

# D-环丝氨酸浓缩重组质粒菌优选条件的研究

赵敬稳

(中国科学院微生物研究所,北京)

体外 DNA 重组技术是分子遗传学研究的有力工具。近年来,国内外已经报道了包括原核和真核基因组中 DNA 片段无性繁殖的许多有意义的实验。1976 年 Bernardi 等利用限制性核酸内切酶 *EcoRI* 及粘着末端连接法,将  $\lambda$  噬菌体 DNA 片段与 pSC101 质粒在体外建成了含有所有  $\lambda$ -*EcoRI* 片段的重组 DNA,并在大肠杆菌中进行了无性繁殖<sup>[1]</sup>。研究实验中通常使用的分子载体有大肠杆菌抗四环素及抗氨基青霉素的质粒 pBR<sup>322</sup>。在工作中我们曾将大

肠杆菌  $\lambda$  噬菌体 DNA 在体外经限制性核酸内切酶 *Hind III* 切割,并用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接后的混合物进化转化,又得到了转化体 pAG<sup>82</sup> 重组质粒<sup>[2]</sup>。

由于切割点是在 T<sub>r</sub> 基因上,故得到的 pAG<sup>82</sup> 重组质粒只抗氨基青霉素,不抗四环素(以 A<sub>p</sub><sup>r</sup>T<sub>r</sub> 表示)。我们使用 D-环丝氨酸浓缩

---

本工作得到范云六教授和姜书勤主任的指导和帮助,特此致谢。

重组质粒菌，由于四环素抑制了蛋白质的合成而使细菌停止生长，但并不杀死菌细胞<sup>[3]</sup>。D-环丝氨酸是一种氨基酸类似物，掺入到蛋白质中能使细菌致死。因此，在有四环素存在下，不抗四环素的细菌由于受到抑制而不繁殖。而抗四环素的细菌繁殖合成蛋白质，在加入 D-环丝氨酸后，由于 D-环丝氨酸的掺入，菌被杀死。相反，不抗四环素的细菌生长被抑制了，没有蛋白质合成过程，加入 D-环丝氨酸后，D-环丝氨酸不能掺入，这样就大大浓缩了 A<sub>5</sub>T<sub>3</sub>(pAG<sup>82</sup>) 重组质粒<sup>[3]</sup>。本文主要报道用 D-环丝氨酸浓缩 A<sub>5</sub>T<sub>3</sub> 重组质粒的优选条件。

## 材料和方法

1. 菌株: *E. coli* 802 (pBR<sup>322</sup>), *E. coli* HB101 (pAG<sup>82</sup>)。

2. 培养基: 用于活化细菌。

(1). BPY 培养基 (g): 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, 酵母膏 5, 葡萄糖 5, 氯化钠 5, 蒸馏水 1000 ml, pH7.2。

(2) BPY 固体培养基: BPY 液体培养基加 2% 琼脂。

3. 试剂: (1) D-环丝氨酸: Fluka 瑞士产品。(2) 氨苄青霉素: 上海第四制药厂生产。(3) 四环素: 卫生部药品生物制品检定所生产。

4. 具体方法: 主要参考文献 [2] 进行。将带有质粒 pAG<sup>82</sup> 和 pBR<sup>322</sup> 的细菌按其不同稀释浓度和不同细菌量混合, 选择合适的菌液配比。

(1) 细菌活化: 将细菌接 BPY 斜面, 37℃ 温箱培养 8 小时后转接 5ml BPY 试管, 37℃ 水浴摇床振荡培养 16 小时。

(2) 细菌的稀释: 将 HB101 (pAG<sup>82</sup>) 稀释成 10<sup>-7</sup> 后分别与 HB101 (pBR<sup>322</sup>) 的 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup> 稀释度混合, 使配比分别为 1:1000、1:100、1:10、1:1, 放入灭菌的大试管内, 在 2ml BPY 培养液中 37℃ 振荡培养 4 小时后加四环素, 使最终浓度为 10 μg/ml; 37℃ 振荡培养 45 分钟后加入 D-环丝氨酸, 使最终浓度为 200 μg/ml; 37℃ 振荡培养 60 分钟, 4000r/min 离

心 5 分钟; 用 BPY 培养液洗一次, 加 2—5ml BPY 液 (每毫升 BPY 液中含 20 μg 氨苄青霉素) 继续在 37℃ 培养 12 小时, 取 10<sup>-7</sup> 菌液 0.1 ml 涂在每毫升含 20 μg 的氨苄青霉素的固体培养基上, 37℃ 培养 24 小时。然后用复制法将长出的菌落复制在含有 25 μg/ml 四环素的 BPY 固体培养基平皿上和含有 20 μg/ml 氨苄青霉素的平皿上, 挑选出在含氨苄青霉素的 BPY 固体培养基上生长; 而在含四环素的 BPY 固体培养基上不生长的菌落。并重复测定这些菌落在含四环素及氨苄青霉素的 BPY 固体培养基上生长情况。

## 结果

(一) 质粒 pAG<sup>82</sup> 与 pBR<sup>322</sup> 的菌液合适配比 (表 1)

表 1 结果说明了用 D-环丝氨酸浓缩重组质粒 A<sub>5</sub>T<sub>3</sub> (pAG<sup>82</sup>) 时, 含质粒 pAG<sup>82</sup> 菌液浓度为 1.8 × 10<sup>9</sup> 与含 pBR<sup>322</sup> 菌液浓度为 1.4 × 10<sup>9</sup> 时, pAG<sup>82</sup> 与 pBR<sup>322</sup> 菌液的配比为 1:10。用 D-环丝氨酸浓缩重组质粒 A<sub>5</sub>T<sub>3</sub> 占 A<sub>5</sub> 的 5.8%。

表 1 质粒 pAG<sup>82</sup> 与 pBR<sup>322</sup> 菌液合适配比

质粒 pAG <sup>82</sup> 和 pBR <sup>322</sup> 混合配比	1:1000	1:100	1:10	1:1
pAG <sup>82</sup> 菌液的稀释度	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>
pBR <sup>322</sup> 菌液的稀释度	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
在含氨苄青霉素 (20 μg/ml) BPY 上生长菌落数	584	485	877	329
在含四环素 (25 μg/ml) BPY 上不生长菌落数	0	6	51	10
A <sub>5</sub> T <sub>3</sub> 占 A <sub>5</sub> 的百分数	0	1.2	5.8	3

(二) 不同浓度的 D-环丝氨酸对 A<sub>5</sub>T<sub>3</sub> (pAG<sup>82</sup>) 的浓缩效果 (表 2, 图 1)

从表 2, 图 1 的结果看到, 质粒 pAG<sup>82</sup> 与 pBR<sup>322</sup> 的菌液配比按 1:10 进行实验, 在 D-环丝氨酸浓度为 400 μg/ml 时, A<sub>5</sub>T<sub>3</sub> 占 A<sub>5</sub> 的 40.8%, 对 A<sub>5</sub>T<sub>3</sub> (pAG<sup>82</sup>) 的浓缩效果最好。

表2 不同浓度的D-环丝氨酸对A<sub>β</sub>T<sub>2</sub>(pAG<sup>82</sup>)的浓缩效果

D-环丝氨酸浓度 (μg/ml)	200	400	600	800
含氨基青霉素 (20μg/ml) BPY 上生长的菌落数	446	321	678	810
含四环素 (25μg/ml) BPY 上不长的菌落数	87	131	233	176
A <sub>β</sub> T <sub>2</sub> 占 A <sub>β</sub> 的百分数	15	40.8	34.3	21.7

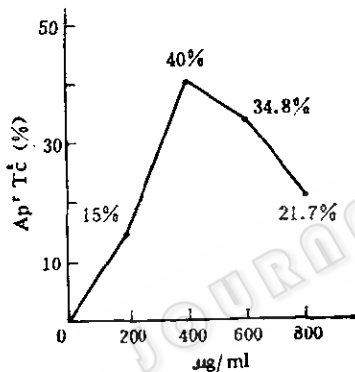


图1 不同浓度的D-环丝氨酸对A<sub>β</sub>T<sub>2</sub>(pAG<sup>82</sup>)的浓缩效果

### (三) D-环丝氨酸的不同作用时间对A<sub>β</sub>T<sub>2</sub>(pAG<sup>82</sup>)的浓缩效果(表3)

从表3结果看出,在质粒 pAG<sup>82</sup> 和 pBR<sup>322</sup> 的菌液配比为 1:10, pAG<sup>82</sup> 菌液浓度为  $3.8 \times$

$10^9$ , pBR<sup>322</sup> 菌液浓度为  $6.8 \times 10^9$ , D-环丝氨酸浓度为 400 μg/ml 时, D-环丝氨酸的作用时间为 90 分钟, A<sub>β</sub>T<sub>2</sub> 占 A<sub>β</sub> 的 35.8%, 对 A<sub>β</sub>T<sub>2</sub> 的浓缩效果最好。

表3 D-环丝氨酸的不同作用时间对A<sub>β</sub>T<sub>2</sub>的浓缩效果

D-环丝氨酸的作用时间(分)	30'	60'	90'	120'
D-环丝氨酸浓度(μg/ml)	400	400	400	400
在含氨基青霉素(20ug/ml) BPY 上生长菌落数	972	622	546	908
在含四环素(25μg/ml) BPY 上不生长菌落数	246	212	196	208
A <sub>β</sub> T <sub>2</sub> 占 A <sub>β</sub> 的百分数	25.2	34	35.8	22.8

以上试验结果说明,用D-环丝氨酸浓缩建成的重组质粒时,以D-环丝氨酸浓度为 400 μg/ml,作用时间为 90 分钟时的浓缩效果最好。这一结果为利用 pBR<sup>322</sup> 作为分子载体开展重组质粒的工作提供了有利条件。

### 参 考 文 献

- [1] Bernardi, A. et al.: *Nature*, **264**: 89-90, 1976.
- [2] 范云六等: *遗传学报*, **6**(3): 262, 1979.
- [3] Sutcliffe, G. et al.: In A. M. Chakrabarty (Ed.), *Genetic Engineering* CRC Press, Florida, pp. 83-111, 1978.