

## 抗冻蛋白基因重组质粒的转化与扩增\*

徐 权 汉

(中国科学院海洋研究所)

钱 标

(中国科学院生物化学研究所)

鲈鱼 (*Pseudopleuronectes americanus*) 为了适应冬季低温的海水, 在肝脏中产生一种抗冻蛋白<sup>[3]</sup> 释放到血液中。当血液中含有这种抗冻蛋白时, 即使在  $-1.5^{\circ}\text{C}$  的温度下, 血液仍不会凝固结冰<sup>[5]</sup>。据报道, 这是一种小分子的、富含丙氨酸的蛋白, 丙氨酸占氨基酸总量的60%<sup>[1]</sup>。抗冻蛋白在鲈鱼体内具有季节性的变化。冬季鲈鱼血液中抗冻蛋白的含量十分丰富, 每毫升血清含10—20毫克; 夏季血液中则没有该蛋白。

加拿大学者 Peter.L.D. 和 Choy.L.H.

(1980) 分别在4月、8月和11月捉到的鲈鱼中, 试图在它们的肝脏中分离出抗冻蛋白信使核酸(mRNA), 结果只有在11月捉到的鲈鱼中有抗冻蛋白(mRNA)。这进一步证实了抗冻蛋白季节性的变化和抗冻蛋白(mRNA)的消长有密切的关系。1982年, 同是这两位学者把抗冻蛋白(mRNA)反转录成cDNA进行质粒重组, 并转化到大肠杆菌中。

1983年, 吴尚勳教授从加拿大引进抗冻蛋白基因重组质粒, 但不知用什么质粒作为重组质粒的载体以及基因插入质粒的切点。这给扩增和提取带来困难。经过反复研究, 终于克服了这些障碍, 使得抗冻蛋白基因转化到大肠杆菌中扩增, 具体方法如下。

1. 材料。抗冻蛋白基因重组质粒由加拿大Memoria大学生物化学系海洋科学研究室提供。

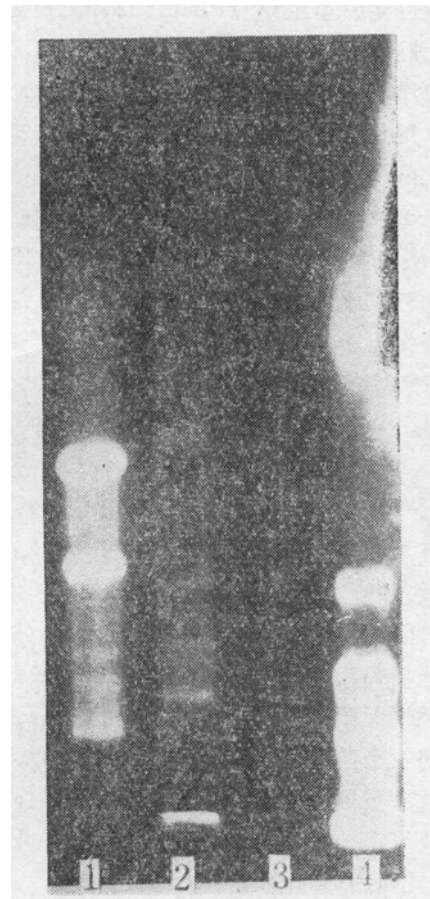


图1 琼脂糖凝胶电泳(电压30V)

1. PBR 322质粒电泳图谱;
2. 从加拿大引进的抗冻蛋白基因重组质粒电泳图谱。

\* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第1157号。

大肠杆菌E.coli C<sub>600</sub>由中国科学院生物化学所遗传工程研究室提供。

2. 重组质粒的鉴定。取5 $\mu$ l抗冻蛋白基因重组质粒进行琼脂糖凝胶电泳。琼脂糖1%，电泳缓冲液Tris-醋酸缓冲液(Tris 0.04M, 醋酸钠 0.02M, EDTA 0.002 M, pH7.8)。电压30V, 电泳8小时。

溴化乙锭染色, 紫外光下显色并拍成照片(图1)。从电泳的图谱分析, 初步确定抗冻蛋白基因载体是质粒PBR 322。

3. 抗冻蛋白基因重组质粒的转化。含有抗冻蛋白基因重组质粒PBR 322转化到受体菌——大肠杆菌C<sub>600</sub>。方法是: 受体菌C<sub>600</sub>在BL培养剂中培养至对数生长早期, 离心收集菌体, 用氯化钙活化, 置冰浴10分钟, 离心收集活化菌体备用。

取20 $\mu$ l重组抗冻蛋白PBR 322质粒, 与0.1ml活化大肠杆菌C<sub>600</sub>混合, 置冰浴45分钟后转到37 $^{\circ}$ C水浴5分钟, 再加入BL培养剂, 37 $^{\circ}$ C振荡1小时。由于不知道抗冻蛋白基因在质粒PBR 322上的插入点, 所以抗药性也不知道。为此, 我们用四种选择性培养平板。第一块平板含四环素25 $\mu$ g/ml; 第二块平板含氨苄青霉素100 $\mu$ g/ml; 第三块是四环素和氨苄青霉素混合, 剂量是四环素25 $\mu$ g/ml、氨苄青霉素100 $\mu$ g/ml; 第四块不含任何抗菌素, 作为对照。各取0.1ml接种到不同选择性培养平板上培养, 结果氨苄青霉素平板及混合的第三块平板无菌落生长, 四环素平板上有三个菌落。把三个菌落进一步划线单菌落培养, 得到三株抗冻蛋白基因重组质粒的菌落。至此, 我们可以得出结论, 抗冻蛋白基因可插入PBR 322质粒的PstI的内切酶切点。

4. 抗冻蛋白基因重组质粒的快速抽提和鉴定。从选择培养平板上筛选出的三个菌株, 初步确定为含有抗冻蛋白基因的重组质粒, 但是还要进一步证实大肠杆菌C<sub>600</sub>中的重组质粒确是抗冻蛋白基因的重组质粒, 必须抽出质粒进行电泳鉴定。快速抽提质粒步骤是: 将转化菌接种到5 ml BL培养剂中培养, 静止过

夜。次日将5 ml接种的菌液加入200ml BL培养剂中, 并加四环素至25 $\mu$ g/ml的浓度, 37 $^{\circ}$ C振荡4—5小时, 到细菌生长对数期, 再加入氯霉素, 使培养液中的浓度为170 $\mu$ g/ml, 37 $^{\circ}$ C振荡过夜, 第三日把菌液离心(8000rpm 15分钟), 收集菌体。把离心后所得的菌体悬浮于4ml GET溶液中(葡萄糖50mM, EDTA 10mM Tris-HCl 25mM, pH 8)。加溶菌酶4 $\mu$ g/ml, 置冰浴中30分钟后加入NaOH, SDS 8 ml, 轻摇5分钟, 再加入3M NaAc 6 ml, 使pH为4.8。离心10000rpm 20分钟。取沉淀, 弃上清液。将沉淀物加入2 ml TE缓冲液(50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8), 溶解, 经Sephrose 2 B柱层析, 收集第一峰(图2)即为质粒DNA。

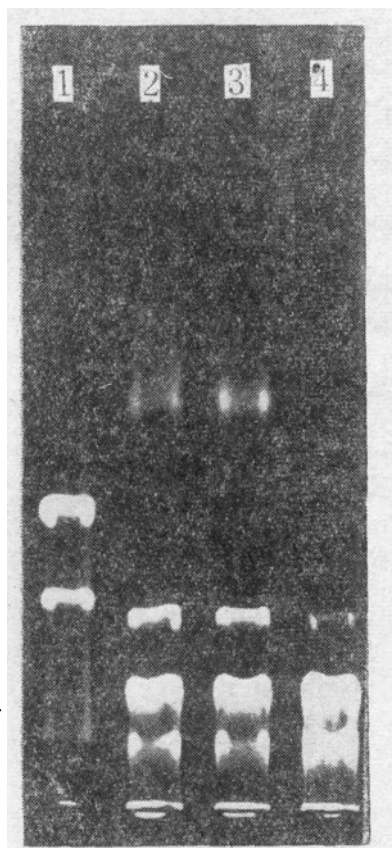


图2 琼脂糖凝胶电泳 (电压30V)  
1. PBR322电泳图谱; 2, 3, 4分别为从三个不同的转化菌株中抽提出的重组质粒电泳图谱, 与图1第4条带抗冻蛋白基因重组质粒对比完全一致。

最后进行琼脂糖凝胶平板电泳鉴定。电泳方法如前，得到三个电泳图谱；与加拿大引进的重组质粒电泳图谱（图 1）对照，二者完全吻合，证明抗冻蛋白基因重组质粒已转化到大肠杆菌，得到含有抗冻蛋白基因质粒的大肠杆菌株。

抗冻蛋白季节性的出现可能与环境因子光照、温度<sup>[4]</sup>和垂体激素的活动<sup>[2,6]</sup>有关。冬鲱抗冻蛋白的合成及其基因表达的研究，将提供一个很好的研究基因调控系统。如果把这种基因作为外源基因供体，整合到另一种动物的基因组内，将外界环境和该基因的表达变化联系起来，对研究基因的调控是有意义的。

如果把抗冻蛋白基因引入某些不抗寒的鱼类基因组中，是否会进行表达而获得一种新的抗冻鱼类品种，这无疑是既有理论意义也有很

大的经济价值。

抗冻蛋白基因在大肠杆菌中大量的复制，充分提供了实验所必须的基因，为上述这些设想提供了物质保证。

### 参 考 文 献

- (1) Duman, J.G. and A.B. Devries, 1974. *Nature* 247:237—238.
- (2) Hew, C.L., Liunardo, N. and C.L. Fletcher, 1974.
- (3) Hew, C.L. and C. Yip, 1976. *Biophys Res. commun* 71:845—850.
- (4) Duman J.G. and A. B. Devries, 1974, *J. Exp. Zool.* 190:89—98.
- (5) Peter, L.D. and L.H. Choy, 1980. *J. Biologychem.* 255:8279—8734.
- (6) Fletcher, C. L., 1977. *Can. J.Zool.* 55: 789—795.

## TRANSFORMATION AND AMPLIFICATION OF RECOMBINANT PLASMID CONTAINING ANTIFREEZE PROTEIN GENES

Xu Quanhan

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica*)

Qian Biao

(*Institute of Biochemistry, Academia Sinica*)

### Abstract

Some of the plasmid containing antifreeze protein genes were assayed by agarose gel electrophoresis and others transformed into the *E. coli* C<sub>600</sub>. It was amplified in the BL-medium and then purified by speed-extraction method. The plasmid DNA extracted was characterized by agarose gel electrophoresis again, showing that the plasmid containing antifreeze protein genes has been transformed into the *E. coli* C<sub>600</sub> and amplified.