

Charon 4A 噬菌体 DNA 的制备¹⁾

杨志兴 杨学成 曲宝兰 刘伟民

张云湖 齐云祥

(黑龙江省应用微生物研究所, 哈尔滨)

由 David 改造的 Charon 4A 噬菌体, 目前已普遍作为无性繁殖各种 DNA 的良好载体。它具有极好的安全性。Charon 3A、4A 和 16A 噬菌体已被确定为 EK₂ 级的载体——宿主系统^[1,2,4,5]。

Charon 4A 噬菌体 DNA 为 46kb 碱基对长。经 *EcoRI* 酶消化成 4 个片段, 其中 19 和 12kb 片段可作为制备真核基因文库的载体, 可容纳 7.6—20.6kb 的任何真核基因片段, 并可形成噬菌斑, 以利于筛选某种基因。为了获得该 DNA, 我们作了如下实验。

本文所用的材料为 Charon 4A 噬菌体及宿主菌 *E. coli* LB392 (由 T. Honjo 赠), LB 和 TB 培养基、氯化铯、酚(重蒸馏)、蛋白酶 K (*E. Merck*) 等; 以及超速冷冻离心机 Hitachi 55000, 沉淀离心转头 RP^{50T}/194; 梯度离心转头 RP^{65T}/399。方法为如下三点:

(一) Charon 4A 噬菌体贮备液 参照文献[5]制备。

(二) Charon 4A 噬菌体的扩大培养

取培养至平衡期的宿主菌 0.3ml, 0.1mM MgCa 液 (10mM MgCl₂ 和 10mM CaCl₂) 0.3ml 和 Charon 4A 噬菌体贮备液 0.1ml (相当于 5 × 10⁵—10⁶ 噬菌体), 混合后在 37℃ 中预吸附 20 分钟, 接入到 800ml LB 培养液/3,000ml 三角瓶中, 37℃, 振荡培养 18—20 小时, 取下加入 1% 体积的氯仿, 再振荡 30 分钟, 以使噬菌体充分裂解。裂解液效价一般在 10¹⁰ 以上。然后加入

NaCl 至终浓度为 1M, 放冰箱过夜, 10,000rpm 离心 20 分钟, 得到澄清的 Charon 4A 裂解液。再经 20,000rpm 离心 1.5 小时, 收集 Charon 4A 噬菌体, 悬于 2ml 缓冲液中, 备作梯度离心用。

(三) 氯化铯梯度离心

氯化铯梯度液的配制由管下向上为: 4.8M/0.8ml、4.0M/0.8ml、3.2M/0.8ml、2.8M/0.6ml、及 36% 蔗糖 0.5ml, 其上加入 0.7—0.8ml 样品。在 35,000rpm 离心 2 小时, 在 3.2M 梯度中出现乳白色噬菌体带 (见图 1)。取出噬菌体透

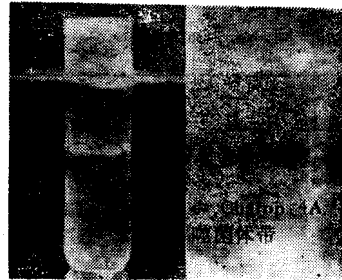


图 1 Charon 4A 噬菌体氯化铯梯度离心结果

析过夜。测定 Charon 4A 的 OD₂₆₀ 值, 调至 10 个 OD₂₆₀ 单位, 用蛋白酶 K (0.2% SDS、10mM EDTA、50μg/ml 蛋白酶 K) 处理 1 小时, 37℃。用等体积的酚提取 3—5 次, 水相再用 5 倍体积的水饱和和乙醚提 2—4 次除酚, 即得到 Charon 4A 噬菌体 DNA。该 DNA 及其 *EcoRI* 酶切片段作 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 2 所示。

Yang Zhixing et al.: The Preparation of Charon 4A Phages DNA

1) 本所分析室历人伟、于鹏飞协助紫外测定, 特此致谢。



图2 Charon 4A 噬菌体 DNA 及其 *Eco*RI 酶切片段电泳图谱

1. Charon 4A DNA 的 *Eco*RI 酶切片段 (未完全消化)。
2. λ I857 噬菌体 DNA 的 *Eco*RI 酶切片段作为片段长度标准。
3. Charon 4A 噬菌体 DNA。

从图 2 来看,所得到的 Charon 4A DNA 及其 *Eco*RI 酶切结果与文献报道完全一致^[1,4]。同时测定了转感染活性为 $9.2 \times 10^2 - 2 \times 10^3$ pfu/ μ gDNA, 以及 *Eco*RI 酶片段长度。由此可见,所得 DNA 完全可以用作基因载体。本法与 Blattner^[2,3] 所采用二次氯化铯梯度离心法比较,省去一次梯度离心,同时缩短了梯度离心时间,并获得满意结果,是一种简易快速制备 Charon 4A 噬菌体 DNA 的方法。

参 考 文 献

- [1] Akira, Shimizu et al.: 1982. *Cell*, 28: 499—506.
- [2] Blattner, F. R. et al.: 1977. *Science*, 196(4286): 161—169.
- [3] Miller, J. H.: 1972. *Experiments in Molecular Genetics*, p. 37—46.
- [4] Maniatis, T. et al.: 1978. *Cell*, 15: 687—701.
- [5] Williams, B. G. et al.: 1979. *J. Virology*, 5: 555—575.



中国遗传学会召开国际环境三致讲习交流会

中国遗传学会、上海市科协和国际环境诱变剂学会联合举办的致变、致癌、致畸讲习交流会于 1983 年 5 月 25 日至 6 月 1 日在上海召开。应邀来华讲学的有美、日、西欧等 12 个国家的 33 位学者,论文报告 40 余篇。参加讲习会的国内代表 200 余名,综合性报告 4 篇,另外 35 篇论文以壁报形式进行交流。中外双方的报告和壁报显示了近年来遗传毒理学这门新兴学科的重大发展。致变是肿瘤发生和部分畸胎形成的基本原因所在,致变、致癌和致畸三者关系密切,加强这三者的研究对预防肿瘤、保护环境、提高人口素质有积极作用,对人类和社会发展有重要意义。这次讲习会反映了我国在三致工作中的较新研究成果,主要进展有: (1) 在实验方法上逐渐接近系列化; (2) 研究工作开始进入到分子水平; (3) 体外转化工作接近国外水平; (4) 被检物从单一的农药转到食品卫生、环境保护、药品检验等。

但是我国的三致研究工作在系列化、标准化、规范化上仍存在不足,主要表现为: (1) 评价化学物质的安全性往往只有个别指标,影响实验结果的全面评价; (2) 所用实验材料(实验动物、菌株、细胞株、果蝇品系等)不标准,难以被国际上所公认; (3) 实验室条件没有规范化,实验结果不尽相同,很难对其对比和评价。

出现上述问题的一个重要原因是我国三致作用的研究与应用工作缺乏组织和协调。为了进一步推动我国的三致研究工作,促进国内外学术交流,会议期间成立了中国遗传学会环境诱变剂委员会,谈家桢理事长兼任主任委员。

(安锡培)