

λ 拟操纵基因的克隆

张 其 玖

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

以 *Hind*III 和 *Eco*RI 双重酶解 pDG51 质粒 DNA 制备了 29 个硷基对 DNA 片段。该 DNA 片段含有 17 个硷基对 λ 拟操纵基因 (pseudooperator), 其一端为 *Hind*III 接头, 另一端为 *Eco*RI 接头。29 个硷基对片段与 pBR325 质粒连接、转化、筛选获得克隆 pQH100 (Ap^rTc^rCm^r)。pQH100DNA 分别以 *Hind*III, *Eco*RI 单独酶解或双重酶解, 经凝胶电泳分析, 其结果表明, pQH100DNA 含有两个 λ 拟操纵基因, 这两个 DNA 片段在 *Hind*III 位点上, 以头对头的方式相连。

关键词 拟操纵基因; 克隆

蛋白质分子与基因的 DNA 控制区相互作用关系的研究是基因调控研究中的一个重要课题。调节蛋白与操纵基因相互作用关系的体外研究是阐明问题的一个有用的模型。但需要较大量的 DNA 材料, DNA 体外重组技术为大量制备人们感兴趣的 DNA 片段提供了可能性。

Kawashima 等^[1]用化学和酶促方法合成了 29 个硷基对 DNA 片段, 该片段含有双重对称轴的 17 个硷基对 λ 拟操纵基因, 其一端为 *Hind* III 接点, 另一端为 *Eco*RI 接头。他把 29 个硷基对片段克隆到 pBR313 质粒上, 获得了带有单拷贝 λ 拟操纵基因的 pDG51 质粒。本工作的出发点在于组建一个含有多拷贝 λ 拟操纵基因的质粒。由 pDG51 质粒制备了 λ 拟操纵基因 DNA 片段, 并把它克隆到 pBR325 质粒上, 经筛选、鉴定获得了含有两个 λ 拟操纵基因的 pQH100 质粒。

材 料 与 方 法

(一) 菌株、质粒和酶

E. coli HB101 为转化受体菌。载体质粒有 pBR325 和 pMB9。pDG51 质粒由 Kawashima 博士惠赠^[1]。限制酶 *Eco*RI 和 T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs, *Hind*III 购自 Boehringer-

Mannheim, 大肠杆菌硷性磷酸单酯酶购自 Worthington 公司, 乳糖操纵基因 36 个硷基对 DNA 片段为 Harry Nick 惠赠^[2]。

(二) 质粒 DNA 的制备

为了制备 pBR325 DNA, 将带有该质粒的大肠杆菌 HB101 接种在改良的 M9 液体培养基中。扩增质粒时, 当菌体生长到达对数生长期时, 在培养基中加入壮观霉素 (trobicin) 37℃ 振荡培养 14 小时。菌体用溶菌酶/EDTA/Brij-58 处理, 65℃ 半小时后, 离心, 在上清液中加入固体 NaCl 和聚乙二醇 6000 (PEG6000), 浓度分别为 0.55M 和 6% (W/V), 在 4℃ 搅拌过夜。离心, 将质粒沉淀物悬浮在 10mM Tris-HCl-1mMEDTA (pH7.5) 溶液中。最后, 经 Biogel A-50 柱过滤, 除去 RNA, 即可得到纯净的 DNA。

为了筛选重组质粒, 我们采用了 Birnboim 和 Doly 的方法^[3]。

(三) λ 拟操纵基因的制备

首先, 用 *Hind*III 酶切 pDG51 质粒 DNA, 二者比例为 1 单位酶: 2μg 质粒 DNA, 37℃ 保温两小时, 然后, 按上述比例加入 *Eco*RI, 继续保温两小时, 其它均参考 New England Biolabs 给定的条件。最后, 在酶解反应液中直接加入 NaCl 和 PEG6000, 浓度分别为 0.55M 和 6% (W/V), 37℃

本文于 1984 年 3 月 7 日收到。

本项工作是作者在美国宾夕法尼亚大学化学系 Ponzy Lu 教授指导下完成的。Harry Nick 在具体工作中给予协助并参加讨论, 特此致谢。

保温过夜。离心除去质粒 DNA 沉淀,在上清液中加入二倍体积 95% 的乙醇, -20°C 下放置过夜,每分钟 10,000 转离心半小时, DNA 沉淀物悬浮在少量电泳缓冲液中,在 10% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,按 Maxam-Gilbert 方法^[5]由胶中回收 DNA 片段。

(四) 连接反应

在 20 μl 连接酶反应液中(66mM Tris-HCl(pH 7.6), 6.6 mM MgCl_2 , 10 mM DTT 和 0.5 mM ATP), 加入 2pmol λ 拟操纵基因 DNA 片段和 0.015pmol *EcoRI* 酶切处理的 pBR325 DNA(130:1)和 0.1 单位 T4DNA 连接酶, 5°C 过夜。

(五) 转化

按 Cohen 等人方法^[6]。

(六) 重组质粒 DNA 的筛选和鉴定

采用插入钝化的方法,挑选 $\text{Ap}^r\text{Tc}^r\text{Cm}^r$ 克隆。按 Doly 等人方法^[4],制备克隆 DNA,继以 *EcoRI* 37°C 酶切处理两小时后,在 10% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离,鉴定插入的 DNA 片段。为了进一步确定插入片段,将克隆 DNA 以 *HindIII* 和 *EcoRI* 作双重酶解,进行凝胶电泳。

结果和讨论

(一) $\text{Ap}^r\text{Tc}^r\text{Cm}^r$ 克隆的筛选

当连接反应 λ 拟操纵基因 DNA 片段与 pBR325 的克分子比为 130 时, $\text{Ap}^r\text{Tc}^r\text{Cm}^r$ 克隆约占 Tc^r 菌落总数的 25%, 当克分子比大于 130, $\text{Ap}^r\text{Tc}^r\text{Cm}^r$ 克隆不再增加。为了得到多拷贝 λ 拟操纵基因克隆,曾以 λ 拟操纵基因片段与 T4DNA 连接酶单独反应,使它自身聚合成多聚体,然后,加入 *EcoRI* 酶切处理过的 pBR325,并补加适量的 T4DNA 连接酶,再次进行连接反应,但是,没有发现含有 λ 拟操纵基因多聚体的克隆。然而 pBR325 DNA 经 *EcoRI* 酶切后,继以硷性磷酸单酯酶处理,与 λ 拟操纵基因片段连接,经转化可以获得高达 75% 的 $\text{Ap}^r\text{Tc}^r\text{Cm}^r$ 克隆。若以 pMB9 代替 pBR325 作为载体质粒,以上述

同样处理,可得到类似的结果。

(二) 克隆 DNA 插入片段的鉴定

利用插入钝化的方法,获得了很多 $\text{Ap}^r\text{Tc}^r\text{Cm}^r$ 克隆,随机取其中若干株,对其插入片段进行分析鉴定。将其菌体以快速硷抽提法制备克隆 DNA,经 *EcoRI* 酶解,在 10% 的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离。电泳图谱表明,大部分 $\text{Ap}^r\text{Tc}^r\text{Cm}^r$ 克隆均含有 58 个硷基对 DNA 片段(如图 1 所示)。



图 1 *EcoRI* 酶切克隆 DNA($\text{Ap}^r\text{Tc}^r\text{Cm}^r$) 的聚丙烯酰胺电泳图

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis of digested clone DNA ($\text{Ap}^r\text{Tc}^r\text{Cm}^r$) with *EcoRI*. 5% 聚丙烯酰胺凝胶,电泳缓冲液 (89mM Tris, 89 mM 硼酸和 2mM EDTA, pH 8.2), 85mA, 160 V 电泳 90 分钟

1. 乳糖操纵基因的 DNA 片段 (36 个硷基对);
2—7. *EcoRI* 酶切克隆 DNA

5% polyacrylamide gel electrophoresis in 89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA (pH 8.2), 85mA, 160V, 90min

1. Fragment of lactose operator (36 base pairs);
2—7. Digestions of some clone DNAs with *EcoRI*.

为了进一步确定插入 DNA 片段是否为 λ 拟操纵基因,将 HB101(pQH100)接在 M9 培养基中, 37°C 振荡培养,待 $A_{660\text{nm}}$ 达

到 1.0 时,加入 170 μ g/ml 氯霉素。然后按纯化 pBR325DNA 的方法,制备 pQH100 DNA。其 DNA 以 *Hind*III 和 *Eco*RI 作单独酶解或双重酶解,在凝胶电泳上观察所产生的 DNA 片段区带。如图 2 所示, pQH100DNA 经 *Eco*RI 完全酶解,产生一个较大的 DNA 片段的区带;若以 *Hind*III 和 *Eco*RI 双重酶解,则产生一个较小的 DNA 片段区带,如果不完全的双重酶解,则出现两个相应的 DNA 片段区带。同样,将 pQH100 DNA 分别以 *Hind* III 和

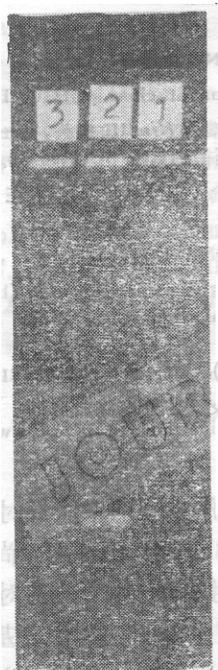


图 2 pQH100 DNA 的酶解电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of pQH100 DNA, digested by restriction endonucleases.

10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,其它条件同图 1。

1. *Eco*RI 酶切的 pQH100DNA
 2. *Hind*III 和 *Eco*RI 完全酶解的 pQH 100 DNA
 3. *Hind*III 和 *Eco*RI 部分酶解的 pQH 100 DNA
- 10% polyacrylamide gel electrophoresis, other conditions were the same as the legend of Fig. 1
1. Digestion of pQH100 DNA with *Eco*RI,
 2. Complete digestion of pQH100 DNA with *Hind*III and *Eco*RI,
 3. Partial digestion of pQH100 DNA with *Hind*III and *Eco*RI.

*Eco*RI 单独酶解,在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,结果表明, *Hind*III 酶切产生一个较大的 (约 1000 多碱基对) DNA 片段(图 3),显然, 29 个碱基对 DNA 片段克隆到 pBR325 DNA 的 *Eco*RI 位点上时,这两个相同的片段是在 *Hind*III 位点上以头对头的方式相接,如图 4 所示,由于 pBR325 DNA 上原来就有一个 *Hind*III 的切点,所以 pQH

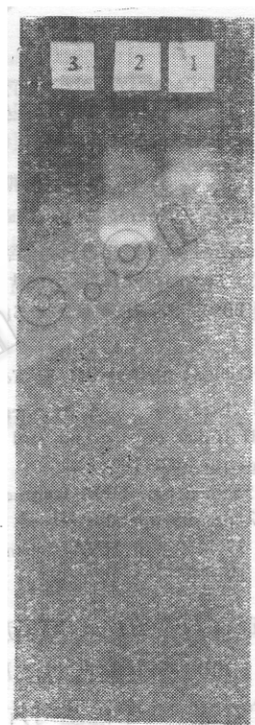


图 3 pQH100DNA 酶解电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of digestion pQH 100 DNA

两端带有 *Hind*III 接头的片段。

1.2% 琼脂糖凝胶电泳,电泳缓冲液为 40mM Tris, 20mM NaAc 和 2mM EDTA (pH8.2), 90mA, 70V 电泳 3 小时。

1. 对照, pQH100DNA
2. 经 *Hind*III 酶切处理的 pQH 100DNA
3. 经 *Eco*RI 酶切处理的 pQH100DNA

The fragment with *Hind*III linkers on both ends
1.2% agarose gel electrophoresis in 40mM Tris, 20mM NaAc, 2mM EDTA (pH8.2), at 90mA, 70 volts for 3 h.

1. Control, pQH100 DNA
2. Digestion of pQH100 DNA with *Hind*III
3. Digestion of pQH100 DNA with *Eco*RI

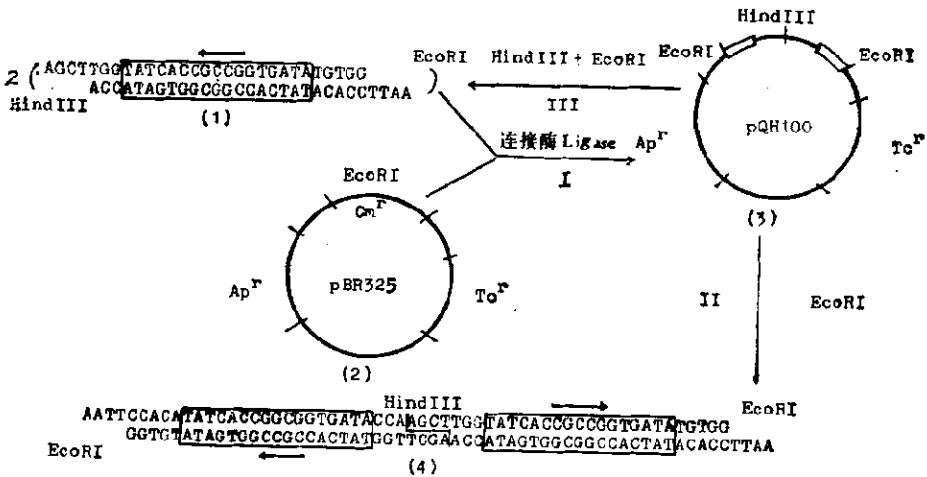


图 4 λ 拟操纵基因的克隆和克隆 pQH100DNA 的酶解

Fig. 4 Cloning of the lambda pseudo-operator and digestion of clone pQH100 DNA

- I. 29 个碱基对 DNA 片段(1), (含有 17 个碱基对 λ 拟操纵基因, 其一端为 *Hind*III 接头, 另一端为 *Eco*RI 接头), 被连接到 *Eco*RI 酶切处理过的 pBR325 上(2), 从而得到克隆 pQH100(3)。
- II. pQH100 经 *Eco*RI 酶解产生 58 个碱基对 DNA 片段(4), 它含两个 λ 拟操纵基因, 二者在 *Hind*III 位点上以相反的方向连接在一起。
- III. pQH100(3) 经 *Hind*III 和 *Eco*RI 双重酶解产生 29 个碱基对 DNA 片段(1)。
1. The 29 base pair DNA fragment (1), containing the 17 base pair λ pseudo-operator (boxed) with *Hind*III linker on one end and *Eco*RI linker on the other end was ligated to *Eco*RI cut-pBR325 (2), giving pQH100(3).
- II. The 58 base pair DNA fragment(4) was produced by digestion of pQH100 with *Eco*RI. It contains two λ pseudo-operator joined at the *Hind*III site in opposing orientation.
- III. The 29 base pair DNA fragment(1) was produced by double digestions of pQH100 with *Hind*III and *Eco*RI.

100DNA 则有两个 *Hind* III 切点, 这两个切点相距 1000 多个碱基对。*Eco*RI 酶切 pQH100 产生的 58 个碱基对片段, 在琼脂糖凝胶电泳上已出胶外, 所以未显示。

此外, 我们在鉴定克隆株时, 发现少数克隆 DNA, 以 *Eco*RI 作部分酶切处理时, 在凝胶电泳图谱上出现多个 DNA 片段的区带, 不过, 这些 DNA 区带呈非典型的梯形, 其中最大的片段为 λ 拟操纵基因 DNA 片段的 14 倍 (电泳图略)。但若以 *Eco*RI 作完全酶解, 除产生 58 个碱基对的二聚体区带外, 尚有两个大于二聚体和一个小于二聚体的 DNA 区带。如果以 *Hind* III 作完全酶解, 除产生一个二聚体的区带外, 尚有一个小于二聚体的区带。以 *Hind*III

和 *Eco*RI 作完全双重酶解时, 除产生 29 个碱基对的 DNA 区带外, 尚有两个大于 29 个碱基对小于 58 个碱基对的 DNA 区带。这些结果说明, 29 个碱基对的二聚体若以多聚体形式插入质粒 DNA 时 (不论是 pBR325 还是 pMB9), 转化进入细胞后, 均发生了一定修饰, 即 DNA 的核苷酸序列发生了某些改变。

我们已经采用 pQH100 质粒, 大量制备了 λ 拟操纵基因, 用于 DNA 与 λ 噬菌体 *Cro* 阻抑蛋白相互作用关系的研究^[7]。

参 考 文 献

- [1] Kawashima, E. et al.: *Biochemistry*, 16: 4209—4217. 1977.

- [2] Sadler, J. R. et al.: *Gene*, 8: 279—300, 1980.
- [3] Bolivar, F.: *Gene*, 4: 121—136, 1978.
- [4] Birnboim, H. C. and J. Doly *Nucleic Acids Research*, 7: 1513—1523, 1979.
- [5] Maxam, A. M. and W. Gilbert: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 347—353, 1977.
- [6] Cohen, S. N. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2110—2114, 1972.
- [7] Boschelli, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, 162: 251—266, 1982.

CLONING OF LAMBDA PSEUDO-OPERATOR

Zhang Qijin

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)

A 29 base pair fragment carrying the 17 base pair λ pseudo-operator, flanked on one end by *Hind* III linker and *Eco*RI linker on another end, was prepared by digestion of pDG51 DNA with *Hind*III and *Eco*RI. The fragment was ligated to *Eco*RI-cut pBR325, subsequently transformed into *E. coli* HB101 cells, and clone pQH100 (Ap^r Tc^r Cm^r) was obtained.

pQH100 DNA was digested with restriction nucleases *Eco*RI and *Hind*III, then was analyzed by gel electrophoresis. The results indicated that pQH100 DNA contains two pseudo-operator fragments joined head to head at the *Hind*III.

Key words

Pseudo-operator; Cloning