

## 两类新型 DNA 质粒 pSC1 和 pSC2 的分离与观察

蔡金科 刘玉方 张博润

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文报道从一株啤酒酵母 E4-2A 分离到两类脱氧核糖核酸质粒 pSC1 与 pSC2。经琼脂糖凝胶电泳分离质粒 DNA 分子, 证明这两类质粒的分子量不同于已知的酵母 2 $\mu$ m DNA 质粒。

电泳分析指出这两类新型核外 DNA 质粒的长度为  $0.91 \pm 0.12 \mu\text{m}$  (pSC1) 和  $0.48 \pm 0.10 \mu\text{m}$  (pSC2), 经计算分子量分别相当于  $1.9 \times 10^6$  和  $1.0 \times 10^6$ 。pSC1 由共价闭环和开环两种构型组成, 而 pSC2 仅有开环型。

酵母菌是较低等真核生物, 但具有高等生物的基本特征。真核生物的基因结构和遗传信息的传递与原核生物有明显差异。因此有人认为真核基因在酵母细胞中易于表达<sup>[1]</sup>。目前国外许多实验室正在广泛开展酵母菌分子遗传研究<sup>[2-4]</sup>, 并把酵母质粒加以改造作为外源基因的运载体应用于生产外源基因的产物<sup>[5,6]</sup>。

啤酒酵母质粒是 Sinclair 等人<sup>[7]</sup>于 1967 年发现的。到 1972 年才被分离纯化, 确定为核外遗传因子, 平均长度为 2  $\mu\text{m}$ , 为共价闭环 DNA 分子<sup>[8]</sup>。随后对它的分子构型, 复制以及全序列分析等研究都取得很大进展<sup>[9-11]</sup>。

至今, 在啤酒酵母细胞中仅发现一种 DNA 质粒, 即 2  $\mu\text{m}$  DNA 质粒。我们在一株啤酒酵母 E4-2A 细胞中发现存在着另外两类分子量很小的新型 DNA 质粒。这将对构成新的运载体, 转化酵母细胞, 研究外源基因在酵母细胞中的表达, 以及育种会有重大意义。

### 材料和方法

#### (一) 实验菌株

啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) E4-2A。系我组保藏菌株。

#### (二) 培养基

1. YEPD 斜面培养基: 供保藏和常规培养用, 其组成为(%): 酵母膏 1, 蛋白胨 2, 葡萄糖 2, 琼脂 2。

2. YEPD 液体培养基: 供培养酵母收集细胞用。其组成为(%): 酵母膏 1.5 (上海酵母厂), 蛋白胨 2 (日本 Polypepton), 葡萄糖 6。

#### (三) 质粒 DNA 提取

用改进的 Cryer<sup>[12]</sup> 和 Smith<sup>[13]</sup> 等人的方法。

取培养物一环接于液体种子培养基中 (500 ml 三角瓶装 50 ml YEPD 液体培养基), 30 $^{\circ}\text{C}$  培养 24 小时, 取 5% 量接种于液体培养基 (500 ml 三角瓶装 95 ml 培养基), 30 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 16 小时, 离心收集菌体, 蒸馏水洗一次后, 再用 0.05 M EDTA (pH 7.5) 洗两次, 离心、压干、称重。按每克湿重菌体加入 2ml 0.1 M Tris-HCl (pH 9.3), 0.2 ml 0.5 M EDTA (pH 9.0) 和 0.05 ml 巯基乙醇, 混合均匀, 室温放置 15 分钟后离心收集细胞, 将细胞沉淀物悬浮于山梨醇-EDTA 缓冲液中 (1 M 山梨醇, 0.1 M EDTA, 10 mM 柠檬酸磷酸盐缓冲液, pH 5.8), 加入蜗牛酶 (本组自制), 终浓度为 1.2% (W/V), 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴振荡保温 1.5 小时, 使其大部分细胞脱壁成原生质球, 离心收集原生质球, 用山梨醇-EDTA 缓冲液洗三次, 将原生质球悬浮于 0.5 M EDTA (pH 9.0) 中, 用国产 JC-2 型超声破碎器在冰浴条件下进行破碎处理, 每处

本文于 1982 年 2 月 24 日收到。

本所电镜室和中国科学院生物物理研究所电镜室摄制电镜照片, 中国科学院地理研究所同志协助测定质粒 DNA 分子长度在此一并致谢。

理 1 分钟间隔停止 1 分钟,共处理 5 分钟,然后置于 60℃ 恒温水浴保温 10 分钟,冷却到室温后,慢慢加入 5M 高氯酸钠溶液,使终浓度为 1M。离心、取上清液,加入等体积氯仿-异戊醇(24:1V/V)溶液,摇动 5 分钟,离心取水相,再用氯仿-异戊醇处理,反复几次,待无明显蛋白层为止。最后取水相,缓缓加入二倍体积的冷乙醇,25,000 转/分(东德 VAC 601)离心 1 小时,沉淀溶于 0.1 × SSC,加入 10 × SSC,使终浓度为 SSC。然后加入经预处理的核糖核酸酶液,终浓度为 0.1 mg/ml,37℃ 保温 30 分钟,再加入经预处理的蛋白酶 E,终浓度为 1 mg/ml,37℃ 保温 3 小时,然后经 60℃ 保温 30 分钟,冷却到室温。在搅拌条件下,慢慢加入固体 NaCl,使其终浓度为 1M,4℃ 过夜,溶液以 12,000 转/分离心 10 分钟,上清液再用等体积氯仿-异戊醇处理二次,吸取水相,缓缓加入二倍体积冷乙醇,以 25,000 转/分(VAC601)离心 1 小时,沉淀溶于 TE (10mM Tris-HCl 1mM EDTA pH8.0) 缓冲液中,即为粗制质粒 DNA 溶液。再经琼脂糖(上海东海制药厂)凝胶电泳纯化,即得到纯化的质粒 DNA。

#### (四) 琼脂糖凝胶电泳

参照 Mattson<sup>[14]</sup> 等人方法进行。

#### (五) 质粒 DNA 纯化

将垂直平板琼脂糖凝胶电泳质粒带切下,按文献[15]方法进行纯化。

#### (六) 电泳质粒 DNA 样品的制备

参照 Davis<sup>[16]</sup> 等人方法进行。利用国产 DM-300 型真空镀膜机旋转投影,样品与钨钨合金蒸发源之间投影角度为 7°,旋转台转速为 90 转/分,制片后用 H-500 型(日立)和 JEM-11 A(日本电子)电镜观察并摄片。

#### (七) 质粒 DNA 分子的长度与分子量测定

取不同放大倍数的电镜底片,制成正片,然后用图型数字化器(JTS 86,西安仪表厂)转换成数字,通过电子计算机计算分子长度,求其平均值与标准误差,按经验公式计算出质粒 DNA 的分子量<sup>[17]</sup>。

## 结果与讨论

### (一) 琼脂糖凝胶电泳制备、纯化质粒 DNA

按上述方法提取酵母质粒 DNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,在凝胶板上出现两条 DNA 带,电镜观察证明上带是由线性 DNA 分子组成的染色体带;下带为两类大小环状质粒带。经 1% 琼脂糖凝胶电泳纯化后的质粒 DNA 分子,再经琼脂糖凝胶电泳,这时质粒 DNA 分子出现均一的一条带,没有染色体 DNA 片段(见图 1)。



图 1 酵母质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of yeast plasmid DNA

1. 经纯化的质粒 DNA 带。 2. 质粒 DNA 的粗制品上带为染色体 DNA, 下带为质粒 DNA。 3. 纯化后的染色体 DNA。

电泳条件: 琼脂糖浓度 1%, 3.5V/cm, 室温, 4 小时, 缓冲液为 TES 醋酸系统。

Purified plasmid DNA(1), crude extract of plasmid DNA(2) and purified chromosomal DNA (3).

Electrophoresis was performed on 1.0% agarose gel. TES-acetate buffer (pH 8.0) was used throughout. Gels were run with bromophenol blue as tracking dye at 3.5V/cm for 4 h at room temperature and stained with EtBr.

本实验由于采用琼脂糖凝胶电泳进行质粒 DNA 纯化,加上所用的电泳系统限制,电泳结果仅分离到一条质粒带,而未能将两个质粒 DNA 明显分开,可能由于 pSC 1 和 pSC 2 的分子量相差近 1 倍, pSC 1

DNA 分子呈闭合超螺旋构型, 而 pSC2 DNA 分子可能由于空间构型的影响只有开环构型, 在电镜观察中也从未见到 pSC2 质粒 DNA 分子存在有闭合超螺旋构型, 这样在电泳过程中两者的迁移率几乎相等, 从而形成重合带<sup>[18]</sup>。因此为把这两类酵母 DNA 质粒分开, 必需采取其它途径进一步纯化。

## (二) E4-2A 质粒 DNA 分子的电镜观察和分子量测定

酵母质粒 DNA 分子采用蛋白单分子层法制片, 电镜观察并摄片(图版 I)。

在电镜观察中大部分 pSC1 质粒为共价闭合超螺旋构型, 仅有少数为开环状构型。pSC2 质粒 DNA 分子仅出现开环状构型。

通过图形数字化器和电子计算机计算 207 个质粒 DNA 分子的长度, 可将其分为两群, 一群即为平均周长  $0.91 \mu\text{m}$ , 另一群平均周长为  $0.48 \mu\text{m}$ 。通过统计法求得两个质粒 DNA 分子的平均长度及标准误差分别为  $0.91 \pm 0.12 \mu\text{m}$  和  $0.48 \pm 0.10 \mu\text{m}$ 。根据经验公式计算其分子量分别为  $1.9 \times 10^6$  和  $1.0 \times 10^6$ 。

近来有人报道从啤酒酵母分离到  $3 \mu\text{m}$  环状 DNA 分子, 但后来证明它是一种核外核蛋白体 DNA 的环状结构<sup>[19]</sup>。其它酵母如意大利酵母 (*Saccharomyces italicus*) 和粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 也含有  $2 \mu\text{m}$  环状 DNA 分子, 而乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 则含有线性 DNA 分子, 这些与我们所得的结果

一起都说明不同种属酵母菌质粒的多样性值得进一步研究, 它可能为基因工程研究提供更多的运载体。

## 参 考 文 献

- [1] Newmark, P.: *Nature*, **290**: 77, 1981.
- [2] 蔡金科等: 微生物学通报, **2**: 75—80, 1981.
- [3] Guerinneau, M. *Viruses and Plasmids in Fungi*, Lemke, P. A. (Ed.), Marcel Dekker INC. New York and Basel, 1979, pp. 539—593.
- [4] 大嶋泰治: 发酵と工业, **39**: 14—22, 1981.
- [5] Dickson, D.: *Nature*, **290**: 77, 1981.
- [6] Valenzuela, P. et al.: *Nature*, **298**: 347—350, 1982.
- [7] Sinclair, J. M.: *Science*, **156**: 1234—1237, 1967.
- [8] Clark-Walker, G. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **69**: 388—392, 1972.
- [9] Gubbins, E. J. et al.: *Gene*, **1**: 185—207, 1977.
- [10] Livingston, D. H. and S. Haken.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**: 3727—3731, 1979.
- [11] Hartley, J. L. and J. E. Donelson.: *Nature*, **286**: 860—865, 1980.
- [12] Cryer, D. R. et al.: *Methods in Cell Biology*, XII, Prescott, D. M. (Ed.), Academic Press, New York, 1975, pp. 39—44.
- [13] Smith, D. and H. O. Halvorson.: *Methods in Enzymology*, XII, Grossman, L. (Ed.), Academic Press, New York and London, 1967, pp. 538—541.
- [14] Mattson, T. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **154**: 203—214, 1977.
- [15] 郭三堆等: 遗传, **3**(2): 37—39, 1981.
- [16] Davis, R. W. et al.: *Methods in Enzymology*, XXI, Grossman, L. (Ed.), Academic Press, New York and London, 1971, pp. 413—428.
- [17] Lang, D.: *J. Mol. Biol.*, **54**: 557, 1970.
- [18] Bedbrook, J. R., and F. M. Ausubel.: *Cell*, **9**: 707—716, 1976.
- [19] Larionov, V. L., et al.: *Gene*, **12**: 41—49, 1980.

## ISOLATION OF TWO NEW PLASMIDS pSC1 AND pSC2 AND THEIR OBSERVATION

Cai Jinke Liu Yufang Zhang Borun

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Two circular DNA plasmids, designated as pSC1 and pSC2, were isolated from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* E4-2A. It was shown that these two plasmids have different molecular weights from the well known  $2\mu\text{m}$  DNA plasmid in yeast through agarose gel electrophoresis.

Electron microscopic observation show

that two extrachromal DNA plasmids have contour lengths of  $0.91 \pm 0.12\mu\text{m}$  (pSC1) and  $0.48 \pm 0.10\mu\text{m}$  (pSC2) which correspond to molecular weights of  $1.9 \times 10^6$  and  $1.0 \times 10^6$ , respectively. The pSC1 consists of covalently closed circular form and open circular form, but the pSC2 has only open circular form.