

# pGV 3850 载体系统的改进研究

杨又徐 吴柏桦

(武汉大学病毒学及分子生物学系, 武汉, 430072)

位于 pGA 472 上的 *nos-npt* 基因片段, 经 *Hind* III/*Sal* I 双酶完全消化, 克隆到 pBR322 的 *Hind* III/*Sal* I 位点, 将这一重组 DNA 转化 *E. coli* HB101, 在 pGJ 28 和 R64 drd11 的 *mob* 功能和 *tra* 功能的帮助下, 经重组后带有卡那霉素抗性基因的 pBR 322 可以进入农杆菌中, 并经同源重组整合到农杆菌质粒 pGV 3850 的 T-DNA 区。这样得到的是一个改良的 pGV3850 系统。它除了具有 pGV 3850 系统原有特点之外, 还具有一个新的特点: 在中间载体 pBR 322 上带有 *Km<sup>r</sup>* 标记基因, 这就为能克隆到 pBR322 上的任何不带有标记的基因提供标记, 便于转化后的筛选。

**关键词:** pGV3850, Ti 质粒, pBR322, *Km<sup>r</sup>* 基因

pGV 3850 载体系统是目前应用较为广泛的一种向植物转移外源基因的转移载体。此系统包括 pGV 3850, pBR 322 及辅助质粒。pGV 3850 有如下特点<sup>[1]</sup>: (1) 具有 T-DNA 边缘区及 T-DNA 以外的 Ti 质粒全部 DNA 序列; (2) T-DNA 中致癌基因缺失, 转化植物细胞可以正常分化; (3) 缺失的 T-DNA 由 pBR 322 序列代替, 因此便于与 pBR 322 克隆进行同源交换, 成为多功能接受载体 (versatile acceptor vector); (4) 保留 BR 附近的胭脂碱合成酶 (NOS) 基因, 其活性可作转化细胞的标记。本实验的目的在于赋予 pGV 3850 系统一个简便易行而又灵敏的选择标记。

## 材料与方 法

### (一) 主要化学试剂及用品

琼脂糖 (电泳用): 上海东海制药厂生产; *Sal* I 内切酶, *Hind* III 内切酶, T4DNA 连接酶: 华美公司生产; 溶菌酶: 上海东风生化试剂厂生产; 硝酸-醋酸混合纤维素酯微孔滤膜;  $\phi 60\text{mm}$ , 孔径  $0.22\mu\text{m}$ , 上海医药工业研究所生产。

### (二) 主要培养基及缓冲液

LB 培养基<sup>[1]</sup>; NB 培养基<sup>[2]</sup>; Z-LB 培养

基<sup>[1]</sup>; TBE 电泳缓冲液<sup>[3]</sup>; Medium-Salt Buffer<sup>[3]</sup>; High-Salt Buffer<sup>[3]</sup>; T4DNA Ligation Buffer<sup>[3]</sup>;  $\lambda$ dil Buffer<sup>[2]</sup>。

### (三) 实验菌株

*E. coli* V. 12: 含有 pBR 322, *Amp<sup>r</sup>*, *Tet<sup>r</sup>*, 来自中科院武汉病毒所; *E. coli* MC 1000; 含有 pGA 472, *Km<sup>r</sup>*, *Tet<sup>r</sup>* 美国 G.An 赠送; *E. coli* HB 101: 来自中科院武汉病毒所; *E. coli* GJ 23: 含有 pGJ 28, R 64 drd11, *Km<sup>r</sup>*, *Nm<sup>r</sup>*, *Str<sup>r</sup>*, *Tet<sup>r</sup>*, 来自比利时 M. Van Montagu 赠送; *A. tumefaciens* C 58: 含有 pGV 3850, *Rif<sup>r</sup>*, *Amp<sup>r</sup>*, 来自中科院遗传所。

### (四) 抗菌素应用浓度

Ampicilin:  $50\mu\text{g/ml}$ ; Kanamycin:  $50\mu\text{g/ml}$ ; Tetracyclin:  $15\mu\text{g/ml}$ ; Streptomycin:  $25\mu\text{g/ml}$ ; Rifamycin:  $50\mu\text{g/ml}$ 。

### (五) 实验方法

1. 载体 pBR 322 和目的基因供体 pGV 472 的制备 采用 SDS-NaOH 法<sup>[4]</sup> 制备质粒。

2. 重组 DNA 实验 按照文献 [1] 中方

Yang Youxu et al.: The Improvement of Ti Plasmid Vector System pGV3850

本文于 1989 年 11 月 16 日收到。

法进行,先用 *Hind* III 酶消化,将消化物用苯酚-氯仿-异戊醇程序抽提,经乙醇沉淀后,再用 *Sal* I 酶消化,之后,仍用苯酚-氯仿-异戊醇程序抽提,乙醇沉淀的 DNA 再进行酶连接反应。将 pBR 322、pGA 472 及其混合物以及它们的酶消化结果一同做 0.7% 琼脂糖凝胶水平电泳。

3. 重组 DNA 对 *E. coli* HB 101 的转化试验  
按照文献 [1] 中的转化大肠杆菌的方法进行。转化子用含 Amp. Km 的 LB 平板筛选。

4. 转化子的鉴定 用 SDS-NaOH 法<sup>[1]</sup> 抽提转化子培养物的质粒,与 pBR322, pGA472 同时在 0.7% 琼脂糖中电泳。

5. 转化的 *E. coli* HB 101 和 *E. coli* GJ23 的接合反应 按照文献 [2] 中的方法进行。接合子在含有 Amp. Vm. Tet. Str 的 LB 平板上筛选。

6. 接合子的鉴定 在含 Amp. Km. Tet. Str 的 LB 培养基上只有接合子生长, *E. coli* HB 101, 转化的 *E. coli* HB 101 及 *E. coli* GJ 23 均不能生长。用 SDS-NaOH 法<sup>[1]</sup> 抽提接合子质粒,并将抽提物与 pBR 322, pGA 472 同时做 0.7% 琼脂糖凝胶电泳。

7. 接合子与农杆菌的接合反应 按照文献 [2] 中的方法进行。转化的农杆菌在含 Rif. Amp. 的 LB 平板上筛选,未转化的农杆菌及接合子均不能在这种培养基上生长。

## 结果与讨论

### (一) 重组 DNA

重组的 pBR 322 是将位于 pGA 472 上的 *nos-npt* (II) 片段用 *Hind* III/*Sal* I 双酶完全消化后,克隆到 pBR 322 的相应位点得到的。pBR 322 上的 *Hind* III/*Sal* I 区是 *Tet*<sup>r</sup> 基因所跨区域,所以 *nos-npt* (II) 基因的克隆使得 pBR 322 由 *Tet*<sup>r</sup> 转变成 *Tet*<sup>s</sup>, 由 *Km*<sup>r</sup> 转变为 *Km*<sup>s</sup>。因此,在含有 Amp 及 Km 的平板上可筛选到含重组质粒的转化子。

pBR 322 上的 *Hind* III/*Sal* I 片段为 0.6 Kb, pGA 472 上的 *nos-npt* (II) 区域约为

3.0Kb,经重组的 pBR 322 较之去除 *Hind* III/*Sal* I 片段的 pBR 322 增大了约 2.4Kb,即约有 6.7Kb (图 1,2)。

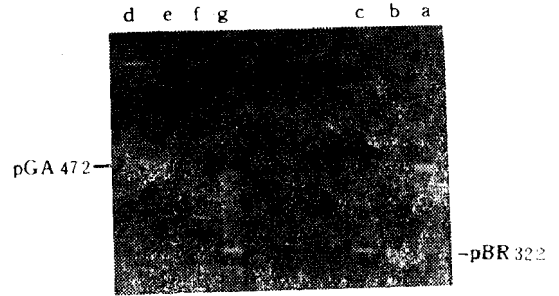


图 1 pBR322、pGA472 酶解电泳结果

a. pBR322 (4.3Kb); b. pBR 322 经 *Hind* III 消化; c. pBR 322 经 *Hind* III/*Sal* I 双酶消化; d. pGA 472 (15.6kb); e. pGA 472 经 *Hind* III 消化; f. pGA 472 经 *Hind* III/*Sal* I 双酶消化; g. pBR 322 和 pGA 472 经 *Hind* III/*Sal* I 双酶消化(混合消化)

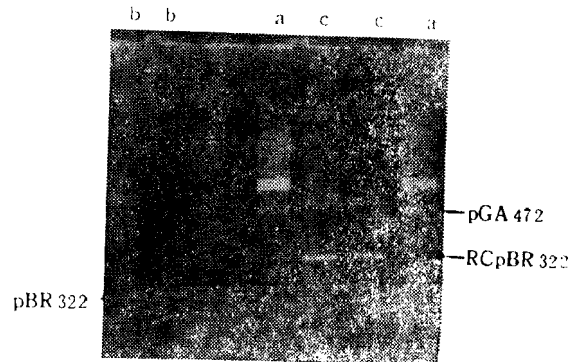


图 2 pBR 322, PGA 472, 和重组的 pBR 322 的电泳结果

a. pGA472 (15.6Kb); b. pBR 322(4.3Kb); c. 重组的 pBR 322(~6.7Kb)

### (二) 接合子的鉴定

用重组的 pBR 322 转化的 *E. coli* HB 101 与含有辅助质粒 pGJ 28 和 R64 drdII 的 *E. coli* GJ23 进行结合反应时, *E. coli* GJ23 的两个质粒进入 *E. coli* HB101, pGJ28 具有 *Km*<sup>r</sup>, *Nm*<sup>r</sup>, R64 drd II 具有 *Tet*<sup>r</sup>, *Str*<sup>r</sup>, 重组的 pBR 322 携有 *Amp*<sup>r</sup>, 因此,接合子具有 5 种抗性。因而能在含有 Amp、Km、Tet、Str 的 LB 平板上筛选到这一结合反应的结果。由于 *E. coli* HB101 的 *rec*<sup>-</sup> 特性,这三种质粒在接

合子中能相容并存,并且不相互重组。

结合子的筛选见图 3。结合子质粒的电泳结果见图 4,可看到相距一定距离的三条带。

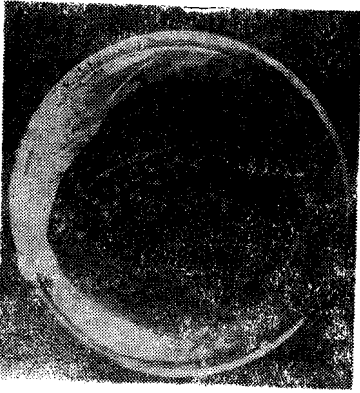


图 3 生长在含有 Amp. Km Tet. Str. 的 LB 平板上的接合子

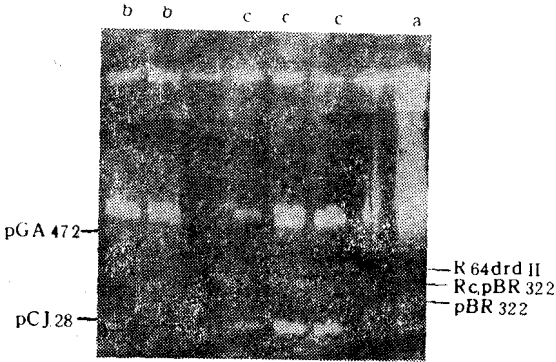


图 4 pBR322, pGA472 和接合子质粒的电泳结果

a. pBR322(4.3Kb); b. pGA 472 (15.6Kb); c. 接合子质粒抽提物: 包括重组的 pBR 322 (~6.7Kb), pGJ 28 (1.9Kb) 和 R64 drdII (9.7Kb), 质粒用 SDS-NaOH 法抽提

### (三) 转化农杆的结果分析

在结合子 *E. coli* HB 101 与含有 pGV 3850 的农杆菌进行结合反应时,接合子中的三种质粒: 重组的 pBR 322、pGJ28 及 R 64 drdII, 在 pGJ 28 提供的 mob 功能及 R 64

drdII 提供的 tra 功能的反式作用下,进入农杆菌中。这三种质粒在农杆菌中的命运各不相同: R64drdII 在其中不能稳定存在,pGJ28 和 pBR322 不能复制,但是重组的 pBR322 可以通过它与农杆菌中的质粒 pGV3850 上的同源序列的重组整合到 pGV3850 上,从而得以生存、复制、表达。因而在含有 Rif. Amp. 及 Km 的 LB 平板上筛选得到的一定是转化的农杆菌。其中的  $Km^r$  来自重组的 pBR322。转化结果见图 5。

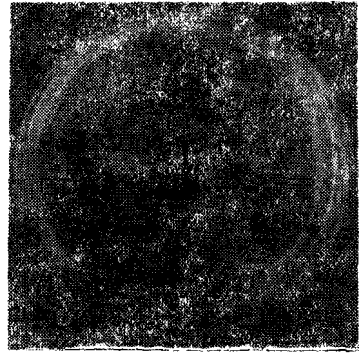


图 5 生长在含有 Rif 及 Amp 的 LB 平皿上转化的农杆菌

### (四) 结论

上述结果说明: 得到一个改进的 pGV 3850 系统,在中间载体的适当位置插入 *nptII* 基因,此中间载体与外源基因和 pGV 3850 同源交换后使 pGV 3850 具有  $Km^r$  标记,因而为转化的植物细胞提供一个有用的选择标记。

### 参 考 文 献

- [1] 北京大学生物系遗传学教研室: 1983. 遗传学实验方法和技术, 高等教育出版社,第 77—81 页。
- [2] Glover, D. M.: 1985. *DNA Cloning*, Vol.11, A Practical Approach, IRL, Oxford, Washington DC, p. 77—81.
- [3] Maniatis, T., E. F. Fritsch, L. Sambrook: 1982. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, CSH, p. 125, 156, 246, 453.
- [4] Zambryski, P. et al.: 1983. *EMBO J.*, 2: 2153—2160.