

短小芽孢杆菌质粒pCJ3的限制酶切图谱*

罗进贤 周栢林 李镇林

摘要

从短小芽孢杆菌A3菌株分离的具四环素抗性质粒pCJ3,经电泳法及氯化铯密度梯度法纯化后在琼脂糖凝胶电泳上得到2条带,经电镜观察及限制酶切割证实是一种质粒的两种构型——超线团及开环DNA分子。纯化质粒用13种限制酶进行酶切试验,发现其中有BamHI、AvaI、XbaI切点1个, EcoRI、PstI、BglI、HincII及XhoI切点2个, HinfI、SalI及BclI切点3个, HhaI切点5个, HindIII没有切点。用BamHI、EcoRI、AvaI及XbaI进行双酶解,并根据双酶解后的琼脂糖凝胶电泳带估算出各个片段的分子量,作出质粒pCJ3的4种限制酶的酶切图谱。

基因工程目前主要采用大肠杆菌及其质粒作为DNA分子克隆的受体—载体系统。由于大肠杆菌是人体肠道的共生菌,出于安全考虑寻找其它的无性繁殖系统是必要的⁽¹⁾。枯草杆菌由于不感染人类,安全性好,产胞外蛋白,产芽孢抗逆性强且已在发酵工业中应用等优点,已被愈来愈多的实验室用作分子克隆的系统。目前用作枯草杆菌载体系统的主要是金黄色葡萄球菌质粒如pC194、pT27等⁽²⁾。芽孢杆菌属中的质粒大多数是隐蔽质粒,无选择标记,不适宜作载体。我们从短小芽孢杆菌中分离的质粒具四环素标记,并做了一些质粒的分子特性及转化效率的研究⁽³⁾。为了进一步了解pCJ3的物理性质,改造质粒,我们做了各种限制酶对质粒DNA的酶解试验,并根据双酶解法做出4种限制酶的酶切图谱。

一、材料与方 法

- (1) 菌株 *Bacillus pumilus* A3。
- (2) 培养基 L-肉汤。
- (3) 质粒DNA及λ DNA的分离与纯化

*本文1984年11月收到
 罗进贤、周栢林、李镇林共同完成。周栢林、李镇林负责实验,罗进贤负责整理。罗进贤、周栢林、李镇林共同完成。周栢林、李镇林负责实验,罗进贤负责整理。罗进贤、周栢林、李镇林共同完成。周栢林、李镇林负责实验,罗进贤负责整理。

①质粒分离采用SDS裂解法。在L-肉汤中培养过夜的细胞以3—4g细胞/ml、25%蔗糖、50mM Tris-HCl pH8.0的浓度悬浮。向细菌悬浮液加10mg/ml 0.25M Tris-HCl pH8.0溶菌酶至最后浓度为2mg/ml, 加0.25M EDTA至最后浓度为100mM, 摇匀, 在冰浴中放置20分钟, 室温下10分钟, 加10% SDS至最后浓度为1%, 用1ml移液管迅速吹气混匀, 然后加5M NaCl至最后浓度为1M, 置冰箱中过夜。次日在4℃ 20000rpm离心1小时, 倒出上清液, 加RNase至最后浓度为100μg/ml, 37℃保温1小时。用1:1的酚:氯仿抽提2次, 氯仿抽提1次, 酒精沉淀。沉淀溶于适量TE中用制备琼脂糖凝胶电泳纯化或用CsCl-EtBr梯度超离心纯化质粒DNA^[4]。

②λ DNA 分离纯化按Yamanoto^[6]方法。

(4)试剂 SDS为Sigma产品, HindⅢ按Smith方法^[6]纯化, 其它限制酶为BRL、Sigma或Mannheim Boehringer产, 其它试剂均为国产。

(5)酶解反应 HindⅢ的酶解缓冲液为10mM Tris-HCl pH8.4, 10mM MgCl₂, 60mM NaCl, 7mM 2-巯基乙醇。其它酶的反应缓冲液按有关厂家提供配方, 一般用0.5μg DNA, 一定量的酶液, 37℃反应2小时, 然后加10×的25%甘油、0.1M EDTA pH8.0、0.05%溴酚蓝以终止反应。

双酶解时, 在单酶切后将酶解液用1:1酚-氯仿抽提1次, 氯仿抽提2次, 酒精沉淀过夜。次日10000rpm离心10分钟, 沉淀溶于适量无菌水中再进行第2次酶解。

(6)电泳 采用1%琼脂糖水平平板凝胶电泳(14×16×0.3cm)。电泳缓冲液用0.04M Tris-HCl pH8.0、0.023M NaAc、2mM EDTA。在80—100 Volts室温下电泳3—4小时, 切下凝胶, 在0.5μg/ml溴化乙锭溶液中染色(或配成0.5μg/ml浓度的凝胶), 然后在254nm紫外光下照相。

(7)DNA片段的分子量测定 根据DNA片段在凝胶电泳中的迁移率与分子量的对数成反比的原理, pCJ3质粒经限制酶单切或双切以后产生的DNA片段的大小, 以λ_{C1857} DNA的HindⅢ酶切片段作为分子量标准, 并与经各种限制酶切后的pCJ3质粒DNA片段一起电泳。然后以已知分子量的λ DNA的HindⅢ片段为纵座标, 各片段电泳迁移率(cm)为横座标作图, 再根据未知的各个酶切片段的迁移率从曲线上查出未知片段的分子量。

二、结果与讨论

(1)用13种限制酶酶解质粒pCJ3的结果如图1、2及3所示, pCJ3上有BamH I、Ava I、Xba I切点1个, EcoR I、Pst I、Bgl I、Hho I、Hinc II切点2个, Hinf I、Sal I、Bcl I切点3个, Hha I切点5个。

前已报导^[3]pCJ3用电镜观察可看到开环与超螺旋两种构型, 在电泳凝胶上亦可看到2条带。但经单一切口的酶如BamH I、Xba I等酶解后只得到1条单一的带位于原来的2条带之间, 表明了这2条带是同一种质粒的两种不同构型。

根据电镜周长测定的质粒pCJ3的分子量为 $4.33 \times 10^6 d$, 在琼脂糖凝胶电泳中经单一切口的酶切后得到的线状分子的大小为 $3.63 \times 10^6 d$, 经EcoR I切后得到的2条带的大

小分别为 2.51 及 $1.12 \times 10^6 d$, 相加得 $3.63 \times 10^6 d$, 略小于电泳测定结果。



图1 pCJ3的酶切电泳图谱之一
Fig. 1 Restriction digestion pattern of pCJ3 (1)

- 1. λ /Hind III
- 2. pCJ3
- 3. pCJ3/BamHI
- 4. pCJ3/Ava I
- 5. pCJ3/EcoRI
- 6. pCJ3/Xba I
- 7. pCJ3/Pst I
- 8. pCJ3/Hinf I
- 9. pCJ3/Hha I
- 10. pCJ3/Xho I

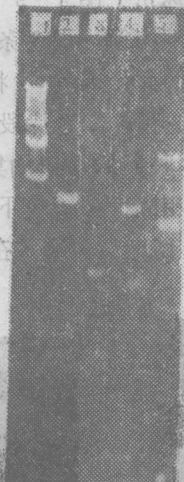


图2

图2 pCJ3的酶切电泳图谱之二

- 1. λ /Hind III
- 2. pCJ3/HincII
- 3. pCJ3/BclI
- 4. pCJ3/BglI
- 5. pCJ3

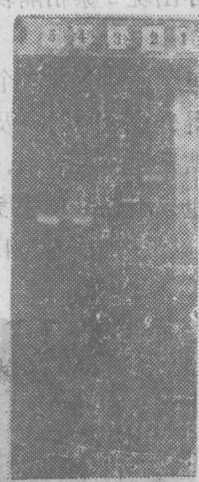


图3

图3 pCJ3的酶切电泳图谱之三

- 1. λ /Hind III
- 2. pCJ3
- 3. pCJ3/Hind III
- 4. pCJ3/Sal I
- 5. pCJ3/EcoRI

(2) 分别用BamHI、EcoRI、(AvaI及Xba)I 4种限制酶进行交叉双酶解, 即BamHI-EcoRI、BamHI-AvaI、BamHI-XbaI、EcoRI-AvaI、EcoRI-XbaI、AvaI-XbaI各组双酶解。结果如图4、5所示, BamHI-AvaI双酶解后可见一大一小、迁移率差别较大的2个片段(图4-4), 推测BamHI与AvaI切点位置相邻近。EcoRI-AvaI双酶解后有3条带(图4-5), EcoRI-BamHI双酶解后预期应有3条带, 但结果仅出现2条(图4-6), 其片段大小之和则比BamHI单酶切后所得的线

型分子小,测得二者之差约为EcoR I小片段之一半,推测BamH I切点位置可能在EcoR I小片段中央,使2个大小相同或相似的片段在凝胶上只显示1条带。Xba I-Ava I双酶解后亦出现2条相隔较远的电泳带(图4-9)。Xba I-BamH I双酶解后可见2条带(图5-4), Xba I-EcoR I双酶解出现3条带(图5-5),结果均与预期相符。

由于EcoR I有2个切口,因此用EcoR I将质粒pCJ3切割后,经琼脂糖凝胶电泳分离获得分子量为 2.51 及 1.12×10^6 d的2个片段,分别用BamH I、Ava I及Xba I再进行酶解,结果如图6所示,证实这3种酶的切口均集中在EcoR I小片段上,并且经BamH I切割后也只出现1条浓度与原样相同而位置较下方的电泳带(图6-8),此情况与图4-6结果一致,表明BamH I切点位置确系在EcoR I小片段中央。

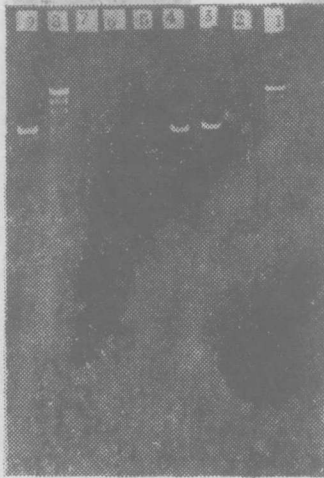


图 4



图 5



图 6

图 4 pCJ3 的酶切电泳图谱之四 (胶浓度1.5%)

Fig.4 Restriction digestion pattern of pCJ3 (4) (1.5% agarose)

- 1. λ /Hind III
- 2. pCJ3
- 3. pCJ3/BamHI
- 4. pCJ3/BamHI + Ava I
- 5. pCJ3/EcoRI + Ava I
- 6. pCJ3/EcoRI + BamHI
- 7. pCJ3/Ava I
- 8. λ /Hind III
- 9. pCJ3/Xba I + Ava I

图 5 pCJ3 的酶切电泳图谱之五

Fig. 5. Restriction digestion Pattern of pCJ3 (5)

- 1. λ /Hind III,
- 2. pCJ3,
- 3. pCJ3/Xba I,
- 4. pCJ3/Xba I + BamHI,
- 5. pCJ3/Xba I + EcoRI,
- 6. pCJ3/Xba I + Ava I.

图 6 pCJ3 的酶切电泳图谱之六 (胶浓度1.5%)

Fig.6 Restriction digestion pattern of pCJ3 (6) (1.5% agarose)

- 1. pBR322/Bgl I,
- 2. pCJ3(EcoRI-L),
- 3. pCJ3(EcoRI-L)/Xba I,
- 4. pCJ3(EcoRI-L)/BamHI,
- 5. pCJ3(EcoRI-L)/Ava I,
- 6. pCJ3(EcoRI-S),
- 7. pCJ3(EcoRI-S)/Xba I,
- 8. pCJ3(EcoRI-S)/BamHI,
- 9. pCJ3(EcoRI-S)/Ava I

上述各组双酶解后所得各片段大小见表1。

表1 4种限制酶交叉酶解后的各种片段的分子量

Table 1 The molecular weights of different fragments generated by reciprocal double digestions with four restriction enzymes

酶解组合	片段数目	片段大小 (10^6 d)
BamH I—EcoR I	3	2.51
		0.56
		0.56
BamH I—Ava I	2	3.52
		0.108
EcoR I—Ava I	3	2.51
		0.658
		0.462
Xba I—BamH I	2	3.39
		0.23
Xba I—EcoR I	3	2.51
		0.777
		0.342
Xba I—Ava I	2	3.51
		0.117

根据 BamH I与Ava I切点间的片段仅为 0.108×10^6 d左右, Xba I与BamH I切点间的片段约为 0.23×10^6 d, 而Xba I与Ava I切点间的片段亦只有 0.117×10^6 d左右, 因此可确定Ava I及Xba I的切口不可能分别在BamH I位点的两侧, 而均应在BamH I切点的一侧, 由此作出质粒pCJ3的限制酶图谱(图7)。

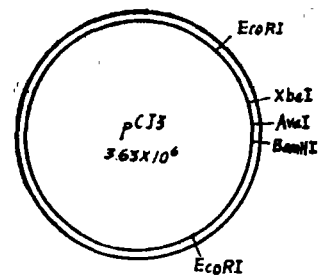


图7 pCJ3的限制酶图谱

Fig. 7. Restriction map of pCJ3

1. 素里小大娘岩谷科洞言编编双器谷张工

参 考 文 献

量于合的器书种各即云编编文文编编期特1 1 本

- [1] Ehrich, S. D. et al., International Symposium on Genetic Engineering. Ed by H. W. Boyer and S. Nicosia, 1978, pp25-32.
- [2] Ehrich, S.D., PNAS, USA, 74(1977), 1680.
- [3] 周植林等, 微生物学报, 22(1982), 3, 257-262.
- [4] Clewell, D.B., J.Bacteriol, 110(1972), 667.
- [5] Yamamoto, K.R. et al., Virology, 40(1970), 734.
- [6] Helling, R.B. et al., J. Virology, 14(1974), 1235.

Restriction Map of Plasmid pCJ3 from Bacillus pumilus

Luo Jinxian Zhou Zhenlin Li Zhenlin

Abstract

The tetracycline resistant plasmid pCJ3 from *Bacillus pumilus* A3 was purified by density gradient centrifugation. The two bands on agarose gel electrophoresis were verified to be the supercoil and circular forms of the plasmid DNA by electron microscope and restriction digestion pattern. The purified plasmid was digested with 13 restriction endonucleases. A single cleavage site for BamHI, Aval and XbaI, two sites for EcoRI, PstI, BglI, HincII and XhoI, three sites for HinfI, Sall and BclI, five sites for HhaI and no site for HindIII were found on this plasmid. The plasmid was cleaved by reciprocal double digestions with BamHI EcoRI Aval, and XbaI. The molecular weights of the fragments were estimated by agarose gel electrophoresis. A simple restriction map of pCJ3 was thus constructed.

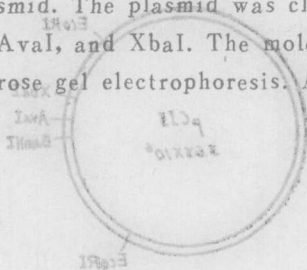


图 7 pCJ3 的限制酶图谱
Fig. 7. Restriction map of pCJ3

面片长约 0.33 × 10⁶ 碱基对。在 0.11 × 10⁶ 碱基对时，亦可观察到 XbaI 和 Aval 的切割位点。在 BamHI 位点附近，观察到 BamHI 的切割位点。由此作出 pCJ3 的限制酶图谱 (图 7)。