

具有分泌功能的大肠杆菌穿梭质粒 (p[#]GTE5) 的限制酶图谱

陈月仙 袁宏琛* 决肯阿努瓦什**

(北京大学生物学系, 北京)

将地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 749/C 染色体上的 β -内酰胺酶基因克隆于 *E. coli* 质粒 (pMB9) 上, 该质粒经 *EcoRI* 重排方法进行分子量消减获得了具有氨苄青霉素抗性 (Ampicillin resistance, 简称 Ap^r) 的质粒 (pCHT3 Ap^r), 以相同的方法处理枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的质粒 (pUB110) 获得了具有卡那霉素抗性 (Kanamycin resistance, 简称 Km^r) 的质粒 (pCHG19 Km^r)^[1]。将 pCHT3 和 pCHG19 拼接获得了穿梭质粒 (p[#]GTE5 Ap^rKm^r), 且已确定了抗性标记位点和复制起点 (Ori) 的位置^[1-3]。按文献[6]获得分泌型穿梭质粒 (p[#]GTE5), 为指导外源基因的插入和表达, 本实验建立了该质粒的限制酶图谱。

材料和方法

(一) 菌株和培养条件

E. coli RR1 (p[#]GTE5 Ap^rKm^r) 菌株接种在含 Ap (20 μ g/ml) 的 LB 液体或固体培养基中, 37°C 培养过夜。

(二) 质粒 DNA 的分离和纯化

按文献[4]进行, 略有改进。

(三) 质粒 DNA 的限制酶消化

其消化条件参照文献[4, 5], 一般 1 μ g DNA 加 5—10u 限制酶, 适宜温度下消化 1—17h, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离酶解片段, 电泳缓冲液为 Tris-醋酸。

(四) 限制片段的分子量测定

以 *sppl* DNA 的 *EcoRI* 15 条限制片段的分子量为标准^[5, 7]。

结果和讨论

(一) 单酶完全消化

质粒 (p[#]GTE5) DNA 分别用 *EcoRI*, *BglIII*, *PstI* 进行单酶完全消化后, 各产生两条电泳带。用 *PvuII* 和 *TaqI* 进行单酶完全消化后各产生四条电泳带 (图 1)。



图 1 质粒 (p[#]GTE5) DNA 用单酶完全消化得到的限制片段的凝胶电泳图

A. 质粒 (p[#]GTE5) DNA; B. *SspI* DNA 被 *EcoRI* 消化的限制片段; C. *EcoRI* 消化; D. *BglIII* 消化; E. *PstI* 消化; F. *PvuII* 消化; G. *TaqI* 消化。

本文于 1987 年 7 月 23 日收到。

* 1987 年北京大学生物学系遗传专业毕业生。

** 新疆八一农学院畜牧系教师。

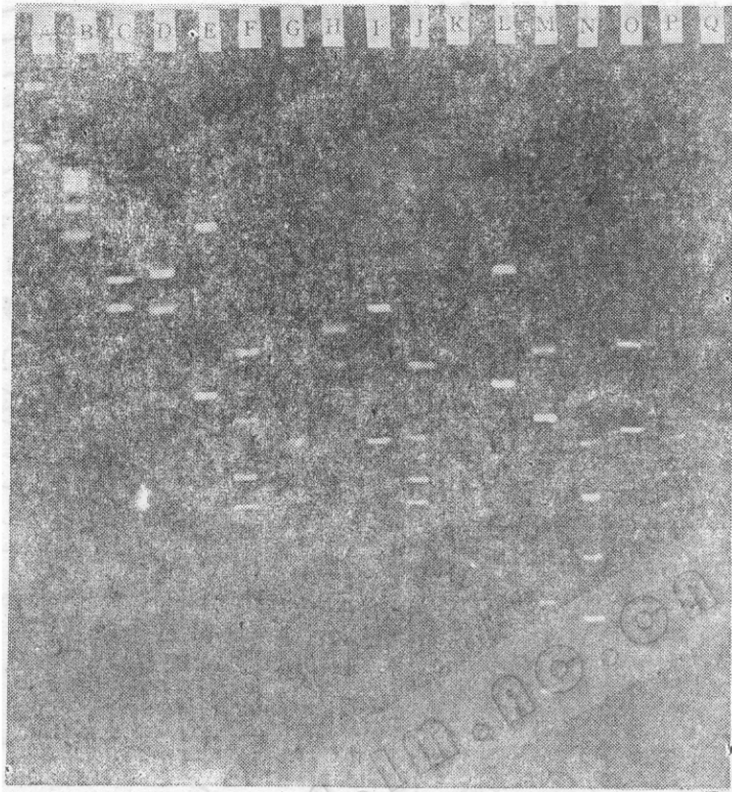


图2 质粒 (p^{*}GTE5) DNA 双酶完全消化得到的限制片段凝胶电泳图

A. (p^{*}GTE5) DNA; B. *SppI* DNA 被 *EcoRI* 切割后的限制片段; C. *EcoRI* 消化;
D. *BglIII* 消化; E. *PstI* 消化; F. *PvuII* 消化; G. *TaqI* 消化; H. *EcoRI/BglIII* 双消化;
I. *EcoRI/PstI* 双消化; J. *EcoRI/PvuII* 双消化; K. *EcoRI/TaqI* 双消化; L. *BglIII/PstI* 双消化;
M. *BglIII/PvuII* 双消化; N. *BglIII/TaqI* 双消化; O. *PstI/PvuII* 双消化;
P. *PstI/TaqI* 双消化; Q. *PvuII/TaqI* 双消化

利用 *SppI* DNA 被 *EcoRI* 切割后的限制片段的分子量作成标准曲线,估计出 p^{*}GTE5 DNA 各酶解片段的分子量。*TaqI* 消化 p^{*}GTE5 DNA 后见 4 条 DNA 带 (图 1),其分子量之和为 3.8 (Md),而其它 4 种限制酶的限制片段分子量之和为 4.5 (Md),于是我们推断 *TaqI* 消化 p^{*}GTE5 DNA 形成了 6 个片段,其中第 1 和第 3 片段的分子量是加倍的。经过推测估计出质粒 (p^{*}GTE5) 平均分子量为 4.5 (Md),DNA 的大小为 6.9 (kb)。

(二) 双酶完全消化

将 *EcoRI*, *BglIII*, *PstI*, *PvuII*, *TaqI* 5 种限制酶分别作两两组合的双酶消化,各组双酶消化后的琼脂糖凝胶电泳带见图 2。用前述之标准曲线求得双酶完全消化后的各限制片段的分子量。在估计分子量时,按各组双酶进行完全消化后得到

的限制片段分子量之和等于质粒 (p^{*}GTE5) 的平均分子量,且双酶完全消化后得到的限制片段数目应等于两个酶进行单酶完全消化后得到的限制片段之和。但在图 2 中可以看到某些组双酶消化后实际限制片段数少于理论数,故推断有些小于 0.2 Md 的 DNA 片段因泳动速度较快而跑出胶板。

(三) 质粒 (p^{*}GTE5) 限制酶图谱分析

1. *EcoRI* 在消化 p^{*}GTE5 DNA 上有两个切点,形成两个片段。以其中一个切点为零点,则另一切点位置可随之确定。

2. *BglIII* 和 *PstI* 的切点作图: *BglIII* 消化 p^{*}GTE5 DNA 上有两个切点,形成两个片段。其第一片段被 *EcoRI* 切成 1.80Md 和 0.65Md 两个片段。*BglIII* 第二片段被切成 1.45Md 和 0.60Md 两个片段。从而可排出两种符合电泳结果的

*Bgl*III 和 *Eco*RI 的相对位置。同时考虑 *Pst*I 消化 *p**GTE5 DNA 也有两个切点,形成两个片段,且从 *Bgl*II/*Pst*I 双酶消化结果,可知 *Bgl*II-I 和 *Pst*I-II 两个片段未被切割。表明 *Pst*I 的两个切点都位于 *Bgl*II 的第二个片段上,分别为 0.3Md 和 0.45Md。但仍有两种可能的切割形式。最后考虑 *Pst*I 和 *Eco*RI 双酶消化, *Pst*I 将 *Eco*RI-I 切成 2.1Md 和 0.3Md,将 *Eco*RI-II 切成 1.1Md 和 1.0Md。综观三组双酶消化结果,可排出这三个酶相对酶切位置图(图 3)。

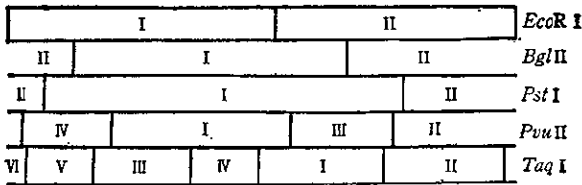


图 3 *Eco*RI、*Bgl*III、*Pst*I、*Pvu*II 和 *Taq*I 酶对质粒 (*p**GTE5) 的限制酶切位置

3. *Pvu*II 和 *Taq*I 的切点作图

*Pvu*II 消化质粒 (*p**GTE5) DNA 形成 4 个限制片段,而 *Taq*I 形成 6 个限制片段。根据双酶完全消化结果,可知 *Pvu*II-III 和 *Pvu*II-IV 均未被 *Eco*RI 切割。*Pvu*II-I 和 *Pvu*II-II 都未被 *Bgl*III 切割。*Pvu*II-I 和 *Pvu*II-IV 也未被 *Pst*I 切割。根据 *Pvu*II 的 4 个限制片段被 *Eco*RI、*Bgl*III 和 *Pst*I 三种限制酶切割与否和前已排出的 *Eco*RI、*Bgl*III 和 *Pst*I 三种酶的酶切位置,最后确定 *Pvu*II 4 个限制片段的相对位置(图 3)。而 *Taq*I 的 I、III、IV、V 4 个片段也未被 *Eco*RI 切割,其 I、III、IV、VI 4 个片段又都未被 *Bgl*III 和 *Pst*I 切割。它的 IV、V 2 个片段也未被 *Pvu*II 切割。在上述排出 4 种限制酶的酶切位置基础上,就较易确定 *Taq*I 的 6 个限制片段的相对位置图(图 3)。

本实验结果及本实验室几年来对穿梭质粒 (*p**GTE5) 性质的分析,我们建立了具有分泌功能的穿梭质粒 (*p**GTE5) 对 *Eco*RI、*Bgl*III、*Pst*I、*Pvu*II 和 *Taq*I 5 种限制性核酸内切酶的酶切图谱(图 4)。并以简图表示质粒 (*p**GTE5) DNA 的抗性标记,复制原点 (Ori) 和这 5 种限制酶的酶切位点之间的关系(图 5)。

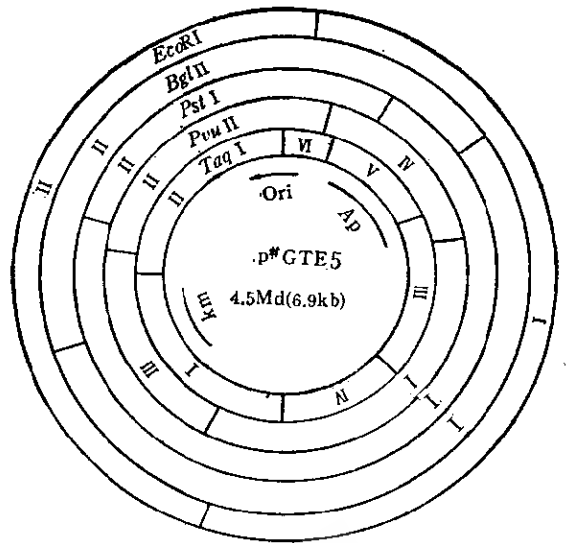


图 4 质粒 (*p**GTE5) 对 *Eco*RI、*Bgl*III、*Pst*I、*Pvu*II 和 *Taq*I 的限制酶图谱

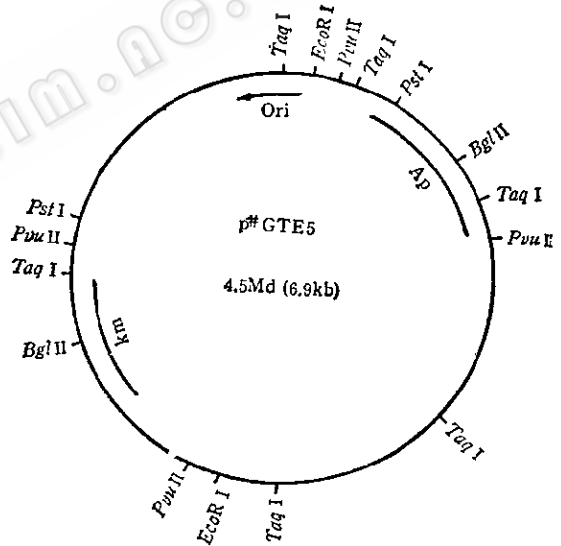


图 5 质粒 (*p**GTE5) 的限制酶图谱

具有分泌功能的穿梭质粒 (*p**GTE5) 分子量较小,拷贝数较多,是一个较理想的表达载体。但是,本实验室用了 13 种限制酶进行单酶消化,直至目前尚未找到单一切点的限制酶,这将对筛选重组子带来麻烦。

参考文献

- [1] 陈永南: 生物工程学报, 2(2): 31, 1986。

- [2] Gray, O. et al.: *J. Bacteriol*, **145** (1): 422, 1981.
- [3] Kroyer, J. et al.: *Gene*, **15**: 343, 1981.
- [4] Maniatis, et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 86—106, 1982.
- [5] Rodriguez, R. L. et al.: *Recombinant DNA Techniques: An Introduction*, Addison-Wesley Publishing Company, p. 48—62, 1983.
- [6] 陈月仙等: *微生物学报*, **27**(4): 336—342, 1987.
- [7] 蔡宝立等: *生物化学杂志*, **2**(4): 49, 1986.

RESTRICTION MAP OF *E. COLI* SHUTTLE PLASMID (p[#] GTE5) WITH SECRETIVE FUNCTION

Chen Yuexian Qiu Hongchen Jue Ken Anuwashi

(Department of Biology, Peking University, Beijing)

The shuttle plasmid (p[#] GTE5) DNA with secretive function was extracted by the alkali lysozyme method from *E. coli* RR1 strain. Its molecular weight is 4.5 Md and DNA size is 6.9 Kb. Restriction fragments of plasmid was obtained by single and double enzymes complete digestion using five different restriction endonucleases. The restric-

tion map of shuttle plasmid (p[#] GTE5) was established for the enzymes *EcoRI*, *BglII*, *psrI*, *PvuII*, and *TaqI*.

Key words

E. coli; Shuttle plasmid; Restriction map