, 淀粉水解 38°C
2 小时

a. 青海马铃薯淀粉

b. 英 BDH 马铃薯淀粉

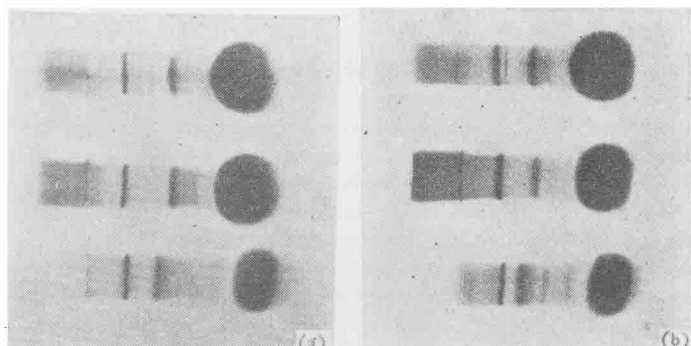


图2 血清蛋白电泳

1,2 为人血清; 3 为小白
鼠血浆; 淀粉水解 37°C, 2.5
小时

a. 青海马铃薯淀粉

b. 西德 Merck 马铃薯淀粉

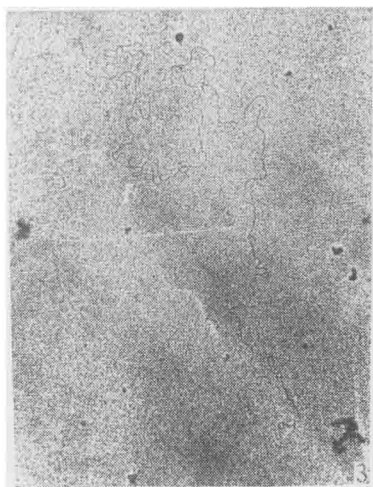
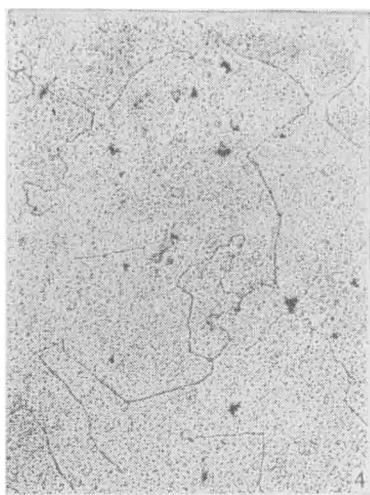


图3 噬菌体 λ plac5 DNA
($\times 31200$)



**图4 λ plac5 DNA 和 λ DNA 变
性后复性, 形成杂交分子 ($\times 12100$)**

仅在链长的 40—50% 有一个单链区,
其余为同源区。