

烟草模板DNA的制备

PREPARATION OF TEMPLATE DNA OF *NICOTIANA LONGSDORFII*

席与烈

Xi Yulie

(农学系)

(Department of Agronomy)

关键词 烟草; 定序; 探针; 模板; DNA

Key words *Nicotiana longsdorfi*; sequencing; Probe; Template; DNA

单链模板DNA的制备是基因定序和作杂交探针的基本技术。核酸的定序研究原先只在动物和微生物方面进行。近来在植物的分子遗传研究也开始重视起来。烟草核DNA经噬菌体M13mp9作为克隆载体从细胞释放时含单链核DNA, 单链只与克隆的DNA两条互补链之一同源。含大肠杆菌lac操纵子的片段, 在感染的细胞中产生 β -半乳糖苷酶氨基酸的末端部份, 能补偿宿主细胞F因子附加体的缺陷半乳糖苷酶基因, 产生活性的 β -半乳糖苷酶。噬菌体和细菌细胞生长在异丙基硫代半乳糖 IPTG和X gal上产生蓝色菌斑。另一类型是多聚接头。这种烟草核DNA小片段包含已插入到 β -半乳糖苷酶基因编码的氨基末端部份及用于克隆的一些单独限制位点, 插入外源DNA后将解除与 β -半乳糖苷酶突变体补偿的能力。含有这类插段的噬菌体生长在有IPTG和X gal的平板上产生无色菌斑。从单菌落无色噬菌斑制备出各种单链DNA。

制备方法

1. 菌种制备: 将E. coli k12菌株JM103接种于最低培养基(minimal media)的琼脂平板上, 37℃培养过夜, 次日菌落明显可见(可于室温保持数周)。

2. 反应潜能细胞Competent cells的制备: 采用低pH转化法。将复活的JM103平板上挑取一菌落接种入3ml的YT培养基。37℃震荡培养过夜。翌日, 用YT培养液1:150的比例稀释, 37℃震荡培养约1.5小时, $OD_{550} = 0.2-0.3$ 。细胞置4℃, 8000G, 离心10分钟, 再次悬浮于预冷的感受态溶液A Competence solution A, 水浴20分钟。4℃, 8000G, 离心10分钟。用预冷的感受态溶液B又一次悬浮细胞。60分钟内转化反应。

3. 平板接种培养物的制备: 将JM103一个菌落接种于3ml的YT培养基上, 37℃震

1987年4月17日收稿

荡培养, 达到生长对数期 $OD=1.0$, 置水浴。

4. 载体的制备: 载体M13mp9DNA $1.5\mu\text{l}$, TE $6.5\mu\text{l}$, 10XE $1\mu\text{l}$, EcoRI (10000u/1000 μl) $1\mu\text{l}$ 消化3小时, 65°C , 10分钟终止反应。

5. 烟草核DNA的处理: 将烟草用Cscl₂提纯的叶片核DNA $120\mu\text{l}$ (总量 $10\mu\text{g}$), 加入TE $55\mu\text{l}$, 10XE $20\mu\text{l}$, EcoRI (10000u/1000 μl) $5\mu\text{l}$, 酶解3小时, 65°C 终止反应。

6. M13mp9和核DNA的连接反应: 将停止酶解的M13mp9和烟草核DNA混和, 加入3M NaAc, 再加二倍体积的 -20°C 预冷的乙醇, 4°C 离心15分钟, 冰冻干燥5分钟, 沉淀DNA。在沉淀物中加13 μl 水, 2 μl 接联缓冲液, T₄DNA连接酶 (500/500 μl) $5\mu\text{l}$, 16°C 过液。

7. 转化反应: 连接反应物20 μl , 加入100 μl 反应潜能细胞, 混合均匀, 水浴30分钟, 37°C , 2分钟。

8. 转化株的平板接种: 取灭菌管 (13X100mm) 三支, 每管装平板接种培养物200 μl , 第一管加转化反应液1 μl ; 第二管加10 μl ; 第三管加90 μl 。分别加入 45°C 平板接种琼脂3ml, 2% Xgal 100 μl 以及100mM IPTG 20 μl 。混匀后, 倒入YT培养基平板表层, 固化后, 倒转平板, 37°C 培养过液。

9. 单链模板DNA的制备: 挑出5个无色空斑菌落, 分别接种入含10 μl 新鲜制备的JM103平板接种培养物的2ml YT培养基内, 37°C 震荡培养5~8小时, 分别从各管中取出1ml菌液, 离心, 使细胞沉淀, 丢弃沉淀, 取出含噬体的上清液, 加入2.5M NaCl 200 μl , 20% PEG 200 μl 混匀, 水浴30分钟, 离心沉淀噬菌体, 弃上清液, 加100 μl TE, 50 μl 酚, 离心5分钟。取上清液, 加10 μl 3.0M NaAc (pH6.0), 冷酒精200 μl , -20°C 至少一小时, 离心10分钟, 留下沉淀, 加1ml冷酒精洗涤, 倾去上清液, 真空干燥沉淀物。将沉淀溶于20 μl TE, 即是模板DNA。

试验结果

1. 转化株平板接种: 用1 μl 、10 μl 以及90 μl 转化反应液平板接种, 37°C 培养过液后的菌斑情况见表1:

2. 琼脂糖凝胶电泳检查模板DNA, 每种模板DNA 2 μl , 各加TE 15 μl , 负载缓冲液3 μl , 以标准单链1.5kb DNA为对照: 每

菌落所制备的单链DNA均为一条清晰带, 说明制备效果良好。五种单链DNA的带子都不在一直线上, 说明每个无色空斑菌落所制备的模板DNA的片段大小并不完全一致, 但又差异不大, 都小于1.5kb。由于所制备的五个单克隆的烟草模板核DNA条带清晰, 均可作定序和探针使用。

表1 转化株无色空斑和蓝色菌落数

转化反应液 (μl)	无色空斑菌落数 (个)	蓝色菌落数 (个)
1	14	12
10	103	101
90	1231	>2000