

P₂-DNA 的转染及提纯

景建洲¹ 李振勇² 孙连魁¹

(西北大学生物系 西安 710069)¹

(华美生物工程公司 洛阳 471001)²

P₂-DNA 即 Phage 2 型噬菌体的染色体 DNA, 是一条线状双股螺旋的 DNA 分子, 分子量为 2.2×10^7 Da, 有 19 个碱基的粘性末端, 可以连接成环状^[1], 1970 年 Bertani L. E. 和 Bertani G 分离纯化得到 P₂ 噬菌体并对其遗传学及理化特性进行了研究^[2], 发现它在 DNA 复制, 溶源性的控制以及基因重组等方面与温和性 λ 噬菌体不同; 1979 年 Saint R B 等和 Westöo A 等先后研究了 P₂-DNA 的几种限制酶的切割图谱^[3]。P₂-DNA 可望成为分子生物学研究的重要工具和实验材料。

目前国内尚无这种材料, 我们试图将少量的 P₂-DNA 转染获得 P₂ 噬菌体, 加以扩增纯化, 抽提得到大量的 P₂-DNA, 为分子克隆和限制酶的研究提供有实用价值的材料和研究工具。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 P₂-DNA 系瑞典乌波萨拉大学生物医学中心的 Bertani G 教授馈赠。

1.1.2 P₂ 噬菌体宿主 LE 392 (F⁻ had R₅₄ (r₁⁻ m₁⁻) Sup E₄₄ Sup F₅₈) 由华美生物工程公司提供。

1.1.3 主要试剂: λ -DNA 及所用内切酶、琼脂糖系华美生物工程公司产品; 聚乙二醇 (PEG)₆₀₀₀ 系日本进口分装。苯酚需重蒸^[4]。

1.2 方法

1.2.1 P₂-DNA 的转染及噬菌体纯化: 接种 LE₃₉₂ 于 LB 培养基^[4], 37°C 振荡培养 14~18h, 吸取 1ml 培养液接种于 49ml LB 培养基中, 振荡培养至 OD_{600nm} 大约为 0.4, 冰上静置, 离心收集细胞。将该细胞悬浮于 25ml 100mmol/L CaCl₂ 溶液中, 冰上静置, 离心, 收集细胞重悬于 CaCl₂ 溶液中, 4°C 放置 12~14h。取 0.1ml 悬浮液 (约含 10⁹ 个细胞) 于一预冷无菌试管中, 加 0.1 μ g P₂-DNA。冰上静置, 再于 42°C、0°C、37°C 水浴中处理, 然后加 5ml 上层半固体培养基 (0.7% 酵母粉, 0.5% NaCl, 0.7% 琼脂, pH7.5) 铺平板, 37°C 培养 12~14h, 观察噬菌斑。挑取单斑摇瓶扩增, 获得噬菌体。

按 10¹⁰ 个宿主细胞比 5 \times 10⁸ 个噬菌体的比例接种于 LB 培养基, 振荡培养 8~9h, 每 100ml 培养液加 2ml 氯仿, 继续振荡 30min, 加固体 NaCl 至终浓度为 0.5mol/L, 冰上静置, 离心取上清液, 加固体 PEG₆₀₀₀ 至终浓度为 10%, 室温下缓慢搅拌至 PEG 全部溶解。冰上静置, 冷冻离心, 用 P₂ 缓冲液^[2] 温和地悬浮沉淀。加等体积氯仿于悬浮液, 振荡, 离心, 取水相, 再用 PEG 沉淀, 用氯仿抽提, 取水相对 1000 倍体积的 DNA 缓冲液^[4] 透析, 即获噬菌体悬浮液。

1.2.2 DNA 的抽提 将噬菌体悬浮液加等体积中和的酚^[5], 振荡, 室温下离心, 取水相加等体积酚和氯仿 (V/V) 混合物抽提水相, 再用等体积氯仿抽提一次, 取水相相对 1000 倍体积的 TE 缓冲液^[4] 在 4°C 下透析, 即得 DNA, 置 4°C 冰箱保存。

2 结果与讨论

2.1 样品 DNA 纯度鉴定

2.1.1 紫外吸收法测定纯度: 我们知道除非 DNA 的 (G+C)% 含量异常, 不然双链 DNA 纯制品的 OD_{260nm}/OD_{280nm} 的比率应介于 1.65 和 1.85 之间^[5]。我们测定了样品 DNA 的紫外吸收值。测得其 $OD_{260nm}/OD_{280nm} = 1.65$ 。因此样品 DNA 的纯度很高。

2.1.2 琼脂糖凝胶电泳结果表明: 样品 DNA 的电泳条带单一, 达到了电泳纯(见图 1)。



图 1 分子量测定电泳凝胶

1. 样品 DNA
2. λ-DNA
3. Smal I 完全切割的 λ-DNA

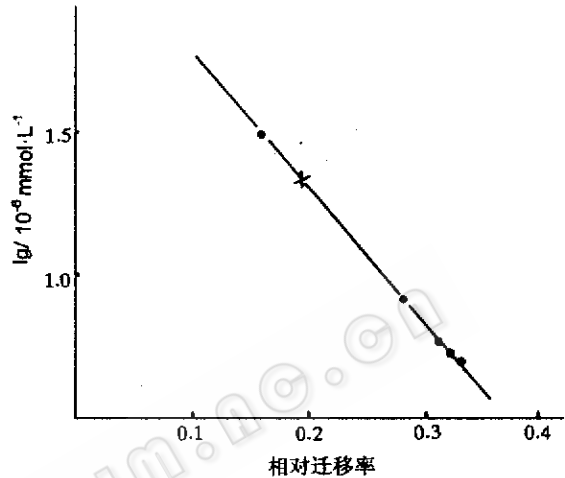


图 2 样品 DNA 分子量的测定

- λ-DNA 及其酶切碎片, × 样品 DNA

2.2 凝胶电泳法测定样品 DNA 分子量

以 λ-DNA(分子量为 31.5×10^6 Da) 和 Smal I 完全切割的 λ-DNA 碎片做标准(四片段的分子量分别为 12.6×10^6 、 7.94×10^6 、 5.58×10^6 、 5.39×10^6)，与样品 DNA 同时进行琼脂糖凝胶电泳，凝胶浓度为 0.7%，结果见图 1。根据电泳迁移率与分子量对数值成反比的关系，测得样品 DNA 的分子量为 2.19×10^7 ，与 P₂-DNA(2.2×10^7 Da) 极相近。

2.3 样品 DNA 的内切酶图谱

若干种内切酶在 P₂-DNA 上的切点数及切割后其 DNA 碎片的相对长度早有报道^[1]，见图 3。我们用 BamH I、Sal I、EcoR I 等 3 种限制酶分别在其最适反应条件下切割样品 DNA，所得到的内切酶图谱与理论报道的图谱一致。图 4 为样品 DNA 与诸种内切酶反应后的琼脂糖凝胶电泳照片。比较图 3 与图 4 可知 P₂-DNA 被 BamH I 切割后产生 4 个片段，因 A₁ 片段太小不能检出，故只有 3 条带，Sal I 在 P₂-DNA 上有 2 个切点，电泳后可检测到 3 条带，EcoR I 有 3 个切点，可以检出 4 条带。

由上可以断定样品 DNA 与 P₂-DNA 具有相同内切酶位点数。

我们根据 DNA 分子量的对数值与其电泳迁移率成反比的关系，求得各片段的相对长度(以样品 DNA 的长度为 100)，见表 1。我们又根据片段的荧光强度与 DNA 片段的相对长度成正比的关系，求得各片段的相对长度，见表 1。

由以上结果可知样品 DNA 与 P₂-DNA 具有相同的内切酶图谱。因此不难确定样品 DNA 就是 P₂-DNA。我们通过转染、纯化、抽提、将微量的 P₂-DNA 扩增，为分子生物学的研究提供了有用的材料与工具。

表 1 P₂-DNA 被限制酶切割后诸片段的相对长度(%)

内切酶	理论值 ⁽¹⁾				根据迁移率所得				根据荧光强度所得		
EcoR I	37	32.4	20.1	10.5	37	32	20	10	77.5	14	7.5
BamH I	54.7	38.7	5.8	0.8	54	42	6		55	39	6
Sal I	63.2	31.4	5.4		62	32	6		65	30	5

* 为迁移率相近的两片段荧光强度之和。

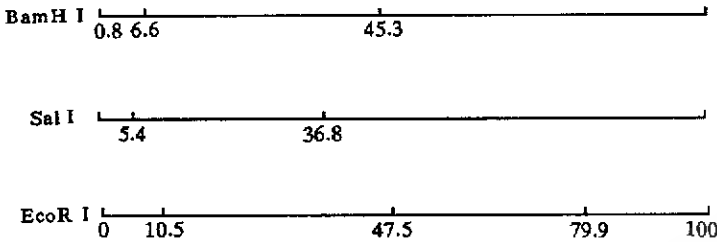
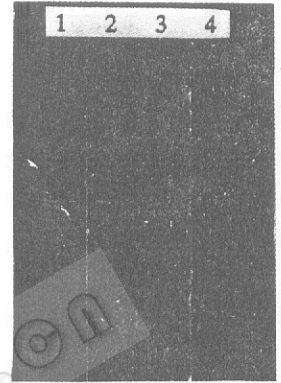
图 3 P₂-DNA 的 3 种内切酶图谱

图 4 样品 DNA 与内切酶反应后电泳凝胶照片

1. 与 BamH I 反应, 2. 与 Sal I 反应, 3. 与 EcoR I 反应, 4. 样品 DNA

参 考 文 献

- [1] Westö A, Ljungquist E, Molec Gen Genet 1979, 171:91~102.
- [2] Bertani L E, Bertani G, Adv Genet 1971, 16:199~237.
- [3] Saint R B, Egan J B, Molec Gen Genet 1979, 171:79~90.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, Molecular Cloning, A Laboratory Manual. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [5] Schleif R F, Wensink P C, Practical Methods in Molecular Biology. New York. Springer-Verlag. 1981.

The Transfection and Purification of P₂-DNA

Jing Jianzhou¹ Li Zhengyong² Sun Liankui¹

(Biology Depart. Northwest University, Xi'an 710069)¹

(Sino-American Biotechnology Company, Luoyang 471001)²

Abstract The transfection of P₂-DNA, purification of bacteriophage P₂ and P₂-DNA were reported. The specimen DNA had the same restriction endonuclease cleavage map as of P₂-DNA. The molecular weight of specimen DNA was 2.19×10^7 daltons. So the specimen DNA was P₂-DNA.

Key Words P₂-DNA, transfection, purification