

## 萘啶酮酸中断杂交基因定位

高东 王金盛

(山东大学微生物系, 济南)

大肠杆菌 (*E. coli*) 中断杂交基因定位是微生物遗传实验教学中必做的基础实验之一, 目前均采用冷泉港实验室 Miller 提出的机械中断法<sup>[1]</sup>。此法需用 Low 和 Wood 设计的 Vortex 中断装置<sup>[2]</sup>, 但此装置较为复杂, 国内尚无生产。为了使同学掌握本实验的工作原理, 我们探索了化学中断法, 利用萘啶酮酸对 *E. coli* 染色体转移有一定抑制作用, 以此代替中断机应用于中断杂交。我们在对萘啶酮酸中断杂交的最适浓度, 中断方法和中断效果做了初步实验的基础上, 提出了适用于微生物遗传教学的简便易行的萘啶酮酸 (Nalidixic acid) 中断杂交基因定位方法。

### (一) 原理

研究表明 *E. coli* K<sub>12</sub> 细菌杂交的过程是: ① Hfr 与 F<sup>-</sup> 接合必须通过细胞间直接接触的途径, 两者在合适的条件下迅速配对接合; ② 接合过程中 Hfr 染色体上的基因从原点开始定向地有顺序地进入 F<sup>-</sup>; ③ 离原点近的基因早进入 F<sup>-</sup>, 离原点远的基因晚进入 F<sup>-</sup>。根据基因转移的先后顺序可以得到一个以时间为单位的 *E. coli* 染色体基因定位图。在标准条件下, 37℃ *E. coli* 的整个染色体向 F<sup>-</sup> 转移需要 90 (或 100) 分钟。所以, 将 *E. coli* 染色体基因定位图全长定为 90 或 100 分钟。中断杂交法作基因定位的基本原理与自然转移梯度基因定位法相同, 不同之处在于后者以重组子频率确定基因顺序, 精确度不如中断杂交法。

本实验采用对链霉素敏感的高频重组细菌 (Hfr) 为供体菌, 对链霉素抗性的 F<sup>-</sup> 为受体菌。取对数生长期 (10<sup>8</sup>/ml) 的供体菌细胞与受体菌细胞按 1:20 混合, 在 37℃ 恒温下进行

接合。在接合的不同时间取样, 用 30μg/ml 萘啶酮酸中断杂交, 按鉴定的基因标记接种于各选择培养基上, 37℃ 培养 48—72 小时, 检出各基因标记的重组子, 以出现重组子的时间定出各基因标记的顺序与位置。

### (二) 菌株<sup>[1,3,4]</sup>

大肠杆菌菌株:

供体菌-1: HfrC met, try (由上海复旦大学提供)。

供体菌-2: CSH60 (AS1.1070) Hfr, sup (中国科学院微生物研究所提供)。

受体菌-1: W1177 F<sup>-</sup> thr, leu, thi, xyl, gal, ara, mtl, mal, lac, Str'(λ) (上海复旦大学提供)。

受体菌-2: CSH57B (FD1004) F<sup>-</sup> ara, leu, lacY, purE, gal, trp, his, argG, malA, strA, xyl, ilv, mtl, metA, thi, rif, tsx (中国科学院微生物研究所提供)。

### (三) 培养基<sup>[3,4]</sup>

1. 完全培养基: 肉汤培养基或 LB 培养基。

2. 基本培养基: Voge 培养基简称 V 培养基。10×A 培养基简称 A 培养基。

3. 半固体培养基: 含 30μg/ml 萘啶酮酸, 0.8% 琼脂的 V 基本培养基或 10×A 基本培养基。配制成 3 毫升一管。

4. 各鉴定基因标记的选择培养基见表 1、表 2。

### (四) 仪器药品

1. 常用的玻璃仪器: 培养皿 (9 厘米); 三

此实验曾得到盛祖嘉教授和王文华副教授的指导。

角瓶(100、150、200 毫升); 吸管 (0.1, 0.5, 1, 5, 10 毫升); 离心管 (10 毫升); 试管 (20 × 200 毫米, 15 × 150 毫米); 量筒等。

表 1 HfrC × W1177 中断杂交各鉴定标记及其选择培养基

编 号	鉴定标记	染色体上位置*	HfrC 向 F <sup>-</sup> 转移参入时间	选择培养基			
				碳 源	在 V 基本培养基上补充物质		
					Str	thr	leu
V-A	leu	1'	14'	葡萄糖	+	+	-
V-B	thr	0'	15'	葡萄糖	+	-	+
V-C	met	71'	34'	甘露醇	+	+	+
V-D	mal	66'	43'	麦芽糖	+	+	+

*E. coli* 染色体标准遗传图谱 (100 分计)

- 37°C 和 45°C 恒温水浴各一个, 37°C 湿箱。
- 链霉素及有关氨基酸等药品。

4. 萘啶酮酸液: 用 pH7.2 缓冲液配制萘啶酮酸液 100 μg/ml。

### (五) 方法与步骤

1. 分别将活化了的供体菌 HfrC、CSH60 和受体菌 W1177、CSH57B 接种于 5ml LB 液体培养基(或肉汤液)中, 37°C 培养过夜, 按 1:2 转接于新鲜的 LB 液(或肉汤液)中, 继续培养 2—3 小时, 达对数生长期, 细胞浓度 10<sup>8</sup>/ml 左右。

2. 分别取对数生长期的供体菌 HfrC 和受体菌 W1177, 供体菌 CSH60 和受体菌 CSH57B, 按 1:20 混合于已在 37°C 预热的无菌三角瓶中, 置 37°C 恒温水浴中轻轻摇动几分钟, 使其充分接合。

3. 从接合开始 0'、5'、10'、20'、30'(或 35')、40'(或 45')、60'、90' 的不同时间将上述混合液各吸 0.1 毫升, 直接加入预先熔化并保温于

表 2 CSH60 × CSH57B 中断杂交各鉴定标记及其选择培养基

编 号	鉴定标记	染色体上位置*	CSH 60 向 F <sup>-</sup> 转移参入时间	选择培养基								
				碳 源	在 A 基本培养基上补充物质							
					str	arg	ilv	met	leu	ade	trp	his
A-A	metA	78	3'	葡萄糖	+	+	+	-	+	+	+	+
A-B	leu	1'	13'	葡萄糖	+	+	+	+	-	+	+	+
A-C	lac	10	21'	乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+
A-D	trp	25'	36'	葡萄糖	+	+	+	+	+	+	-	+

\* *E. coli* 染色体标准遗传图谱 (100 分计)

45°C 恒温水浴中含萘啶酮酸的 3ml 半固体培养基中, 中断作用 1 分钟, 立即倒入各种选择培养基平板上, 每种重复三皿, 37°C 培养 48—72 小时。

4. 观察接合不同时间中断杂交的细胞混合液在各选择培养基上出现的菌落数, 记录结果。

以按上面相同的方法、但不作中断处理的实验作为对照组, 记录结果。

### (六) 结果与讨论

1. HfrC 与 W1177 杂交选择: HfrC 和 W1177 的细胞混合物于 0'、5'、10'、20'、35'、45'、60'、90' 时取样中断接合, 并涂布在选择培养基 V-A, V-B, V-C, V-D 上, 培养 48—72

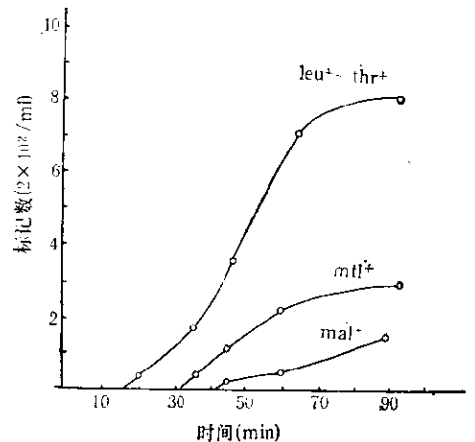


图 1 HfrC × W1177 萘啶酮酸 (30 μg/ml) 中断杂交基因定位

小时,记录  $leu^+$ 、 $thr^+$ 、 $mtl^+$ 、 $mal^+$  四个基因的重组子出现的时间与菌落的数目(图 1)。非中断处理的对照实验组四个基因重组子数目见图 2。

(1) 由图 1 看出,  $Leu^+ - thr^+$  最早出现于 20 分钟时, 35 分才是  $mtl^+$ ,  $mal^+$  最后于 45 分得到, 基因顺序为  $leu^+ \rightarrow thr^+ \rightarrow mtl^+ \rightarrow mal^+$ , 相应位置为 14-15 分左右, 30-35 分及 40-45 分间, 在染色体上实际位置是  $0'-1'$ ,  $68'-72'$ ,  $63'-67'$ 。

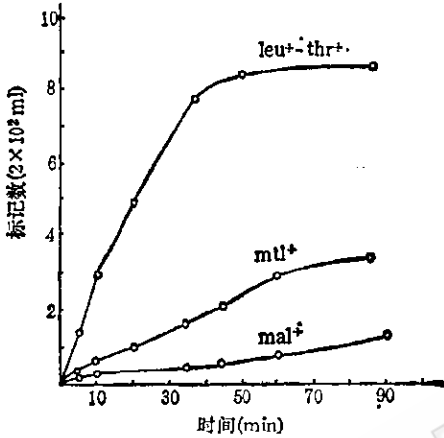


图 2 HfrC × W1177 自然转移基因定位

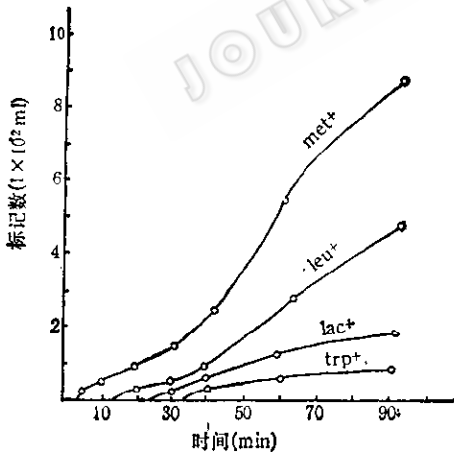


图 3 CSH60 × CSH57B 萘啶酮酸 (30 μg/ml) 中断杂交基因定位

(2) 由图 2 看出, 非中断处理的对照实验中自然转移出现的四个基因重组子数目, 随着接合时间增长, 数目增多, 但总的规律是,

$leu^+ - thr^+ > mtl^+ > mal^+$ 。与中断处理比较可以看出, 接合 90 分钟后同一种基因的重组子数目, 两者都十分接近,  $leu^+ - thr^+$  分别为  $15 \times 10^2/ml$  和  $18 \times 10^2/ml$ ,  $mtl^+$  为  $6 \times 10^2/ml$  和  $5 \times 10^2/ml$ ,  $mal^+$  为  $3.0 \times 10^2/ml$  和  $3.5 \times 10^2/ml$ 。所确定的基因顺序也是  $leu^+ \rightarrow thr^+ \rightarrow mtl^+ \rightarrow mal^+$ 。

2. CSH60 Hfr 与 CSH57B<sup>-</sup> 杂交选择: 按上法接合, 于 0', 5', 10', 20', 30', 40', 60', 90' 时取样中断, 涂布于选择培养基 A-A、A-B、A-C、A-D, 培养 48-72 小时, 记录  $metA^+$ 、 $leu^+$ 、 $lac^+$ 、 $trp^+$  四个基因重组子出现的时间与菌落数目, 结果见图 3。非中断处理对照实验组基因重组子数目见图 4。

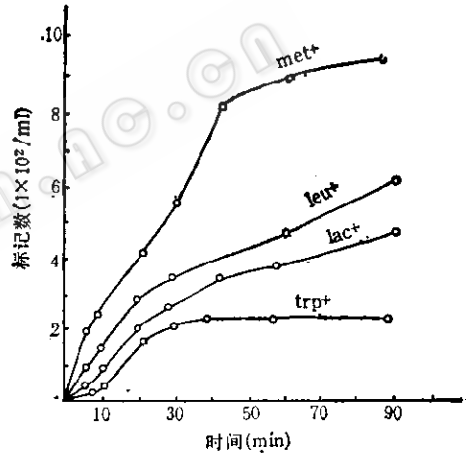


图 4 CSH60 × CSH57B 自然转移基因定位

(1) 由图 3 看出,  $metA^+$  最早出现于 5 分, 20 分是  $leu^+$ , 30 分才是  $lac^+$ ,  $trp^+$  最后出现于 40 分。基因顺序为  $metA^+ \rightarrow leu^+ \rightarrow lac^+ \rightarrow trp^+$ , 相应位置分别为  $0'-5'$ ,  $10'-15'$ ,  $20'-25'$ ,  $35'-40'$ , 在染色体上实际位置是  $76'-80'$ ,  $89'-3'$ ,  $9'-14'$ ,  $24-28'$ 。

(2) 由图 4 看出, 与萘啶酮酸中断相比较, 非中断处理的对照实验在现象与规律上与 HfrC 与 W1177 杂交的中断(图 1)与非中断实验(图 2)比较结果基本一致。

以上两对菌株的中断杂交与非中断杂交的比较实验结果说明: (1) 一定浓度的萘啶酮酸

按照本实验方法进行中断杂交，既可确定 *E. coli* 基因顺序，也可以进行基因定位，有可能确定相隔 2—3 分钟以上的基因位置。(2) 利用中断实验确定的基因顺序与从非中断自然转移得到的基因重组子数目所确定的基因顺序完全相同。(3) 接合 90 分后，萘啶酮酸中断处理和非中断自然转移所得的各个基因重组子频率相差不大。这说明，本实验中断杂交中所用的萘啶酮酸浓度并不影响选择培养基上重组子的形成。

以上实验结果表明：采用一定浓度的萘啶酮酸中断杂交进行 *E. coli* 基因顺序测定与基

因定位是简便而有效的，以此作为微生物遗传学实验教学内容，使同学掌握 *E. coli* 中断杂交工作原理也是可行的。

### 参 考 文 献

- [1] Miller, J. H.: *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, P. 86—92, P. 460, 1972.
- [2] Low, B. and T. M. Wood: *Genet. Res.*, **6**: 300—303, 1965.
- [3] 刘祖洞, 江绍慧: 遗传学实验, 人民教育出版社, P. 31, P. 35—36, 1979.
- [4] 盛祖嘉, 陈中孚: 微生物遗传学实验, 高等教育出版社, P. 55, P. 58—59, 1982.