

经验交流

一种快速检测 β -半乳糖苷酶活性的试纸方法

袁素莉 付立* 张其玖

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 建立了一种检测 β -半乳糖苷酶活性的 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -半乳糖苷 (X-gal) 试纸方法. 其原理在于酶色原底物 X-gal 在 β -半乳糖苷酶作用下产生蓝色 5-溴-4-氯-吲哚. 此方法 X-gal 用量少、操作简便、省时. 适用于基因克隆的检定.

关键词 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -半乳糖苷试纸, β -半乳糖苷酶, 基因克隆

在基因克隆中常用的许多载体如 M13mp, pUC, pWR, pTZ 和 pGEM^[1-4] 等质粒均含有调节序列和编码 β -半乳糖苷酶的基因 (lacZ) DNA 片段, 与这类载体质粒相匹配的宿主常用的有大肠杆菌 JM, DH5 α 和 NM522^[5] 等株系, 它们具有编码 β -半乳糖苷酶羧基末端的性因子 (lacZ Δ 15), 当上述质粒转入这类宿主细胞时, 便发生 α -互补, 导致产生有活性的 β -半乳糖苷酶^[6]. 以 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -半乳糖苷 (X-gal) 作为色原底物检测 β -半乳糖苷酶活性, 用于上述克隆系统中区分重组子与非重组子. 但是 X-gal 价格昂贵, 按常规操作每个平皿 X-gal 用量为 3—4mg, 用量大、代价高, 改进后的方法^[7] X-gal 用量仍接近毫克量. 为了进一步减少 X-gal 用量, 我们建立了快速简便的 X-gal 试纸方法.

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

1.1.1 *E. coli* K12 JM101^[1]: lac pro, thi, supE, F' traD36, proAB, lacZ Δ 15.

1.1.2 pWR13 质粒系中国科学院上海细胞所郭礼和先生惠赠^[3]. pGA10 质粒系 pWR13 质粒上插入了含有青霉素 G 酰化酶基因的 9.1kb DNA 片段^[8].

1.2 培养基与培养条件

1.2.1 LB 培养基的配制按文献 [7].

1.2.2 培养条件: 将 *E. coli* JM101 (含 pWR13 质粒) 接于含氨苄青霉素 (50 μ g/ml) 和 2mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖 (IPTG) 的 LB 培养基平皿上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜.

1.3 试剂

5-溴-4-氯-3-吲哚- β -半乳糖苷 (X-gal) 和 IPTG 为 Boehringer 或 Sigma 产品. 其它化学试剂均系国产分析纯.

1.4 X-gal 试纸的制备^[9]

1.4.1 不同含量 X-gal 试纸的制备 称取 1mg X-gal 放在无菌平皿内, 加入少量的二甲基甲酰胺, 待 X-gal 全部溶解后, 加无菌水至 0.5ml, 即为 2mg/ml 的 X-gal 溶液. 将无菌的 Whatman No. 1 滤纸 (Φ 83mm) 浸入 X-gal 溶液中, 浸透后取出晾干备用.

1.4.2 不同 pH X-gal 试纸的制备 基本操作同上, X-gal 浓度为 0.5mg/ml, 以不同 pH 值的缓冲液溶解. pH6.5 和 pH7.0 的缓冲液为 20mmol/L 磷酸盐, pH7.5, 8.0, 8.5 和 9.0 为 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液.

1.4.3 以 X-gal 试纸检测重组质粒^[9]

* 卫生部生物制品研究所, 北京 100110.

收稿日期: 1993-03-05, 修回日期: 1993-05-24

2 结果与讨论

2.1 纸上 X-gal 含量对呈色反应的影响

将过夜培养的 *E. coli* JM101 以不同含量的 X-gal 试纸试之。试纸剪成小块, 贴在长好的菌落上, 轻轻压一下, 湿透后取出, 37℃ 放置 15min 后, 记录结果见表 1。

表 1 纸上 X-gal 含量对呈色反应的影响

X-gal 浓度 (mg/ml)	2.0	1.0	0.5	0.25	0.125
纸上 X-gal 含量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ¹⁾	14.80	7.40	3.70	1.90	0.93
呈色反应 ²⁾	++++	++++	++++	+++	+

¹⁾按每张试纸吸收 0.4ml X-gal 溶液, 算出纸上 X-gal 含量, 被纸面积除; ²⁾++++ 深蓝色, +++ 蓝色, ++ 浅蓝色, + 微蓝色。

试验证明: 以 0.5mg/ml 浓度的 X-gal 溶液制作的试纸 X-gal 含量为 $3.7\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 凡具有 β -半乳糖苷酶活性的菌落, 很快变成深蓝色。为了进一步节约 X-gal 用量, 其量可减少一半, 试纸上的 X-gal 含量为 $1.9\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 不过 β -半乳糖苷酶阳性菌落为蓝色, 与阴性菌落能明显地区分开。

将 *E. coli* JM101 (pWR13) 和 *E. coli* JM101 (pGA10) 混合涂在 LB 培养基平皿上, 37℃ 培养过夜, 分别以不同含量的 X-gal 试纸检测, 结果见图 1a 和图 1b。 $3.7\mu\text{g}/\text{cm}^2$ X-gal 试纸经 37℃ 保温 15min 后, β -半乳糖苷酶阳性菌落 (JM101/pWR13) 呈深蓝色, 并以蓝色菌落为中心形成深蓝色环。阴性菌落 (JM101/pGA10) 仍保持本色。 $1.9\mu\text{g}/\text{cm}^2$ X-gal 试纸检测结果, β -半乳糖苷酶阳性菌落呈蓝色, 以本色菌落为中心形成蓝色斑, 阴性菌落为本色。二者可以明显加以区别。

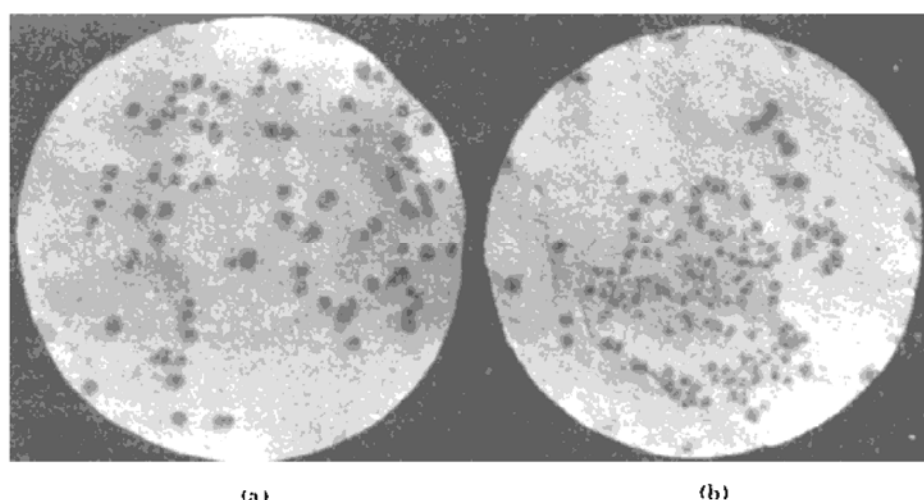


图 1 *E. coli* JM101 (pWR13) 和 *E. coli* JM101 (pGA10) 对 X-gal 试纸呈色反应
(a) X-gal 纸上含量为 $3.7\mu\text{g}/\text{cm}^2$; (b) X-gal 纸上含量为 $1.9\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。黑白照片颜色深浅不易区分, 图上较小之斑点即为本色菌斑。

2.2 不同诱导物对 β -半乳糖苷酶形成的影响

IPTG 系 β -半乳糖苷酶的高效诱导剂, 因价格贵, 用廉价的乳糖代替, 乳糖和葡萄糖的工作浓度均为 0.5%。由表 2 试验结果可以看出, 乳糖对 β -半乳糖苷酶的形成具有较好的诱导结果, 可以代替 IPTG, 而葡萄糖对 β -半乳糖苷酶的形成具有明显的抑制作用。

2.3 不同 pH 对呈色反应的影响

以 pH6.5—9.0 之间不同 pH 的 X-gal 试纸测试, 结果如表 3, 在 pH7.5—8.5 范围内经 37℃ 10min 保温即可开始呈浅蓝色, 15min 后 pH6.5—9.0 范围内的各个 X-gal 试纸全部呈深蓝色, 可见 X-gal 试纸在检测 β -半乳糖苷酶活性时对 pH 的要求不甚严格, 适应范围较广。

表 2 不同诱导物对 β -半乳糖苷酶的影响

纸上 X-gal 含量/ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	4. 6				2. 3			
诱 导 物	IPTG	乳糖	葡萄糖	未加	IPTG	乳糖	葡萄糖	未加
呈色反应	++++	+++	—	++	++++	+++	—	++

表 3 不同 pH 值的 X-gal 试纸对呈色反应的影响

pH 值	6. 5	7. 0	7. 5	8. 0	8. 5	9. 0
保温时间 10min	+	++	++	++	++	+
保温时间 15min	++++	++++	++++	++++	++++	++++
呈色反应 30min	++++	++++	++++	++++	++++	++++

此方法与常规的 X-gal 平皿法比较, 具有操作简便、快速、灵敏等优点, 而且实验结果重复性好. X-gal 试纸在干燥条件下保存可长期使用.

本方法的 X-gal 用量按每只平皿计算, 只是平皿法的 $1/8-1/4$, 若剪成小纸片使用, 可避免平皿法大面积无菌落造成的 X-gal 不必要消耗. X-gal 试纸曾成功地用于 D-木糖异构酶基因的亚克隆筛选^[10]. 本方法不仅适用于产 β -半乳糖苷酶微生物的筛选, 而且适用于基因克隆的检定.

参 考 文 献

- Messing J, Crea R, Seeburg H. Nuel Acids Res, 1981; 9: 309
- Anon. Protocols and applications guide, 2nd. USA: Promega Co, 1991: 53
- 郭礼和, 曹仲欣, 吴 瑞. 生物工程学报, 1985; 1 (2): 14
- Anon. Life science research products, California: Bio-rad Co, 1992: 177
- Haxahax D. J Mol Biol, 1983; 166: 577
- Ullmann A, Jacob F, Monod J. J Mol Biol, 1967; 24: 339
- Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, 2nd, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 1: 186
- 张其玖, 张兰芳, 韩恒湘等. 微生物学报, 1988; 28: 40
- Zhang Qijiu, Zhang Lanfang, Han Hengxiang *et al.* Anal Biochem, 1986; 156: 413
- 侯永敏, 张其玖, 王书锦. 生物工程学报, 1990; 6 (4): 300

AST 同工酶的琼脂糖凝胶电泳 NBT 显色法

石玉玲 陈彦红 刘 讯

(广州军区武汉总医院检验科, 武汉 430070)

摘要 分布于细胞内线粒体及细胞质中的天门冬氨酸氨基转移酶 (AST·EC·2·6·1·1) 是人血清中含有的两种同工酶, 分别称为 AST-m 和 AST-c 同工酶. AST-c 电泳迁移率介于血清 α -球蛋白与 β -球蛋白之间. AST-m 电泳迁移率相似于 γ -球蛋白, 琼脂糖凝胶电泳固蓝 B 染色法对 m-AST 检出率较低. 用 NBT 显色法则可得到较好效果.

A Test Paper Method for Rapid Detecting β -Galactosidase. Yuan Suli, Fu Li, Zhang Qijiu. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 271

A X-Gal test paper method for detecting β -galactosidase has been developed. This method is based on the degradation of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactoside, a chromogenic substrate, into blue 5-bromo-4-chloro-indole by the reaction of β -galactosidase. Advantage of the method is that it not only consumes X-gal less, but it is also more simple and convenient than the previous method. The present method is suitable for detecting a large number of the colonies containing gene encoding for β -galactosidase from an agar plate.

Key words X-gal test paper, β -galactosidase, gene cloning

Agarose Gel Electrophoresis Staining With NBT for AST Isoenzyme Measurement. Shi Yuling, Chen Yanhong, Liu Xun. (*Wuhan Gen. Hosp., Guangzhou Mil. Reg., Wuhan 430070*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 273

Mammalian aspartate aminotransferases (AST • EC • 2 • 6 • 1 • 1) exist in two predominant forms: one mitochondrial (AST-m) the other of cytosolic origin (AST-c). The electrophoretic migration rate of AST-c is between α - and β -glubulin, and the electrophoretic migration rate of AST-m is similar to γ -

glubulin. The method of solid blue B dye with electrophoresis on agarose is not sensitive to AST-m. So the nitroblue tetrazolium (NBT) dye is used instead of the solid blue B dye.

Key words aspartate aminotransferase isoenzyme, nitroblue tetrazolium dyes, agarose gel electrophoresis

Determination of Intracellular Free Ca^{2+} Concentration in Neurocytes with Fura-2 Double-Wavelength Fluorecent Technique. Lu Bufeng, Huang Yisen, Lu Youming. (*Department of Biochemistry, Zhenjiang Medical College, Zhenjiang 212001*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 275

The intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) was measured in isolated neurocytes prepared from *Sprague-Dawley* rats with Fura-2 double-wavelength fluoremetry. The results showed that the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of the resting neurocytes in Ca^{2+} -containing solution was $109 \pm 12 \text{ nmol/L}$ ($\bar{x} \pm s$, $n=9$). KCl (30mmol/L) markedly evoked $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of the neurocytes ($P < 0.01$, $n=9$), and the rises of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by KCl is a concentration-dependent response. These results suggest that the adoption of Fura-2 double-wavelength fluoremetry in dissociated rat neurocytes in a useful and relatively easily applicable technique for monitoring intracellular Ca^{2+} changes.

Key words Fura-2, intracellular free calcium, neurocytes, rat