

RESTRICTION ENZYME RECOGNITION SITES IN HEPATITIS B VIRUS GENOME CLONED IN E. COL

NAME	SEQUENCE	POSITION
BAMH I	GGATCC (1)	276 1780 2692
ALU I	AGCT (2)	191 892 1078 1177 1252 1307

图 1

列的限制性内切酶图谱时,可对 74 种不同专一性的核酸内切限制酶在用户指定的 DNA 分子上任意一区域中进行检索。在输出表中包括限制性内切酶的名称,识别序列,切点在识别序列中位置和识别序列在待检索的 DNA 序列上位置。利用本程序我们已对 ϕ x174, M13^[5] (噬菌体)以及 B 型肝炎病毒 DNA^[6] 序列等一系列 DNA 分子序列进行了内切酶图谱的构造(见图 1)。

在图 1 中表示了对 B 型肝炎病毒 DNA 分子序列(全长 3182 核苷酸)内切限制酶 Alu I 和 BAMH I 识别序列的检索结果。对于内切酶 Alu I (AGCT) 它在序列中识别位置的起始位置为第 191、892、1078、1177、1252、1307(5'—3' 计数),共有六处;而 BAMH I (G¹GATCC)在序列中识别位置的起始位置分别为第 276、1780、和第 2692,共三处。输出表中圆括号内的数字即表示该酶在识别序列中切点位置。若将被酶所分割的各片段序列加以存储,它又可作为核酸序列重组程序的输入数据。

总之计算机技术在核酸序列分析中应用已得到人们的重视。现在已经通过计算机对 DNA 一级结构的处理在 tRNA 基因预言^[7],和 DNA (或 RNA)序列的二级结构的预言^[8]中得到了应用。这是应该引起人们的注意。

参 考 文 献

- [1] Sanger, F. and Coulson, A. R.: *J. Mol. Biol.*, **94**, 441, 1975.
- [2] Maxam, A. M. and Gilbert, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 560, 1977.
- [3] Thomas, R. G. and Richard J. Roberts.: *Science*, **209**, No. 4463, 1322, 1980.
- [4] 乐树云、江寿平:《分子科学学报》,《生物化学生物物理学报》,待发表。
- [5] Peter, M. G. F. et al.: *Gene*, **11**, 129, 1980.
- [6] Francis Galibert, et al.: *Nature*, **281**, No. 5733, 646, 1979.
- [7] Staden, R.: *Nucleic Acids Research*, **8**, 817, 1980.
- [8] Feldmann, R. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 5409, 1978; Nussinov, Ruth., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**, 6309, 1980.

[本文于 1982 年 3 月 29 日收到]

用 Sepharose 2B 柱层析制备大肠杆菌质粒 DNA 的简便方法

卜 明 方荣祥 莽克强

(中国科学院微生物研究所)

大规模制备细菌质粒 DNA,通常采用氯化铯-溴化乙锭 (CsCl-Ethiolium Bromide) 平衡密度梯度离心^[1,2],去除细胞 RNA 和染色体 DNA,

获得纯化的超螺旋质粒 DNA。这个方法非常有效,但所用试剂昂贵,超离心时间较长,一般纯化要经过一次或两次 40 小时以上的超离心。

目前已经发展了许多简便方法,如高盐-Sepharose CL4B 柱层析^[3],羟基磷灰石柱层析^[4],甲基化白蛋白硅藻土(MAK)柱层析^[5],RPC-5柱层析^[6]等。我们用溶菌酶-SDS-碱法^[7]裂解细胞和变性染色体 DNA,经 Sepharose 2B 柱层析分开质粒 DNA 与细胞 RNA,最后经一次酸酚萃取^[8],去除残留的少量染色体 DNA 及线性质粒 DNA,达到了大量制备纯化的超螺旋质粒 DNA 的目的。所用材料和仪器设备简单,实验流程短,纯度好。

材料和方法

菌种及质粒 本工作所用菌种均系大肠杆菌 K₁₂ 的衍生株。用于 pBR322 分离纯化的菌种为 *E. coli* K12 802 ($S_{H}^{+} r_{K}^{-} m_{K}^{+}$),用于 pFMDV 1034 的受体菌为不含 pBR322 的 K-12 802,分离纯化 pCaMV C17 的菌种为 C600 (CI 857, 2 sites Pam)均由中国科学院微生物所菌种保藏室保存。含 pFMDV 1034 (5500bp)^[9]的 *E. coli* K12 802 和含 pCaMVC17 的 *E. coli* K12 C600,分别由 pFMDV 1034 和 pCaMV C17 重组质粒转化而成。H. Hofschneider 教授惠赠^[9],pCaMV C17 (12360bp) 是花椰菜花叶病毒新疆株 (CaMV-XJ) 全基因组 DNA 插入 pBR322 Sal I 切点的重组质粒。

试剂 除 Sepharose 2B 为瑞典 Pharmacia, RNase A 为西德 Seravac Laboratories 产品,部分限制性内切酶购自 BRL, BioLabs, Miles 公司外,其余试剂均系国产。

质粒 DNA 的分离纯化

1. 菌体的培养和收集 含质粒的菌种接种于 50 毫升 LB 培养液(蛋白胨 10 克/升、酵母膏 5 克/升、NaCl 5 克/升,不同的抗药性质粒加入相应的抗菌素;氨基苄青霉素 25 微克/毫升,四环素 10 微克/毫升)。在适宜的温度下(802 菌种为 37℃ 或 C600 菌种为 28—30℃)培养 15—16 小时。将此细菌预培养液以 5% 接种量接种含有抗菌素的 1000 毫升 LB 培养液中扩大培养,在对数生长前期,加入氯霉素(150 微克/毫升)使质粒扩增 17 小时后离心收集菌

体。用 50 毫升 50mM Tris-HCl (pH8.0)/0.5mM EDTA 溶液洗涤菌体一次,菌体再悬浮于 25 毫升冷的 50mM Tris-HCl (pH8.0)/10% 蔗糖溶液中。

2. SDS-NaOH 裂解和核酸粗提液的制备 菌体悬浮液中加入 2 毫升(10 毫克)溶菌酶水溶液,冰浴中作用 5—10 分钟,然后加入 10 毫升 1%SDS/0.2N NaOH 溶液,稍混匀,在冰浴中放置 5 分钟。加入 7.5 毫升 3M KAc (pH4.8) 溶液,在冰浴中温和振荡 1 小时,17,000g 4℃ 离心 30 分钟,除去细胞碎片及大部分细菌染色体 DNA。上清液中加入等体积的酚萃取一次,离心收集水相,用乙醚去除残留的酚。用冷乙醇沉淀核酸过夜。17,000g 离心 20 分钟,收集沉淀并真空干燥。加入 1 毫升 TE 缓冲液 (10mM Tris-HCl pH7.6/1mM EDTA),溶解后即为核酸粗提液。

3. RNase A 处理和 Sepharose 2B 柱分离 核酸粗提液中加入 20 微升 RNase A (1 毫克/毫升 TEbuffer, pH7.6 经 80℃, 5 分钟处理钝化 DNase), 37℃ 作用 30 分钟。然后将样品直接加在 0.6×30 厘米的用 10mM Tris-HCl (pH7.6)/0.1mM EDTA 缓冲液平衡过的 Sepharose 2B 凝胶柱上,并用同样的缓冲液洗脱,分部收集,第一个紫外吸收峰为质粒 DNA,第二个紫外吸收峰为 RNA 的小片段。

4. 酸酚法萃取 所收集的质粒 DNA 样品中加入 1/20 体积的 1M NaAc (pH4.0) 及 1/20 体积的 1.5M NaCl 酸化,用等体积的酸酚 (50mM NaAc pH4.0/75mM NaCl 饱和的酚) 萃取一次,除去样品中少量的细菌染色体 DNA 及部分非超螺旋结构的质粒 DNA,乙醚除酚三次,样品溶液中加入 1/10 体积的 0.5M Tris-HCl pH8.3 的缓冲液调为中性,用乙醇沉淀质粒 DNA。将沉淀真空干燥后,溶于适量的 TE 缓冲液中,得到纯化的质粒 DNA。作琼脂糖凝胶电泳鉴定,转化大肠杆菌试验,限制性内切酶分析及 DNA 序列分析。

琼脂糖凝胶电泳条件: 1% 琼脂糖平板凝胶, 18×8×0.2 厘米,缓冲液为 50mM Tris-HCl

pH7.8/20mM NaAc/20mM NaCl; 电压 50 伏 15 小时或 100 伏 5—6 小时。电泳后用溴化乙锭(EB, 1 毫克/升)染色 15 分钟,在紫外灯下观察或拍照。

限制性内切酶作用条件: 10mM Tris-HCl pH7.6 7mM MgCl₂, 7mM 巯基乙醇,根据各种酶所需适量加入 NaCl。37℃ 作用 2 小时。

转化大肠杆菌试验: 感受态大肠杆菌细胞的制备和质粒 DNA 转化大肠杆菌参照 Cohen 等人^[10]的方法。

DNA 序列分析: 采用 Maxam-Gilbert 化学断裂法^[11]进行 G、G + A、A + C、C、C + T 五个反应^[12]。

结果和讨论

Sepharose 2B 柱层析的方法适用于大量制备纯化的质粒 DNA, 每 1000 毫升细菌培养物, 经氯霉素扩增, 可以获得 200 微克以上的质粒 DNA。此法简便快速(从细菌种子预培养起到获得纯化的质粒 DNA, 全部流程一般只需用 4 天), 所用试剂易于得到。Sepharose 2B 凝胶柱洗净后可以反复使用。我们用此方法纯化了以下几种质粒 DNA: pBR322, pFMDV 1034, pCaMV C17, 均达到满意的分离效果。

用溶菌酶-SDS-NaOH 法得到的细菌裂解清液中除质粒 DNA 外还含有大量细胞 RNA 及少量染色体 DNA, Sepharose 2B 凝胶柱层析结合上柱前的 RNase A 处理可将大量的细胞 RNA 与质粒 DNA 分开。如果上柱前, 样品不经 RNase 作用, 那么质粒 DNA 洗脱峰与细胞 RNA 洗脱峰不能完全分开, 会损失部分质粒 DNA (如图 1a)。因此须先经 RNase A 处理一下, 将 RNA 酶解成较小片段, 再经 Sepharose 2B 柱层析, 则质粒 DNA 与菌体 RNA 可完全分开 (图 1b)。

经 Sepharose 2B 柱洗脱收集的质粒 DNA 峰中仍然杂有少量细菌染色体 DNA (在大规模制备中不易去除干净) 我们的结果表明用酸酚 (pH4.0) 一次萃取, 即可除去染色体 DNA, 获得纯的质粒 DNA。用琼脂糖凝胶电泳检测表

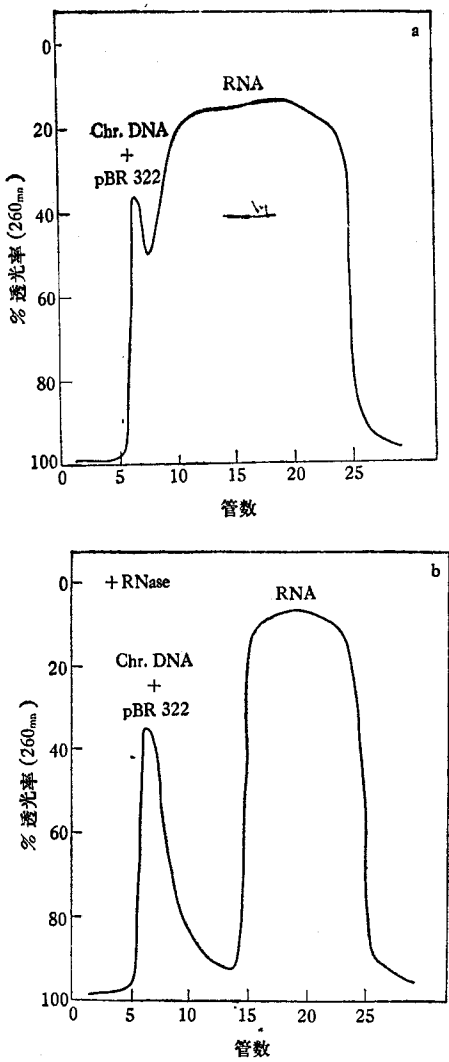


图 1 Sepharose 2B 柱层析分离质粒 DNA 和细胞 RNA

柱体积: 0.6×30cm; 上柱样品体积: 1ml; 洗脱液: 10 mM Tris-HCl (pH7.6)/0.1mM EDTA; 洗脱速度: 2 ml/hr。第一个紫外吸收峰是质粒 DNA 杂有少量染色体 DNA, 第二个峰是细胞 RNA。

a: 核酸粗提液未经 RNaseA 处理直接上 Sepharose 2B 柱, b: 核酸粗提液经 RNase 37℃, 30 分钟处理后上 Sepharose 2B 柱。

明质粒 DNA 中不污染有细胞 RNA 及细菌染色体 DNA (图 2)。纯化的 pBR322 中主要包含两种构型的分子, 大部分为超螺旋的共价闭环型分子, 电泳迁移速度较快, 少量为开环型分子, 电泳迁移速度较慢。经 E. coRI 作用后都切割成线状分子, 电泳迁移速度属于前两者之间。

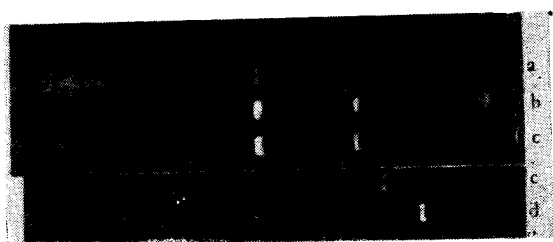


图2 琼脂糖凝胶电泳检查纯化的 pBR322
1% agarose 凝胶板

缓冲液: 50mM Tris-HCl (pH7.8) 20mM NaAc,
20mM NaCl, 电泳条件: 50V, 15hr.

- a: 经溶菌酶-SDS-NaOH 裂解得到的核酸粗提液。
b: 经 Sepharose 2B 柱层析后 pBR322 样品。
c: 经酚萃取一次后而得到的 pBR322 样品。
d: 经 EcoRI 酶解后的 pBR322。

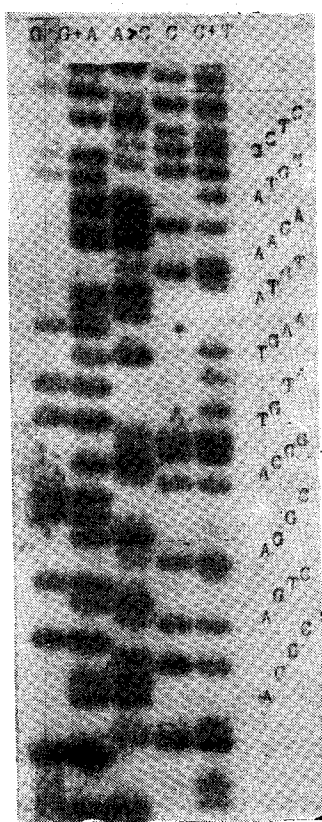


图3 用本方法制备的 pBR322 的 Hind
II-Hpa II 片段中部分 DNA 碱基序列

图示出从第 67 个碱基起至 106 个碱基共 40 个碱基的序列。
ACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAAAT
GCGCTC

用本方法制备的 pBR322 已成功地用作构建 pCaMV C17 重组质粒的载体(待发表)。所做的抗药因子转化大肠杆菌实验表明, 用钙离子处理的 *E. coli* 802 为受体, 每微克 pBR322 和 pFMDV 1034 DNA 能产生 10^5 以上的转化株, 均有较高的转化效率。

用本方法制备的各种质粒经多种限制性内切酶作用, 酶切图谱正常, 没有其它 DNA 的干扰。用于 DNA 序列分析时, 质粒经酶切后产生的 DNA 片段可以被多核苷酸激酶和 γ - 32 P-ATP 高比度地被标记, 说明无小分子 RNA 杂质干扰。pBR322 的部分片段的序列分析结果(图 3) 还表明质粒 DNA 制备过程中的各步骤对 DNA 碱基序列无影响。

以上结果表明, Sepharose 2B 柱层析分离大肠杆菌质粒 DNA 方法, 可用于大量制备中除去细胞 RNA 和染色体 DNA 的污染, 以获得纯的质粒 DNA, 以便用于 DNA 分子重组和 DNA 序列分析等研究。

参 考 文 献

- [1] Radloff, R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **57**, 1514, 1967.
- [2] Kahn, M. et al.: *Methods in Enzymol.*, **68**, 268, 1979.
- [3] Cornelis, P. et al.: *Plasmid*, **5** (2), 221, 1981.
- [4] Colman, A. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **91**, 303, 1978.
- [5] 敖世洲等《生物化学与生物物理学报》, 1980 年, 第 12 卷 3 期, 第 243 页.
- [6] Best, A. N. et al.: *Anal. Chem.*, **11**, 235, 1981.
- [7] Birnboim, H. C. et al.: *Nucl. Acid. Res.*, **7**, 1513, 1979.
- [8] Zasloff, M. et al.: *Nucl Acid Res.*, **5**, 1139, 1978.
- [9] Kupper, H. et al.: *Nature*, **289**, 555, 1981.
- [10] Cohen, S. N. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 2110, 1972.
- [11] Maxam-Gilbert: *Methods in Enzymol.*, **65**, 499, 1980.
- [12] 方荣祥:《微生物学通报》(1982 年, 9 期, 224 页).

[本文于 1982 年 7 月 28 日收到]

(上接第 19 页)

生物膜的研究范围很广。从本届国际生化大会生物膜的专题讨论和科学论文板报仅能看到生物膜研究的一些动向, 在会上很多学术交

流活动是同时进行的, 作者只能选择自己最感兴趣的参加, 上述介绍免不了带有一定的局限性, 仅供读者参考。

[本文于 1982 年 11 月收到]