

大肠杆菌噬菌体 T₄ DNA 连接酶基因 (G30) 无性繁殖系的建成和鉴定

陆德如 王雪松 陈锦光

(中国科学院微生物研究所, 北京)

通过限制性内切酶 EcoRI 或 Hind III 部分降解 T₄ 含胞嘧啶 DNA, 并把它们连接到运载体 pBR 322 上, 转化大肠杆菌 KH 802, 获得了 5000 余株 T₄ 基因无性繁殖系。用标记援救的遗传学试验, 从中筛选出 2 株带有 T₄ 基因 30 片段的无性繁殖系, 其中 pAM 3158 带有比较完整的基因 30。琼脂糖凝胶电泳表明该菌株中的杂合质粒 DNA 分子量比 pBR 322 的大, 并且经 Hind III 降解后可见一条新带。

大肠杆菌噬菌体 T₄ DNA 连接酶基因 (G 30) 是 T₄ 发育过程中的早期基因, 它所编码的 DNA 连接酶在 DNA 复制, 修复中有重要作用。在体外它能使不同 DNA 片段重新连接起来, 或构成杂合 DNA 分子, 是研究遗传工程的重要工具酶。所以, 获得其无性繁殖系在理论研究和应用上都有一定意义。

关于 T₄ 基因的无性繁殖研究 Velten^[1]、Mattson^[2] 和 Wilson^[3] 等分别用 pMB9、pCR1 和噬菌体 λ 为运载体与 T₄ am 56⁻-42⁻-denA⁻-donB⁻ 突变体合成的含胞嘧啶 DNA 进行体外 DNA 重组, 获得了大量的基因无性繁殖系。

但关于完整的基因 30 无性繁殖系还未见过报道。我们进行了这方面工作, 并获得了两株该基因的无性繁殖系。在相近时期 Krisch 也得到了比较完整的基因 30 无性繁殖系*。

材料和方法

(一) 菌种和噬菌体

以下菌种和噬菌体均由瑞士日内瓦大学分子生物学系 R. Epstein 教授赠送。

大肠杆菌: KH802 ($met^- r_{km}^+ Su_{H}^+$),

CR₆₃ (Su^+), S/6 (Su^-), B^E (Su^-)。

噬菌体: T₄ am 56⁻-42⁻-denA⁻-denB⁻, T₄ am H⁺ 39 (基因 30 突变体), T₄ am E 605 (基因 30 突变体), T₄ am C 104 (基因突变体)。

(二) 质粒

pBR322 由 H. Boyer 赠送。

(三) 限制性内切酶和 DNA 连接酶

限制性内切酶 EcoRI, Hind III 和 T₄ DNA 连接酶来自美国 Miles 公司。

(四) 方法

DNA 提取, 体外 DNA 重组, 标记援救试验 (Marker rescue test) 均按 Mattson 等人的方法^[1]。

实验结果和讨论

(一) 限制性内切酶部分降解 T₄ 含胞嘧啶 DNA

野生型 T₄ DNA 含羟甲基胞嘧啶, 限制性内切酶对它不能作用或作用甚微, 为此我们采用从 T₄ am 56⁻-42⁻-denA⁻-denB⁻ 突变体中提取的 DNA。该 DNA 中胞嘧啶代替了羟甲基胞嘧啶, 若干限制性内切酶

本文于 1979 年 5 月 7 日收到。

本工作曾得到瑞士日内瓦大学分子生物学系 R. Epstein 教授, T. Mattson, A. Bolle, H. Krisch, G. Selzer 等博士的菌种和宝贵建议。本所王放全、门大鹏同志对本文提出宝贵意见, 特此致谢。

* 1978 年个人通信。

对它都能作用,例如 EcoRI 和 Hind III 对它都有 60 个左右的作用位点,有些位点还分布在某些基因内部。为了在 DNA 体外重组过程中避免 T₄ 基因被这些酶破坏,我们试验了内切酶部分降解法降解 T₄ 含胞嘧啶 DNA。图版 I-1 表示经 EcoRI 不同时间降解后的 DNA 电泳图谱,从图可见降解 20 分钟可产生较大的 DNA 片段,所以在以下实验中我们采用的降解条件是: 1 微克 T₄ 含胞嘧啶 DNA,加 1 单位限制性内切酶,在反应缓冲溶液中,37℃ 作用 20 分钟。

(二) T₄ 基因无性繁殖系的建成

为了建成各种 T₄ 基因的无性繁殖系,以供筛选我们所需要的基因 30 无性繁殖系。按上述条件用 EcoRI 或 Hind III 部分降解 T₄ 含胞嘧啶 DNA,完全降解运载体 pBR 322 的 DNA,然后以 1 份运载体 DNA 3 份 T₄ DNA 的比例混合,并加入 T₄ DNA 连接酶,在 12℃ 水浴保温 18 小时,然后将此连接过的 DNA 转化大肠杆菌 KH 802,在氨基苄青霉素 LB 琼脂平皿上选择抗氨基苄青霉素的转化子。用 EcoRI 降解 DNA 构成的杂合质粒转化,得到了 2500 余株转化子;用 Hind III 降解 DNA 获得的杂合质粒,转化得到了 3000 余株。这些转化子包含有各种 T₄ 基因杂合质粒,也有少量不包含 T₄ DNA 的运载体 pBR 322。

(三) 基因 30 无性繁殖系的筛选

用标记援救试验从转化子中筛选基因 30 无性繁殖系。由于 T₄ 基因 30 琥珀型 (amber) 突变体感染抑制突变体 (Su⁻) 细菌 S/6 时,在营养琼脂平皿上不能形成溶菌斑,但当加入带有野生型基因 30 的无性繁殖系细胞时,由于该细胞中杂合质粒的 T₄ 野生型基因 30,能与噬菌体突变体中相对应的突变基因重组,产生野生型噬菌体,因而能在上述混有 S/6 细胞的营养琼

脂平皿上形成溶菌斑,因此用此方法可快速地从大量的转化子中挑选出基因 30 无性繁殖系。该方法也可用于其它 T₄ 基因无性繁殖系的筛选。我们从所得到的转化子中选到了两株能使基因 30 突变体在混有 s/6 细胞的营养琼脂平皿上形成溶菌斑的菌株,并定名为 pAM 1680 (由 EcoRI 降解 DNA 得到)和 pAM 3158 (由 Hind III 降解 DNA 得到)。然后用已知突变位置(这些突变体的突变位置见图 1)的基因 30 突

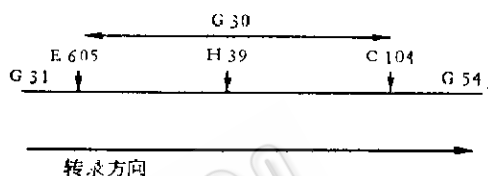


图 1 基因 30 突变体的突变位置
E605、H39、C104 分别为 G30 突变体的名称。

变体进行标记援救试验,测定这两个无性繁殖系所带 T₄ 基因 30 的长度,结果 pAM 1680 只能使突变体 H39 形成溶菌斑,而 pAM 3158 能使所有三个突变体 E605、H39、C104 都形成溶菌斑,所以 pAM 1680 仅带有基因 30 的部分片段,而 pAM 3158 带有完整的基因 30。

(四) 杂合质粒的电泳图谱

为了进一步证实该无性繁殖系的质粒确实插入了外来 DNA,我们提取了 pAM 3158 的质粒 DNA,用内切酶 Hind III 降解了该 DNA,并用琼脂糖凝胶电泳作了检查,结果如图版 I-2 所示,由此图说明 pAM 3158 质粒 DNA 的分子量比 pBR 322 显著增大,它被内切酶降解后在电泳图谱中可看到两条带,一条带相当于线状 pBR 322 DNA,另一条分子量较小的是插入的 T₄ 基因 30 的 DNA。

上述结果说明,我们所建成的 pAM 3158 是一个包含有完整 T₄ 基因 30 的无性繁殖系。

参 考 文 献

- [1] Velten, G. et al.: *Gene*, 1:93—106, 1976.
- [2] Mattson, T. et al.: *Molec. Gen. Genet.*, 154: 203—214, 1977.
- [3] Wilson, G. G. et al.: *Molec. Gen. Genet.*, 154: 319—326, 1977.

THE CONSTRUCTION AND IDENTIFICATION OF CLONES OF BACTERIOPHAGE T₄ DNA LIGASE GENE (G30) FRAGMENTS

Lu De-ru Wang Xue-song Chen Jing-guang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Over 5,000 clones of bacteriophage T₄ genes had been constructed by EcoRI or Hind III partial digestion, then ligation to pBR322 and transformation of *E. coli* KH802. Using marker rescue test, two clones which contain T₄ G 30 fragments were obtained, one of them (pAM3158)

presumably carrying complete G 30 fragment. It has been shown by agarose gel electrophoresis that the molecular weight of hybrid plasmid (pAM3158) is higher than that of pBR322 and after digestion by Hind III a clear new band appeared.