

枯草芽孢杆菌基因片段的琼脂糖凝胶电泳分离

1. 色氨酸 C 基因片段的分离

门大鹏 郭三堆 贾士芳 陈乃用 郭兴华

(中国科学院微生物研究所, 北京)

限制性核酸内切酶 *EcoRI* 酶切枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) SR 22 的 DNA, 用琼脂糖凝胶电泳分离了色氨酸 C 基因 (*trpC*) 的片段, 位于凝胶柱的 10—11 厘米处。冷冻挤压回收该段的 DNA, 荧光分光光度计直接测定回收液中 DNA 的含量。电泳后比电泳前 *trpC* 转化活性提高了 37.7 倍。这一段 DNA 的平均分子量为 5.1×10^6 , *trpC* 片段的纯度为 9.3%。

基因片段的分离有多种方法, 比较简单的方法是, 用限制性核酸内切酶切脱氧核糖核酸 (DNA), 然后进行琼脂糖凝胶电泳, 把分子量大小不等的 DNA 片段分开, 回收 DNA, 可得到部份浓缩的特定基因片段。Harris-Warrick^[1] 分离了枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 *trpC*、*trpA*、*metB5*、*hisA* 和 *ura-1* 基因, Dean 等人^[2] 分离了枯草芽孢杆菌的 *leuC* 和 *trpC*。Рабинович 等人,^[3] 分离了枯草芽孢杆菌的核黄素操纵子。我们试图用这种方法分离枯草芽孢杆菌的氨基酸、淀粉酶等基因片段, 为基因克隆提供特定的基因片段。本文报告用琼脂糖凝胶电泳分离枯草芽孢杆菌 SR 22 *trpC* 基因片段, 测定了它在凝胶柱中的位置、转化活性及平均分子量, 建立了分离基因片段的方法。

材料和方法

菌株 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) SR 22 (*trpC*⁺ $\Delta z'$) 作给体, BR151-1 (*trpC*、*met*、*lys*、*amy*) 作受体, 均为 J. Spizizen 教授赠送。

电泳仪 1. 垂直柱式凝胶装置, 参照 Lee^[4] 的设计作了一些变动。柱长 27 厘米, 内径 1.5 厘

米, 凝胶长 25 厘米。本所工厂制作。

2. 水平平板电泳装置, 参照 Kaplan 的设计^[5] 作了一些变动。板长 40 厘米, 内径宽 10 厘米。本所工厂制作。

琼脂糖凝胶 上海试剂二厂出品。

限制性核酸内切酶 *EcoRI* 本所工厂制备。

链霉菌蛋白酶 上海东风试剂厂出品。

小牛胸腺 DNA 中国科学院上海细胞生物学研究所赠送。

DNA 的提取 基本上采用 Saito^[6] 的苯酚法。为了除去更多的蛋白质, 在细胞裂解后, 加入链霉菌蛋白酶 (10 毫克/毫升)。提取的 DNA 在冰箱中透析两天, 用三羟甲基氨基甲烷—乙二胺四乙酸钠 (Tris-Na₂ EDTA) 液保存。DNA 含量用改良的二苯胺法^[7] 测定。分装后置冰箱备用。

DNA 的酶切 取 80 微克/500 微升 DNA, 加 10×1 的反应液 (1 M Tris-HCl, pH 7.5; 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) 80 微升, 无离子水 100 微升, *EcoRI* 120 微升, 于 37°C 水浴中反应 45 分钟 (DNA 已充分酶切)。取出反应液, 立即置于 65°C 水浴中 10 分钟, 终止反应。取出, 室温下冷却。

琼脂糖凝胶电泳 琼脂糖凝胶 0.8%。三羟甲基氨基甲烷—硼酸缓冲液, pH 8.3。预备试验时, 凝

本文于 1980 年 2 月 6 日收到。

胶中加溴化乙锭 (E.B.), 制备时则不加。电泳时的电压为 160 伏, 电流为 18 毫安。在低温室中进行。当溴酚蓝迁移至凝胶柱 1 厘米处, 约 18 个小时, 停止电泳。

DNA 的回收和测定 参照 Thruing^[1] 的冷冻挤压法, 并作了改进。将电泳后的凝胶柱从顶部起, 切成 1 厘米长的小段, 再切成四瓣, 以免凝胶中的 DNA 受到过多的剪切。凝胶段分别置于灭菌平皿中, 在 -10℃ 冰箱中冷冻, 冻透后取出, 置室温下让其自融。用灭菌镊子把凝胶块放入灭菌的注射器中, 底部垫有一块灭菌的丝布, 缓缓用力挤压, 挤出液注入灭菌的指形管中, 冰箱保存备用。

根据 DNA 与 E.B. 结合后, 其荧光强度与含量有关的原理, DNA 回收液的含量用 WFO-9 型荧光分光光度计 (中国科学院生物物理所制) 测定^[1]。工作条件: 发射波长 600 毫微米, 狭缝 5 毫微米; 激发波长 500 毫微米, 狭缝 6 毫微米; 量程 1。用小牛胸腺 DNA 配制标准样品。每毫升标准样品和待测样品中含有: 10 微克/10 微升的 E. B., 0.1 毫升的 0.1 M NaCl。先测出标准样品的峰值, 作出标准曲线。待测样品的含量根据其峰值大小, 从标准曲线中查出。

转化 按 Anagnostopulos 和 Spizizen 方法进行^[1]。

结果与讨论

(一) *EcoRI* 酶切对 *trpC* 基因转化活性的影响

按方法中所述条件, *EcoRI* 分别酶切 SR 22 DNA 0、15、30、45、60、90 和 105 分钟后, 对 BR-151-1 进行转化, 结果如图 1。*EcoRI* 酶切 DNA 后, 对 *trpC* 基因的转化活性影响较大, 酶切 15 分钟, 转化 DNA 的 *trpC* 活性明显下降, 与对照相比, 其残存转化活性 (Remaining transforming activity) 为 10%。再延长酶切时间, 其残存转化活性变化不大。*trpC* 基因经 *EcoRI* 酶切后, 对不同遗传背景的菌株转化时, 其残存转化活性从 6.2% 到 47%^[2]。图 1 的结果可能是受体菌株遗传背景的关系, 残存转

化活性不高。

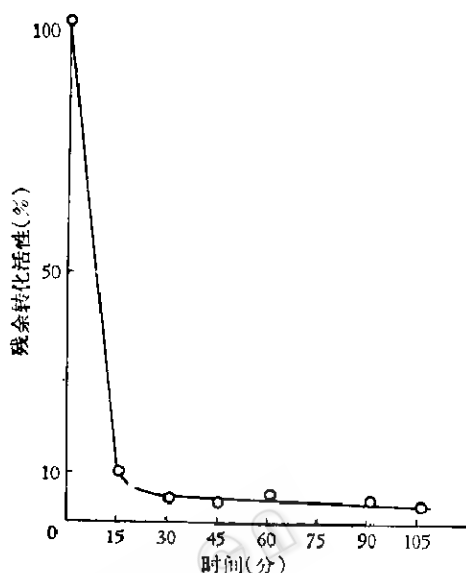


图 1 *EcoRI* 酶切 SR 22 DNA 后 *trpC* 基因的残存转化活性

(二) 回收的 DNA 含量测定

冷冻挤压回收的 DNA 溶液用紫外分光光度计测定时, 不含 DNA 带的凝胶回收液峰值高于缓冲液的峰值, 而且峰值的大小不等。根据标准样品紫外测定的峰值计算, DNA 的回收率约为 50%。用荧光分光光度计测定时, 不含 DNA 带的凝胶回收液峰值, 均与缓冲液的峰值相同, DNA 的回收率为 16.5%。比较这两种测定方法, 可能是回收液中含有吸收紫外光的物质, 用紫外分光光度计测定时受到了干扰。用荧光分光光度计测定时由于发射波长是 600 毫微米, 排除了吸收紫外光物质的干扰。我们还比较了改良的二苯胺法与荧光分光光度计法, 两种方法同时测定一个样品, 前者为 90 微克/毫升, 后者为 80 微克/毫升, 结果很相近。用荧光分光光度计直接测定冷冻挤压回收的 DNA 溶液, 可不用同位素标记样品来测定含量, 也不

1) 中国科学院生物物理所曹恩华同志协助测定, 特此致谢。

用回收液加酒精后于 -20°C 冰箱中沉淀 DNA, 小容量高速离心机收集后测定含量, 是一种简便、灵敏和准确的方法。

Thruing 报道用冷冻挤压法, DNA 的回收率约 70%, 而我们得到的回收率只有 16.5%。这很可能是回收方法和测定方法的不同。

(三) *trpC* 基因片段在凝胶柱中位置的测定

1. 快速法: 按 Dean 的快速点滴试验法^[3], 将分段回收的 DNA 顺序滴加到涂有受体菌的基本培养基上, 同时在基本培

养基上只加受体菌或 DNA 回收液, 作为对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养。发现第 11 段 (10—11 厘米) 的 DNA 回收液处有大的菌落出现, 第 10 段和第 12 段处也有小的菌落出现。初步确定 *trpC* 基因片段主要在第 11 段 (图版 I-1)

2. 转化法

在快速测定法的基础上, 用转化法进一步确定 *trpC* 基因片段在凝胶中的位置和转化活性。结果见表 1。在提取 DNA 时, 由于机械力的剪切, 把大片段的 DNA 随机地剪切成小的片段, 酶切时 DNA 又受

表 1 转化法测定 *trpC* 基因片段的位置和转化活性

处 理	受体菌(毫升)	DNA (微克/毫升)	SH 液(毫升)	转化子数/ 微克 DNA
对照 (1)	0.2	—	—	—
对照 (2)	—	0.09/0.5	—	—
未酶切的 DNA	0.2	2/0.1	1.7	4750
酶切的 DNA	0.2	2/0.1	1.7	1425
第 10 段 DNA 回收液	0.2	0.09/0.5	1.3	55
第 11 段 DNA 回收液	0.2	0.09/0.5	1.3	53777
第 12 段 DNA 回收液	0.2	0.09/0.5	1.3	16

到 *EcoRI* 的切割。这样含有 *trpC* 基因的片段, 其大小并非完全一样, 而是分子量大小不等的片段。其中在一定分子量范围内的 *trpC* 基因片段, 电泳后富集于凝胶柱的一定位置, 而在相邻的位置相对地要少得多。所以除第 11 段 (10—11 厘米) 有大量 *trpC* 基因的转化子外, 相邻的凝胶也有少量转化子出现。由于该试验所用 *EcoRI* 的批号不同, 在与图 1 比较残存活性时出现了差异。

(四) 第 11 段 DNA 分子量的测定

未酶切的 λ DNA 和 SR 22 DNA (作为对照) 及 *EcoRI* 酶切的 λ DNA 和 SR 22 DNA, 分别加在水平平板电泳槽内, 电泳图谱见图版 I-2。按 Helling^[10] 测定 *EcoRI* 酶切 λ DNA 后各个片段的分子量, 对迁移率作图, 从图中查出第 11 段 (10—11 厘米) DNA 的分子量为 $4.1\text{—}6.1 \times 10^6$ 平均分子量为 5.1×10^6 。

将表 1 中的数据和第 11 段的平均分

表 2 *trpC* 基因片段的富集系数和纯度*

平均分子量 (道尔顿)	染色体分子 量 ^[11] (道尔顿)	转化子数/微克 DNA		富集系数	理论富 集系数	纯度 (%)
		电泳前	电泳后			
5.1×10^6	2×10^9	1425	53777	37.7	392	9.6

* 富集系数 = $\frac{\text{转化子数/微克 DNA (电泳后)}}{\text{转化子数/微克 DNA (电泳前)}}$; 理论富集系数 = $\frac{\text{染色体分子量}}{\text{平均分子量}}$ 纯度 = $\frac{\text{富集系数}}{\text{理论富集系数}}$

子量, 按 Harris-Warrick^[1] 的计算方法, 计算出 *trpC* 基因片段的富集系数、理论富集系数和纯度, 汇总于表 2。从表 2 可以看出, SR 22 DNA 经 *EcoRI* 酶切、电泳后, *trpC* 基因片段富集了 37.7 倍, 第 11 段的 DNA 回收液中该片段占 9.6%。

通过上述试验, 我们初步建立了适合于我们实验室条件的原核生物基因分离的方法。

参 考 文 献

- [1] Harris-Warrick, R. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 72: 2207—2211, 1975.
- [2] Dean, D. H. et al.: *Microbiology-1976*, edited by Schlessinger, D., Wash., D. C.:

- American Society Microbiology, pp. 380—387, 1976.
- [3] Рабинович, П. М., и др. *ДАН СССР* 233: 1459—1461, 1978.
- [4] Lee, A. M. & R. L. Sinshelmer: *Anal. Biochem.*, 60: 640—644, 1974.
- [5] Kaplan, D. A. et al.: *Anal. Biochem.*, 78: 235—243, 1977.
- [6] Saito, H. & K. Miure: *Biochem. Biophys. Acta*, 72: 618—629, 1965.
- [7] Richards, G. M.: *Anal. Biochem.*, 57: 369—376, 1974.
- [8] Thruing, R. M. et al.: *Anal. Biochem.*, 66: 213—220, 1975.
- [9] Ana gnostopoulos, G. & J. Spizizen: *J. Bacterio.*, 81: 741—746, 1961.
- [10] Helling, R. B. et al.: *J. Virol.*, 14: 1235—1244, 1974.
- [11] Klotz, L. C. & H. B. Zimm: *J. Mol. Biol.*, 72: 779—800, 1972.

ISOLATION OF GENE FRAGMENTS OF *BACILLUS SUBTILIS* SR 22 DNA BY AGAROSE-GEL ELECTROPHORESIS

I. ISOLATION OF *TRP C* GENE FRAGMENT

Men Dapeng Guo Saidui Jia Shifang Chen Naiyong Guo Xinghua

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The restriction endonuclease *EcoRI* digested DNA fragments of *Bacillus subtilis* SR 22 (*trpC*⁺ *Az*^r) was separated by agarosegel electrophoresis. It was found that *trpC* gene fragment was located in the 11th section of the gel column by using rapid spot assay and transformation test. DNA in this section was recovered by freeze-squeeze method, and its DNA con-

tent was directly determined by fluorescent spectrophotometer. The enrichment factor, i.e. the ratio of *trpC* transforming activity of *EcoRI* cleaved DNA after and before electrophoresis was found to be 37.7. The molecular weight of DNA in this section was 5.1×10^6 . The purity of *trpC* gene fragment preparation was 9.6%.