

杨扇舟蛾颗粒体病毒 (*Clostera anachoreta* *Granulosis Virus*, CaGV) DNA的 *EcoRI* 酶切的部分片段的分子克隆

李雁春 刘远程 赵必维 张珈敏 吴柏华

(武汉大学病毒学系, 武昌)

pUC 系列质粒^[1]是最近组建的质粒, 其优点是: 1. 具有人工引入的多种限制性内切酶切割位点, 称为多克隆位点 (Multiple Cloning Site, MCS); 2. 插入外源 DNA 后破坏 *LacZ* 基因的 α -互补, 故在 Xgal-IPTG-Ap 平板上一次即可挑选转化子; 3. pUC8 和 pUC9 以及 pUC12 和 pUC13 在 MCS 中具有方向相反的一对酶切位点, 便于采用 Sanger 的链终止法从 DNA 片段的两端同时进行序列测定。

本实验利用 pUC12 质粒克隆杨扇舟蛾颗粒体病毒 (CaGV) DNA 的 *EcoRI* 酶解的部分片段, 为研究病毒基因组的结构和功能以及 DNA 序列测定作准备。

材料和方法

(一) 菌种和病毒 DNA

质粒 pUC 12 供体菌 JM83 [*ara*, Δ *lac-pro*, *strA*, *thi*, ϕ 80*dlacZ* Δ M15, (pUC12)]; 受体菌 JM83 [*ara*, Δ *lac-pro*, *strA*, *thi*, ϕ 80*dlacZ* Δ M15] 均来源于 Messing 实验室。CaGV DNA 由本系提供。

(二) 培养基

按照 Miller^[2] 方法制备 YT 及 EMB 培养基。

(三) 质粒 DNA 的制备

参照 Holmes^[3] 的快速煮沸法。若用于连接反应则质粒 DNA 进一步用酚抽提纯化。

(四) DNA 的限制性内切酶酶解

参照 BRL 公司^[4] 的酶解条件于 37℃ 酶解 2 小时。加入占总体积 1/10 的 10 倍酶解终止液 (50% 甘油, 0.05% 溴酚兰, 0.1mM EDTA) 终止反应。

(五) DNA 的电泳

参照 Helling 等^[5] 的方法。

(六) 从电泳凝胶中洗脱 CaGV DNA *EcoRI* 酶切片段

参照 Thuring 等^[6] 的“冻融法” (Freeze-Squeeze Method)。

(七) DNA 的连接

将 CaGV DNA 小于和等于 pUC12 DNA 的 *EcoRI* 酶切片段从凝胶中分离后, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 与 pUC12/*EcoRI* 线性分子于 15℃ 反应两小时, 形成重组质粒。

(八) 转化和转化子的筛选

取 5 μ l 连接物与 200 μ l 经 CaCl₂ 处理的 JM83 细胞^[7]混合, 冰浴 20 分钟后, 于 42℃ 水浴保温 90 秒, 再置于冰浴。将细胞用 10 倍体积的 YT 培养基稀释, 37℃ 培养 45 分钟后, 铺 EMB-Ap (100 μ g/ml) 平板 (0.2ml/皿)。37℃ 培养过夜, 挑取白色单菌落。

结果和讨论

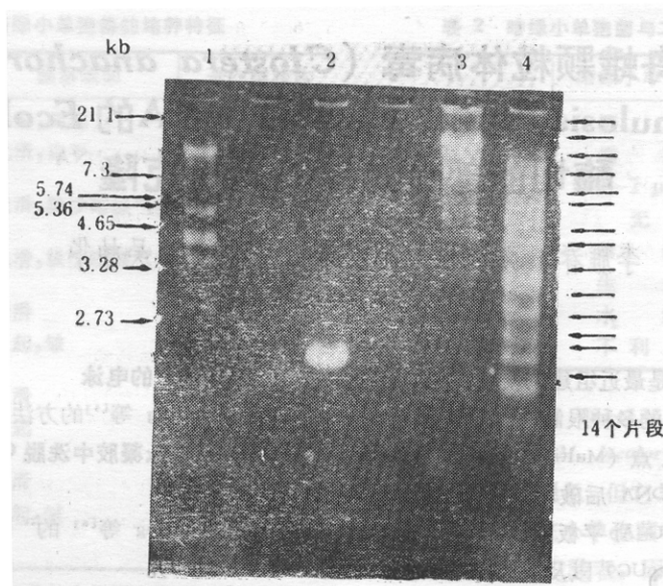
(一) 菌种特性

菌种的 Ap 抗性和乳糖发酵实验结果表明: 供体菌 JM83 (pUC12) 既抗 Ap, 又发酵乳糖, 菌落呈紫红色; 而受体菌 JM83 既对 Ap 敏感, 又不发酵乳糖, 菌落呈白色。

(二) CaGV DNA 的 *EcoRI* 酶切

CaGV DNA 于 37℃ 经 *EcoRI* 酶解两小时后, 电泳分析知: *EcoRI* 将 CaGV DNA 切成 14 个片段, 其中小于和等于 pUC12 DNA 的有四个片段 (图 1)。

本文于 1983 年 10 月 10 日收到。

图1 CaGV DNA/*EcoRI* 酶切电泳图谱

1. λ DNA/*EcoRI*,
2. pUC12DNA/*EcoRI*,
3. CaGVDNA/*EcoRI* (部分酶解),
4. CaGVDNA/*EcoRI* (完全酶解, 共切成 14 片段)。

(三) 转化和筛选

取经连接反应物转化过的 JM83 细胞铺 EMB-Ap 平板, 发现大部分菌落可发酵乳糖 (Lac^+ Ap^r), 呈紫红色; 但有少数白色菌落, 即为重组质粒形成的 Lac^- Ap^r 转化子。由于外源 DNA 片段的插入破坏了 α -互补, 而在 EMB-Ap 平板上出现白色菌落, 与供体菌原有紫红色菌落有明显区别, 故证明 EMB-Ap 平板也可用于 pUC 重组质粒的筛选。

(四) 重组质粒的酶切和电泳分析

1. 将从白色菌落制备的质粒 DNA 进行电泳, 结果为质粒 DNA 的典型图谱 (图 2, 图 3), 以 λ DNA/*EcoRI* 片段为标准, 作图求得重组质粒约为 6.4 kb。

2. 将重组质粒分别用 *Bam*HI, *Sal*I, *Pst*I 切割并电泳, 得到大小分别约为 5.2 kb、4.6 kb、4.2 kb 的线性分子 (用作图法求得), 都小于 6.4 kb 的重组质粒线性分子 (图 3)。pUC12 DNA 的 MSC 序列中有 *Eco*RI, *Bam*HI, *Sal*I, *Pst*I 等 12 种酶的识别序列。上述实验结果表明: 重组质粒中的 CaGV DNA 片段上也有 *Bam*HI, *Sal*I 和 *Pst*I 的识别序列, 它分别被这三种酶切去了一部分。这些被切去的片段都较小, 电泳结束时可能都已出

胶外。

3. 将重组质粒用 *Eco*RI 切割, 电泳分析表明, 重组质粒被切成了两片段, 一条与 pUC12 DNA/*Eco*RI 带平行, 为 pUC12 线性分子 (图 4, 5), 另一条带处于 pUC12 DNA/*Eco*RI 带之前, 且在 CaGV DNA/*Eco*RI 图谱中有对应 DNA 带 (图 4, 5), 故此

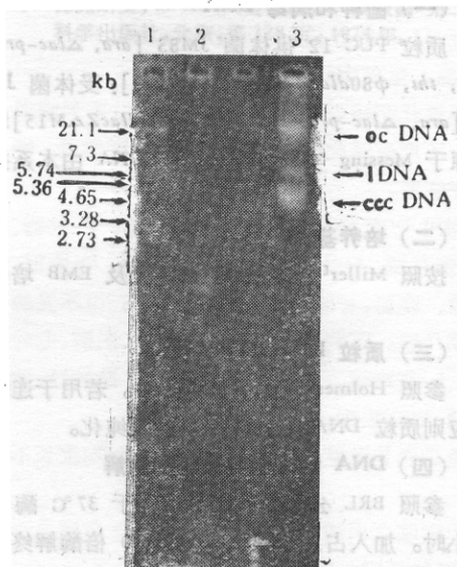


图2 重组质粒 DNA 电泳图谱

1. λ DNA/*EcoRI*
2. pUC12DNA
3. RecDNA

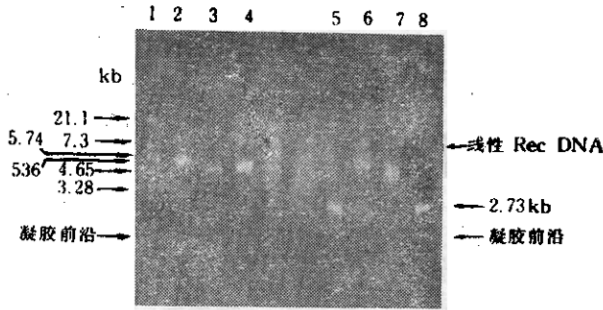


图 3 重组质粒 DNA *SalI*, *PstI*, *BamHI* 酶切电泳图

1. λ DNA/*EcoRI* 2. RecDNA/*BamHI* 3. RecDNA/*PstI*
4. RecDNA/*SalI* 5,8. pUC12DNA/*EcoRI* 6,7. RecDNA

片段为 CaGV DNA/*EcoRI* 片段, 其分子量小于 pUC12 DNA。由于 *EcoRI* 将重组质粒切成两种不同的片段, 故排除了 pUC12 自身环化的可能。但重组质粒约为 6.4kb (图 2), pUC12 DNA 为 2.73kb, 则所克隆的 CaGV DNA 片段应为 3.7 kb, 这与 CaGV DNA 片段小于 pUC12 DNA 这

一事实相矛盾(图 4,5)。然而, 我们认为, 重组质粒中的外源 DNA 为两个相同的 CaGV DNA/*EcoRI* 片段的二聚体, 即它们一端相接而另一端分别与 pUC12DNA 连接, 推测此 CaGV DNA/*EcoRI* 片段为 1.85kb 左右。



图 4 重组质粒 DNA *EcoRI* 酶切电泳图谱

1. RecDNA
2. pUC12DNA/*EcoRI*
3. RecDNA/*EcoRI*

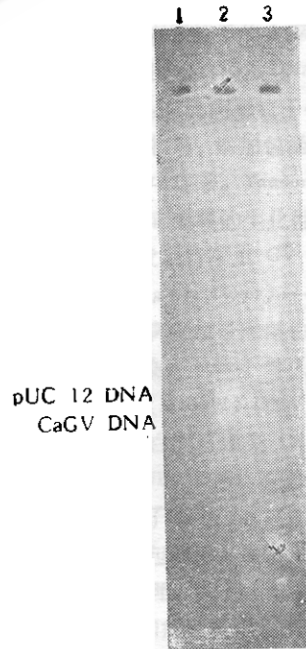


图 5 重组质粒 DNA *EcoRI* 酶切电泳图谱

1. pUC12DNA/*EcoRI*
2. Rec DNA/*EcoRI*
3. CaGV DNA/*EcoRI*

参 考 文 献

- [1] Vieira, J. and J. Messing: *Gene*, **19**: 259—268, 1982.
- [2] Miller, J. H.: *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbour Laboratory, 1977.
- [3] Holmes, D. S. and M. Quigley: *Analytical Biochemistry*, **114**: 193—197, 1981.
- [4] Bethesda Research Laboratories. *Inc. Catalog*, 1980.
- [5] Helling, R. B. et al.: *J. Virology*, **14**: 1235—1244, 1974.
- [6] Thuring, R. W. J. et al.: *Analytical Biochemistry*, **66**: 213—220, 1975.
- [7] Cohen, S. N. et al.: *PNAS U.S.A.*, **69**: 2110—2114, 1972.