

2 Abbott C, Povey S, Vivian N *et al.* PCR as a rapid screening method for transgenic mice. *TIG*, 1988, 22 (4): 325

A Rapid Method of Identifying Low Copy Number Transgene Using Agarose Gel Hybridization. LU Yifan, TIAN Chai¹⁾, DENG Jixian (*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medicine, Beijing 100071, China;* ¹⁾ *Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, Beijing Union Medical University & Chinese*

Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China).

Abstract There are a lot of difficulties using PCR method to identify low copies of exogenous gene in transgenic animal. A method of agarose gel direct hybridization was established. A fast and easy method to identify low copy transgenes in transgenic animal is provided.

Key words agarose gel, hybridization, low copy number of gene, transgenic animal

pZ189 质粒 DNA 体外复制系统的建立

冯朝晖 余应年 陈星若

(浙江医科大学病理生理教研室, 杭州 310031)

摘要 报道了含 SV40 复制起点的质粒 DNA 在真核细胞抽提物中进行复制的 DNA 体外复制系统的建立. 在外源性蛋白质 SV40 大 T 抗原 (SV40 Tag) 的参与下, 穿梭质粒 pZ189 能在猴肾 vero 细胞胞浆抽提物中, 利用其中参与体内 DNA 复制所需的蛋白质成分, 有效地进行体外 DNA 复制. 从而为研究真核细胞 DNA 复制系统的结构与功能提供了简单、有效的模型.

关键词 穿梭质粒, 真核细胞, DNA 复制系统, 体外, SV40 大 T 抗原

学科分类号 Q785

真核细胞 DNA 复制是重要的生物学现象, 对其复制系统具体结构与功能的研究具有重要的理论和实践意义. DNA 体外复制系统在排除了体内许多与 DNA 复制非直接相关的因素影响的情况下, 为研究真核细胞内复杂的 DNA 复制系统提供了一个简单、有效的模型. 研究证实, 在外源性蛋白质 SV40 Tag 的参与下, 在猴肾细胞 (CV1、Cos 等) 和人类细胞 (HeLa 等) 胞浆抽提物中, 含 SV40 复制起点的质粒 DNA 能利用抽提物中参与体内 DNA 复制所需的蛋白质成分, 模拟体内 DNA 复制过程, 有效、准确地进行 DNA 体外复制^[1,2]. 我们利用 pZ189 质粒, 在猴肾 vero 细胞胞浆抽提物中, 建立了有效的 DNA 体外复制系统.

1 材料与方法

1.1 质粒 DNA 模板

pZ189 质粒为一 5 504 bp 的穿梭质粒, 含有 SV40 和 pBR327 复制起点^[3]. 质粒在 *E. coli* MBM7070 菌株中扩增并纯化.

1.2 细胞胞浆抽提物的制备

单层生长的 vero 细胞培养于 DMEM 液中, 加 10% 小牛血清. 收获呈指数级生长的细胞 (7×10^7 细胞). 在 4℃ 条件下进行以下操作. 溶液 PBS 漂洗细胞, 离心 $500 \times g$, 5 min, 以沉淀细胞. 在冰冷的低渗液 A (20 mmol/L HEPES·KOH, pH 7.5, 5 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT) 中

漂洗后, 经离心沉淀, 将细胞重新悬浮于低渗液 A 中 (7×10^7 个/ml 低渗液 A). 置冰上 15 min. 将细胞彻底匀浆后 (显微镜下观察, 95% 以上细胞破碎), 置冰上 30~60 min. 然后于 0°C 离心, $10\,000 \times g$, 10 min. 上清液于液氮中快速冷冻后贮于 -70°C [4,5].

1.3 体外复制系统

反应总体积为 150 μl . 含 30 mmol/L HEPES·KOH, pH 7.5, 7 mmol/L MgCl_2 , 4 mmol/L ATP, 0.5 mmol/L DTT, 100 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 200 $\mu\text{mol/L}$ CTP, GTP 和 UTP, 40 mmol/L 磷酸肌酐 (di Tris 盐, pH 7.7, Sigma 产品), 10 μg 磷酸肌酐激酶 (Boehringer Mannheim 产品), 4 μg SV40 Tag (Molecular Biology Resources Inc.), 0.6 μg pZ189 质粒 DNA, 80 μl 胞浆抽提物. 在 37°C 反应 4~6 h 后, 加入终浓度 10 mmol/L EDTA, 0.1% SDS, 200 mg/L 蛋白酶 K (GIBCO), 在 37°C 继续温育 20 min 以终止反应. 经酚/氯仿抽提后, 乙醇沉淀 DNA, 并以 70% 乙醇漂洗 2 次. DNA 产物中加入 10U 内切酶 *Dpn* I (GIBCO), 并将缓冲液中 NaCl 终浓度调至 0.2 mol/L, 37°C 酶切过夜以除去未经体外复制的 DNA. 终产物在含 2 mg/L 溴乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 电压 5 V/cm, 2 h. 在紫外光下观察并记录结果 [5].

2 结果和讨论

穿梭质粒 pZ189 中含有多个 -GATC- 序列, 在 *E. coli* 中复制时被 dam 甲基化酶修饰形成双链腺嘌呤甲基化的特异序列, 可以被 *Dpn* I 识别并酶切形成多个大小不一的小片段. 由于真核细胞不存在 dam 甲基化酶, 无法对新复制的 pZ189 质粒中的上述序列进行甲基化修饰, 因此新复制的半甲基化或未甲基化 DNA 产物对 *Dpn* I 具有抗性, 不能被其酶切, 据此可以判别 pZ189 质粒是否已被真核细胞中的复制系统予以复制 [4].

在 vero 细胞抽提物中, 在 SV40 Tag、磷酸肌酐激酶和磷酸肌酐、ATP、dNTP 等因子

存在情况下, pZ189 质粒 DNA 在 37°C 经 4 h 反应后, 作 *Dpn* I 酶切消化. 其产物经琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色后在紫外光下可以观察到对 *Dpn* I 具有抗性的 pZ189 质粒 DNA 条带 (图 1, 泳道 3), 与 *E. coli* 中复制得到的 pZ189 质粒 DNA 条带齐同 (图 1, 泳道 2), 表明该 DNA 为在细胞抽提物中被体外复制系统以半保留形式复制后的产物. 实验中发现, 在体外复制系统中, 复制效率以闭环质粒为最高, 开环及线性质粒则明显次之 (资料未显示). 文献资料亦证实了此现象, 认为可能与后者易被抽提物中核酸酶降解有关 [5,6]. 为了保证高效的体外复制, 应尽量提高 DNA 模板中闭环质粒的比例. 在 SV40 Tag 或磷酸肌酐激酶和磷酸肌酐分别缺失, 而其他条件均与前者相同的反应体系中, pZ189 DNA 在 37°C 反应 4 h 后, 经 *Dpn* I 酶切处理后电泳, 结果均未见有对 *Dpn* I 具有抗性的 pZ189 DNA 条带出现, 反应前加入的 pZ189 DNA 已被 *Dpn* I 彻底酶解 (图 1, 泳道 4、5), 表明在缺失上述必要成分的反应体系中不能进行有效的 DNA 体外复制.

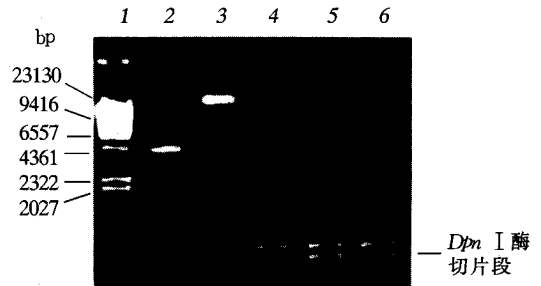


图 1 质粒 pZ189 DNA 体外复制产物的电泳图

1: λ DNA/*Hind* III 片段 DNA 分子质量标准; 2: pZ189 DNA 在 *E. coli* MBM7070 中的复制产物; 3: pZ189 DNA 在完整的体外复制系统中, 经 37°C , 4 h 反应, 并经 *Dpn* I 酶切处理后的产物; 4: pZ189 DNA 在 SV40 Tag 缺失的体外复制系统中, 经 37°C , 4 h 反应, 并经 *Dpn* I 酶切处理后的产物; 5: pZ189 DNA 在磷酸肌酐激酶和磷酸肌酐缺失的体外复制系统中, 经 37°C , 4 h 反应, 并经 *Dpn* I 酶切处理后的产物; 6: pZ189 DNA 在完整的体外复制系统中, 经 0 h 反应, 并经 *Dpn* I 酶切处理后的产物.

上述结果表明, 在 vero 细胞抽提物中, 在外源性蛋白质 SV40 Tag 的参与下, 质粒 pZ189 能利用抽提物中参与体内 DNA 复制所需的蛋白质成分, 有效地进行 DNA 体外复制. 而 SV40 Tag, 磷酸肌酐激酶和磷酸肌酐均为 DNA 体外复制所必需, 其缺失将导致 DNA 体外复制能力的缺陷. 国外研究证实, SV40 Tag 在 ATP 存在的条件下, 能有效地识别并结合至质粒 DNA 复制起点, 同时起到 DNA 解螺旋酶的作用, 为参与体外复制系统唯一的外源性蛋白质成分. 而磷酸肌酐激酶和磷酸肌酐组成了能量再生系统, 起到为 DNA 复制提供能量的作用^[6,7].

由于 DNA 体外复制系统为研究复杂的真核细胞 DNA 复制系统提供了简单、有效的手段, 目前在许多方面的研究中得到了应用. 我们建立了 pZ189 质粒在 vero 细胞抽提物中的 DNA 体外复制系统, 将有效地用于研究各种理化因子如何通过对 DNA 复制系统功能的损伤而导致其复制保真度的下降, 及最终导致基因突变、癌变等事件发生的确切机制.

参 考 文 献

- 1 Hurwitz J, Dean F B, Kwong A D *et al.* The *in vitro* replication of DNA containing the SV40 origin. *J Biol Chem*, 1990, **265** (30): 18043~18046
- 2 Hubscher U, Spadari S. DNA replication and chemotherapy. *Physio Rev*, 1994, **74** (2): 259~297
- 3 Seidman M M, Dixon K, Razzaque A *et al.* A shuttle vector plasmid for studying carcinogen-induced point mutations in mammalian cells. *Gene*, 1985, **38** (3): 233~237
- 4 Carty M P, Hauser J, Levine A R *et al.* Replication and mutagenesis of UV-damage DNA templates in human and

monkey cell extracts. *Mol Cell Biol*, 1993, **13** (1): 533~542

- 5 Stillman B W, Gluzman Y. Replication and supercoiling of simian virus 40 DNA in cell extracts from human cells. *Mol Cell Biol*, 1985, **5** (8): 2051~2060
- 6 Wobbe C R, Weissbach L, Borowiec J A *et al.* Replication of simian virus 40 origin-containing DNA *in vitro* with purified proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84** (7): 1834~1838
- 7 Wobbe C R, Dean F, Weissbach L *et al.* *In vitro* replication of duplex circular DNA containing the simian virus 40 DNA origin site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82** (17): 5710~5714

Replication of pZ189 Plasmid DNA *in vitro*.
FENG Zhao-hui, YU Ying-nian, CHEN Xing-roo (*Department of Pathophysiology and Laboratory of Molecular Cellular Biology, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310031, China*).

Abstract *In vitro* DNA replication system derived from eukaryotes is capable of replicating exogenous plasmid DNA containing SV40 origin of replication efficiently and accurately. Such an *in vitro* DNA replication system has been established. In the presence of exogenous SV40 large T antigen, shuttle-vector plasmid pZ189 could replicate efficiently in monkey kidney vero cytoplasmic extracts, which provided all the other necessary proteins for DNA replication. This *in vitro* DNA replication system provides a useful measure for studying the composition and function of eukaryotic DNA replication system.

Key words shuttle-vector, eukaryote, DNA replication system, *in vitro*, SV40 large T antigen

Magic/ Wizard DNA 纯化试剂盒的再生利用

袁 勇 宋泉声 刘红涛 狄春辉 王玉刚

(北京医科大学免疫学系, 北京 100083)

摘要 DNA 的提取是分子生物学的常规操作, 美国 Promega 公司推出的 Magic/ Wizard 试剂盒大大简