

分层液的比重, 以及与细胞接触的一些试剂的渗透压的精确测定是很重要的。因为我们不但希望有纯度高和一定数量的细胞, 更希望有活力较高, 保持体内生理功能的反应细胞。采用的同一双臂比重并 25℃ 称量法及冰降法分别测定比重及渗透压, 前者的测量精度可达小数点第四位。

从以上分离结果看来, 三步处理法可以得到高纯度、高存活率和一定产率的淋巴细胞, 分离过程也较简单, 因而在要求较高的实验中, 与其它种种方法相比, 有其可取之处。

淋巴细胞的荧光偏振检测, 目前在国内还是一项较新的技术。根据 29 例正常人淋巴细胞的测定结果, 其细胞内荧光偏振度 P 的平均值为 0.182 ± 0.024 。接受 PHA 刺激后, P 值平均下降 20% 左右, 表现仍具有正常生理功能

的正常人淋巴细胞的反应特性。

淋巴细胞的显微荧光活度观察结果也表明, 所分离的细胞具有正常的膜的通透性。当 FDA 与细胞接触后很快就透过细胞膜进入细胞浆, 经脂酶水解而显出翠绿色的荧光。凡属活力低的细胞发出的荧光强度也弱, 甚至无荧光可见。

参 考 文 献

- [1] Cercek, Lea and B. Cercek, 1977, *Euro. J. Cancer.*, 13: 903—915.
- [2] 董志伟 刘树森, 生物科学参考资料 第 11 集 97 页.
- [3] Dulbecco, R. and M. Vogt, 1954, *J. exp Med.*, 99: 167.
- [4] R. F. Chen, & R. L. Bowman, 1965, *Science Vol.*, 147: 3653—3659 p. 729.

用两相法纯化具有生物活性的质环*

何俊坤 朱心良

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

质环的纯化国外多半采用超离心技术^[1-5], 也有采用硝基纤维素柱过滤^[6]、甲基化蛋白柱^[7]、制备电泳^[8]及酸酚抽提法^[9]的报道。前者需要超离心机, 后者操作烦琐、费时。我们参照 Guerry 等人^[10]和 Ohlsson 等人^[11]的方法, 加以改进。本文介绍的方法纯化质环, 既不受仪器设备的限制, 又能做到快速、简便和节约。

两相法纯化质环的原理是: 由于质环是共价闭合环状 DNA (Covalent closed Circular DNA), 共价闭环 DNA 热变性后复性的动力学与染色体之间有很大的差别, 前者复性比后者容易。利用这种特性, 质环 DNA 和染色体 DNA、RNA 的混合物, 经热变性后迅速冷却于干冰酒精中。质环 DNA 即复性为双链状态,

而染色体 DNA 仍为单链。在两相分配系统中, 双链 DNA 留在聚乙二醇相(上相), 单链 DNA、RNA 留在葡聚糖相(下相), 从而达到了分离的目的。

材 料 和 方 法

(一) 材 料

1. 药品、试剂:

葡聚糖(Dextran T₅₀₀) 以下简称 Dextran 瑞典产品; 聚乙二醇(以下简称 PEG), 上海奉贤光明化

* 本文摘要曾在第三届全国生物化学学术会议上宣读。参加工作的还有军事医学科学院逯好英和武汉大学张楚富, 冯锦明参加部分实验。电泳工作由龚启蕙、王妙珠同志担任; 文章内电泳照片由许海滨同志拍摄, 特此致谢。

工厂出品;溴化乙锭(英国BDH产品);四环素(上海第八制药厂生产);氨苄青霉素(上海第十三药厂生产);牛胰核糖核酸酶(上海生化所出品);蛋白酶E(E. Merck产品);EcoRI, λ DNA(由本实验室制备)。

2. 菌株:

E. coli 8021(pBR₃₂₂) *E. coli* C600(受体菌)。

3. 培养基

E. coli 8021 培养基:以 M₉ 培养基为基础,参考文献^[2,12]的配方,略有改变。每升含:葡萄糖 5 克(分开灭菌),磷酸氢二钠 15 克,磷酸二氢钾 3 克,氯化铵 1 克,水解蛋白 5 克,维生素 B₁₂ 10 毫克,硫酸镁 0.25 克(分开灭菌),氯化钙 0.02 克(分开灭菌),氯化铁 0.0027 克(分开灭菌),氯化钠 0.5 克,5'-dAMP, 5'-dCMP, 5'-dGMP, 5'-dTMP 各 5 毫克。

E. coli C600 培养基,除下列试剂不同外,其余和 *E. coli* 8021 培养基相同。水解蛋白 2 克,酵母膏 5 克,DL-亮氨酸 0.2 克,不加四种脱氧核苷酸。培养基调 pH 至 7.2,高压灭菌(1 公斤/厘米²) 20 分钟。*E. coli* 8021 培养基使用前加入四环素 25 微克/毫升,氨苄青霉素 50 微克/毫升。转化用的平板含 2% 琼脂。

4. 缓冲液:

TE 缓冲液: Tris-HCl, 10mM, pH8.0; EDTA, 1mM; TES₁ 缓冲液: Tris-HCl, 30mM, pH8.0; EDTA, 5mM; NaCl 50mM; TES₂ 缓冲液: Tris-HCl, 20mM, pH8.0; EDTA, 1mM; NaCl, 20mM。

(二) 质环的抽提和纯化

1. 菌体培养:

将 *E. coli* 8021 菌种的 37℃ 过夜培养液,以 10% 接种量进行扩大振荡培养。参考 Clewell 等(1972)^[13] 和 Tanaka 等人(1975)^[14] 的方法,振荡培养 2 小时后,加入 200 微克的氯霉素/毫升,增殖质环,继续培养 10 小时,离心收集菌体。

2. 用十二烷基硫酸钠(SDS)的溶胞(或溶菌)和氯化钠沉淀染色质 DNA 作用:

将菌体用 25% 蔗糖(配在 50mM Tris-HCl, 1mMEDTA pH8.0 中)洗涤一次。离心 10,000rpm, 20 分钟,得高渗处理过的菌体。将菌体悬浮于 TES₁ 缓冲液中,加入 4 倍体积的 1.25% SDS(配于 50mM Tris-HCl pH8.0, 80mMEDTA 中),在冰浴中振荡至溶菌液完全变成粘稠后,加入 1/4 体积的 5M 氯化钠,在冰浴中振荡 5 分钟置冰箱过夜。

3. 用 PEG 沉淀 DNA:

将上述溶液离心 15,000rpm, 20 分钟,取上清液参照 Humphreys^[15] 等人的方法加入固体粉末状的 PEG 至 10% 的浓度,待完全溶解后置冰箱过夜。

4. 用核糖核酸酶、蛋白酶及酚处理:

将上述溶液离心 15,000rpm, 20 分钟,沉淀溶于 TES₁ 缓冲液(可用匀浆器匀浆)。加入牛胰核糖核酸酶(用重蒸水配成浓 20 倍的储液, 100℃, 10 分钟预处理,灭活 DNase)50 微克/毫升,在 37℃ 下反应 30 分钟,然后加入蛋白酶 E(配于 20mM Tris-HCl pH8.0, 浓 20 倍储液, 37℃, 1 小时自溶去杂酶)500 微克/毫升,在 37℃ 下反应 30 分钟,然后用等体积的 TES₁ 缓冲液平衡过的酚抽提二次,离心取水相对 TES₁ 缓冲液透析,即为质环 DNA 的粗制品。

5. 质环的纯化:

取透析后的总核酸溶液(包括 DNA 和 RNA)分装于 10 毫升有磨口塞的离心管中,加氯化钠至 200 mM,再加 2 倍体积的酒精,置 -20℃ 冰箱过夜。离心 4000rpm, 5 分钟,将沉淀溶于 TE 缓冲液(配成大约 50 微克/毫升 DNA 浓度的溶液),加热 100℃, 2 分钟,迅速冷却于干冰酒精中,融化后按每 0.2 毫升 DNA 溶液加入:

Dextran 16.8%(W/W,配于重蒸水中)	500 微升
PEG 18.4%(W/W,配于重蒸水中)	250 微升
0.5M 磷酸钠缓冲液 pH6.8	20 微升
加重蒸水稀释至	1 毫升

在有磨口塞的离心管中颠倒振荡 5 分钟,离心 4000 rpm, 5 分钟,取 PEG 相(上相)再加入 Dextran 450 微升, 0.5M 磷酸钠缓冲液 20 微升,重复上述操作,取 PEG 相加氯化钠至 200mM,再加 2 倍体积的酒精,置 -20℃ 冰箱过夜。离心 4000rpm, 5 分钟,沉淀溶于 TES₂ 缓冲液,对 0.1M Tris-HCl pH7.5 透析,即为纯化的质环 DNA 溶液。

(三) 纯化质环的鉴定

1. 转化:

参照 Cohen 等人(1972)^[16] 的方法进行。*E. coli* C600 在 37℃ 下过夜的培养液,以 10% 的接种量转入扩大并培养至 A₆₀₀ 为 0.6 时,离心收集菌体。以 1/2 原体积的 0.01M 氯化钠洗涤一次,离心 4000 rpm, 10 分钟,将菌体再悬浮于 1/2 原体积的 0.03M 氯化钙中,在冰浴中振荡 20 分钟,离心 4000rpm, 10 分钟,再将菌体悬浮于 1/10 原体积的 0.03M 氯化钙中,即为转化用的感受态菌。

用 TES₂ 缓冲液配制转化用的质环 DNA 液

(含质环 DNA 2.5 微克/毫升, 氯化钙 0.03M), 将溶液混匀后, 取 0.1 毫升加至 0.2 毫升上述感受态菌液, 混匀于一消毒试管中(对照样品用 0.1 毫升水代替 0.1 毫升 DNA 溶液), 在 0℃ 振荡 60 分钟, 在 42℃ 下温育 2.5 分钟, 立刻置于冰浴, 用不含抗菌素的培养基稀释至 3 毫升, 37℃ 振荡培养 2 小时, 取不同的稀释度铺于含有抗菌素的平板上, 37℃ 培养过夜, 计算每微克 DNA 转化的菌落数(即转化频率)。

2. 质环的酶解及电泳:

质环的酶解参照 Mertz^[17] 等(1972) 和 Tanaka 等^[14](1975) 的反应体系进行; 电泳参照 Helling^[18] 等(1974) 和 Radloff 等^[19](1967) 的方法进行。20 微升总反应体积中含有: 质环 DNA 5 微升(相当于 125 毫微克 DNA), 4 倍浓的反应缓冲液 5 微升(Tris-HCl, 400mM, pH8.0; MgCl₂, 40mM; NaCl, 50mM), 稀释 10 倍的 EcoRI 酶 10 微升, 在 37℃ 下反应 1 小时, 加入 2 微升十二烷基磺酸钠(SDS) 终止反应, 加入 4 微升溴酚蓝——蔗糖溶液(50% 蔗糖, 0.07% 溴酚蓝) 进行电泳。电泳条件: 玻管 0.6×15cm, 琼脂糖 0.7%(内含 EB0.5 微克/毫升), 电泳用 TEA 缓冲液: Tris-HCl, 50mM, NaAc, 20mM, NaCl, 18mM; 用冰醋酸调至 pH8.05, 100 伏 5 分钟, 后调为 20 伏过夜。电泳结果如下:



1 2 3

1. λ + EcoRI 酶解的 λ
2. λ + EcoRI 酶解的 pBR₃₂₂
3. λ + 未酶解的 pBR₃₂₂

3. 质环 DNA 的电镜观察:

参照文献^[20]进行。含质环 DNA 的展开液: 5 微克 DNA/毫升; 细胞色素 C, 0.1 毫克/毫升; Tris, 0.1M; Na₃EDTA, 10mM; 50% 甲酰胺。使用硷性蛋白膜展开后, 用 formvar 碳膜铜网捞取, 用醋酸铀染色, 钨铼合金投影, 于 JEM-100B 型电

镜观察摄片。其电镜照片如下图。

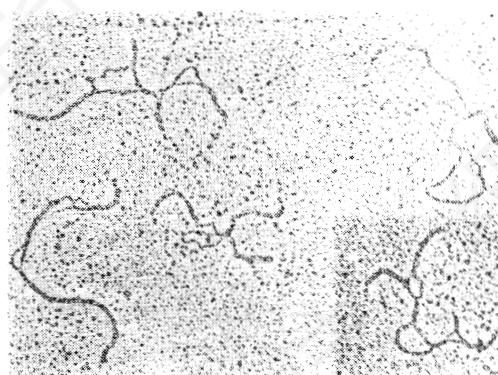


图 I 超螺旋的 DNA 分子 ×75,000

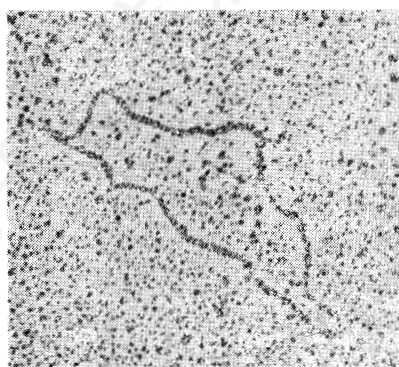


图 II 开环的 DNA 分子 ×90,000

电镜底片经投影仪放大 15 倍, 用地图仪测量其长度, 按经验公式 (1 微米 DNA = 2.07×10^6 道尔顿) 计算分子量。质环 DNA 呈开环和共价闭合超螺旋二种形状, 测量 15 个分子的平均长度, 计算出分子量与文献值一致。

结果和讨论

采用本文介绍的方法纯化质环 pBR₃₂₂, 其转化频率可达 4×10^6 细胞/每微克质环 DNA。从转化子再提取质环的转化频率可达同样水平。每升培液可得纯化质环 1,200 微克以上。经电泳, 电镜检查证明所纯化的质环纯度较高。

我们参照 Ohlsson 等人的方法纯化 pBR₃₂₂ 质环, 发觉质环的生物活性极低, 大多数情况下所纯化的质环都没有生物活性 (Ohlsson 在文章中未介绍转化实验, 所以也未提及质环的生物活性如何)。经我们实验后发现: Ohlsson

等人的方法纯化的质环样品中无机磷的存在是影响质环生物活性的根本因素,我们对此进行了深入的研究,采用透析方法去除样品中的无机磷之后,质环的生物活性大大提高,可提高至 4×10^6 。对透析后的质环溶液再加入不同浓度的磷酸钠缓冲液,转化频率立即就有不同程度的下降,其结果如下表:

样 品	转化频率 (转化细胞数/微克质环)
透析除磷后的质环	4×10^6
透析后的质环加入 0.15 mM 磷酸钠缓冲液	0
透析后的质环加入 0.1 mM 磷酸钠缓冲液	1.2×10^2
透析后的质环加入 0.05 mM 磷酸钠缓冲液	4.2×10^2
透析后的质环加入 0.01 mM 磷酸钠缓冲液	7.1×10^2

从实验结果来看,无机磷对质环生物活性的影响是很严重的。在两相分配时,我们曾用 NaAc 缓冲液代替磷酸钠缓冲液,所得质环 DNA 不经透析就进行转化,其转化频率也可达 8×10^3 ,这就进一步确证了无机磷对质环生物活性的影响。我们在实验中观察到:转化时含有 0.03M CaCl_2 的透析过的质环溶液,加入很少量的磷酸钠缓冲液立即产生白色絮状沉淀。无机磷对质环生物活性影响的机理,我们认为这是由于产生磷酸钙沉淀,降低了钙离子在转化时的浓度,致使受体细胞的通透性受到很大影响,因而大大降低了质环的转化频率。

我们曾用硷变性代替热变性,然后进行两相系统分配,同样可以获得满意的结果。

氯霉素增殖质环,我们采用扩大培养 2 小时后加入氯霉素,继续振荡 8~10 小时,增殖效果也很好。

用本法纯化的质环,可以用各种内切酶水解。经电泳鉴定和电镜观察证明产品是均一的,与文献报道的其它方法所纯化的质环 pBR₃₂₂ 完全一致,适宜于在遗传工程实验中作载体用。若要高纯度的质环 DNA,可采用 Bio-Gel A—5m 凝胶过滤除去残留的微量的 RNA。

摘 要

质环(Plasmid)是遗传工程实验中重要的载体之一。国外纯化质环大多数采用超离心技术。因此,质环的制备在国内受到很大的限制。本文介绍利用葡聚糖,聚乙二醇和磷酸钠缓冲液所组成的二相系统可以纯化具有生物活性的质环。在获得总核酸(包括 RNA, DNA)溶液后,只要借助于台式离心机便可纯化质环。方法可靠、简便和省时。产品纯度较高,生物活性好,质环的转化频率每微克可高达 4×10^6 个细胞。本文还检查了无机磷对转化的影响。

本文承匡达人教授审阅,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Bazaral, M. and D. R. Helinski. 1968. *J. Mol. Biol.* 36: 185—194.
- [2] Clewell, D. B. and D. R. Helinski. 1969, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 62: 1159—1166.
- [3] Currier, T. C. and E. W. Nester. 1976. *Analy. Biochem.* 76: 431—441.
- [4] Löfdahl, S., J. E. Sjöström and L. Philipson. 1978, *Gene.* 3: 149—159.
- [5] Petes, T. D., J. R. Broach, et al. 1978. *Gene.* 4: 37—49.
- [6] Cohen, S. N., and C. A. Miller. 1969. *Nature.* 224: 1273—1277.
- [7] Mandell, J. D., and A. D. Hershey. 1960. *Anal. Biochem.* 1: 66.
- [8] Strongin, A. Y. et al. 1977. *Anal. Biochem.* 79: 1—10.
- [9] Zasloff, M., et al. 1978. *Nucleic. Acid. Res.* 5: 1139—1151.
- [10] Guerry, P., et al. 1973. *J. Bacteriol.* 116: 1064—1066.
- [11] Ohlsson, R., et al. 1978, *Nucleic. Acid. Res.* 5: 583—590.
- [12] Modrich, P., and D. Zabel. 1976. *J. Biol. Chem.* 251: 5866—5874.
- [13] Clewell, D. B. 1972, *J. Bacterial.* 110: 667—676.
- [14] Tanaka, T., and B. Weisblum. 1975, *J. Bacterial.* 121: 354—362.
- [15] Humphreys, G. O., et al. 1975, *Biochem. Biophys. Acta.* 383: 457—463.