

研究报告

琥珀酸弧菌L-天门冬酰胺酶基因的初级克隆和表达

关颖谦 陈剑民 彭惠林 何云生 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

黄英星

(美国北卡罗里那大学肿瘤中心)

本文以表达型噬菌体 λ gt11为载体, 以及 125 I标记的放射免疫抗体为探针, 从EcoR I酶切的琥珀酸弧菌(*Vibrio succinogenes*)染色体DNA片段中克隆得到携带天门冬酰胺酶基因的目的片段, 在宿主菌*E. coli* Y 1090中得到表达。经酶解和凝胶电泳分析表明该插入DNA片段的分子量为5.8kb。重组DNA感染另一宿主菌*E. coli* Y1089后所产生的酶蛋白具有L-天门冬酰胺酶活力。用重组DNA(λ gt11-AS8)为探针进行Southern DNA杂交, 琥珀酸弧菌染色体DNA的EcoR I酶切片段中, 出现一条位置在5.8kb处的杂交带, 证明我们克隆到的携带L-天门冬酰胺酶基因的目的片段来自琥珀酸弧菌。

关键词 弧菌; L-天门冬酰胺酶; 载体 λ gt11; 基因克隆和表达

微生物L-天门冬酰胺酶对多种癌症如白血病、淋巴肉瘤和癌肉瘤等均有疗效^[1,2], 对各种急性白血病效果最佳。与其他化疗药物相比较L-天门冬酰胺酶的效果最为显著, 但国内没有药源, 其临床使用受到限制。孟广震等^[3]在70年代曾试用他们自己筛选的大肠杆菌进行发酵生产L-天门冬酰胺酶, 但因产酶能力低, 提炼困难未能投产。因此我国一直靠进口L-天门冬酰胺酶供临床之需, 每年需消耗大量外汇。

60年代以来治疗应用L-天门冬酰胺酶系来自大肠杆菌, 疗效虽好但有一定的副作用^[4], 即影响患者的肝脏和免疫系统的正常功能。近年来发现能产生较多的L-天门冬酰胺酶的菌种还有胡萝卜软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)^[5]。粘质赛氏杆菌(*Serratia marcescens*)^[6]和琥

珀酸弧菌(*Vibrio succinogenes*)等。其中弧菌^[7]的酶制剂专一性较高, 且副作用小, 动物实验表明对脾脏、肝脏的功能无显著影响。但弧菌系厌氧菌^[8], 酶的产量很低^[9-11]。为此我们试图采用基因工程技术, 提高弧菌L-天门冬酰胺酶的产量, 为我国开辟新的高效低毒治疗白血病的酶制剂药源。本文报道弧菌L-天门冬酰胺酶基因的初级克隆工作。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌种: 本文所用菌种和溶源菌株见表1。

本文于1987年3月15日收到。

承蒙上海生化所周光宇教授实验室和上海细胞生物所匡达人实验室支援了一些生化试剂, 在此一并致谢。

2. 培养基和条件:

大肠杆菌Y1088、Y1090和Y1089的培养基为胰蛋白胨1%, 酵母粉0.5%、氯化钠1%、pH7.5、氨苄青霉素50 μ g/ml

(过滤灭菌)、培养温度为37 $^{\circ}$ C。

大肠杆菌BHB2688、BHB2690培养基同上, 不加氨苄青霉素, 培养温度30 $^{\circ}$ C, 诱导噬菌体温度42 $^{\circ}$ C。

表 1 菌种和噬菌体
Table 1 Strain and phage

菌 种 Strain	基 因 型 Genotype	用 途 Use	文 献 Reference
噬 菌 体 λ gt11	<i>lac</i> 5 Δ (shind) λ 2-3) <i>srl</i> λ 3' c I 857 <i>srl</i> λ 4' <i>nin</i> 5 <i>srl</i> λ 5' <i>sam</i> 100	制备溶源菌 Y1090/ λ gt11 和 λ gt11DNA	(12)
大肠杆菌 Y1088	<i>sup</i> ^R <i>sup</i> ^F <i>met</i> ^B <i>trp</i> ^R <i>hsd</i> ^R - <i>hsd</i> ^M + <i>ton</i> A21 <i>pro</i> c Tn3- (pMC9) pMC9=pBR322- <i>lac</i> I ϕ	受体菌用于文库扩 增和保存	(12)
大肠杆菌 Y1090	(Δ <i>lac</i> U169 <i>pro</i> A ⁺ <i>lon</i> ara D139 <i>str</i> A <i>sup</i> F (<i>trp</i> c22::Tn10) (pMC9)	受体菌用于重组子 表达	(12)
大肠杆菌 Y1089	Δ <i>lac</i> u 169 <i>pro</i> A ⁺ Δ lon ara D139 <i>str</i> A <i>hfl</i> A 150(chr::Tn10 (pMC9)	受体菌用于制取重 组DNA溶源菌	(13)
大肠杆菌 溶源菌株 BHB2688*	(N 205 <i>rec</i> A ⁻ (λ imm 434, <i>Clt</i> s 857 b2 <i>red</i> ⁻ <i>Eam</i> 4 <i>Sam</i> / λ)	制备噬菌体包装蛋白 (<i>Eam</i>)	(14)
大肠杆菌 溶源菌株 BHB2690*	(N 205 <i>rec</i> A ⁻ (λ imm 434, <i>Clt</i> s 857 b 2 <i>red</i> ⁻ <i>Dam</i> 15 <i>Sam</i> 7/ λ)	制备噬菌体 包装蛋白 (<i>Dam</i>)	(14)
琥珀酸弧菌 (<i>Vibrio suc-</i> <i>cinogenes</i>)**	不明	制备供体DNA 制取L-天门冬 酰胺酶及其抗体	(8) (15)

* 由中国科学院上海生化所周光宇教授惠赠

** 由美国 Rutgers 大学 Kafkewitz 教授惠赠

3. 主要生化试剂:

限制性核酸内切酶E coR I 是 BRL 和华美公司产品。牛肠磷酸脂酶 (CIP) P. L. Biochemical Co. 产品。Na¹²⁵I 北京原子核所产品。T4DNA 连接酶、HindIII 内切酶、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、NACS柱均系BRL产品。硝酸纤维膜系 Schleicher和Schuell, Inc产品

和浙江黄岩人民化工厂产品。Sephadex G50 系 Pharmacia 产品。³²P- α -ATP 系 Amersham 产品。

(二) 实验方法

1. 载体的选择和基因克隆的技术路线: 我们采用表达型载体 λ gt11^[16]进行分离琥珀酸弧菌L-天门冬酰胺酶基因。外源DNA插入在 λ gt11载体上编码 β -半乳糖

苷酶的结构基因lacZ内的EcoRI位点,即以融合蛋白的形式表达。此外, λ gt11具有CI857基因型,可用热诱导的方法控制细菌的生长,以调节外源DNA的表达。与 λ gt11表达型载体配套的受体菌的特点有:(1)宿主大肠杆菌Y1088^[12]具有hsDR⁻和hsDM⁺标记,防止外源DNA在修饰前即被降解,保证外源基因的稳定,有利于文库扩增和保存。其lacI⁺基因所产生的乳糖操纵子阻遏蛋白可以防止外源基因过早地表达,以使宿主细胞和噬菌体正常生长,经IPTG诱导lacZ结构基因即表达。(2)宿主大肠杆菌Y1090^[12]中除具有与Y1088相同的性能外,还有一个 Δ lon突变,增强了融合蛋白在宿主中的稳定性,保证了重组DNA的高效表达,便于检出。(3)宿主菌Y1089^[13]具有hflA150基因型,可促使噬菌体溶源性以高频率出现。

由于上述 λ gt11载体系统的优越性,我们采用这一载体进行琥珀酸弧菌L-天门冬酰胺酶的初级克隆和表达。主要流程见图1。

2. 琥珀酸弧菌L-天门冬酰胺酶的提纯和抗体制备: 琥珀酸弧菌的培养基和培养条件均按照Katkewitz等^[9]的方法。L-天门冬酰胺酶的提纯和抗体制备按Dis-tasio等^[10]的方法进行。

3. λ gt11载体DNA的制备: 溶源菌Y1090/ λ gt11活化和活力鉴定以及 λ gt11 DNA的抽提和纯化分别按照Maniatis等^[14]、Schleif和Wensink等^[17]的方法进行。

纯化的 λ gt11 DNA于42℃退火^[18],经EcoRI完全酶解5h、牛肠磷酸二脂酶脱磷^[18]以减少载体DNA的自身环化。

4. 弧菌染色体DNA的抽提和纯化: 收集37℃厌氧培养的琥珀酸弧菌菌

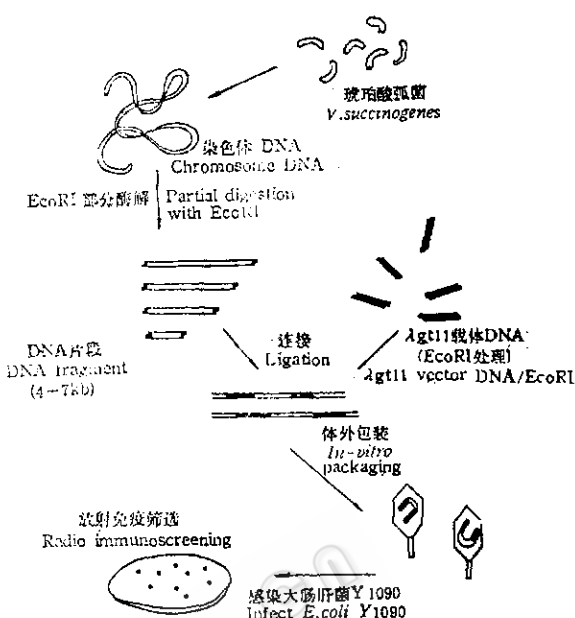


图1 L-天门冬酰胺酶基因克隆流程图

Fig. 1 Scheme for L-asparaginase gene cloning

体,转入提取缓冲液(50mM Tris pH8.0 缓冲液、10mMEDTA)使成均匀菌悬液。用SDS(十二烷基磺酸钠,终浓度1%)与链霉菌蛋白酶E(终浓度200μg/ml)、在50℃裂解。继以苯酚:氯仿:异戊醇=25:24:1反复抽提,乙醇沉淀。用玻棒搅出丝状DNA,经70%乙醇洗涤、抽干、溶于低渗缓冲液SSC中。加纯净核糖核酸酶(终浓度100μg/ml)。重复上述苯酚:氯仿:异戊醇抽提和乙醇沉淀等步骤。将如此获得的纯净DNA溶解于TE缓冲液(10mM Tris-HCl-0.1mM EDTA, pH 7.4)中,贮藏于-20℃备用。

5. 目的DNA“4—7kb”片段的制备: 按标准方法^[14]先做确定EcoRI部分酶切用酶量的预备试验,然后进行放大。DNA酶解片段经0.7%琼脂糖平板凝胶电泳后,切取4—7kb DNA片段的凝胶部分进行电洗脱^[14]收集电洗脱液。通过RPC-5柱或CHCl₃-异戊醇抽提等纯化步骤后

的DNA即可供重组试验用。

6. 包装蛋白的制备和包装效价的检定: 按文献[14]的方法进行。

7. 连接反应、体外包装和文库扩增: 按Maniatis的方法^[14]将各经EcoRI酶切后产生互补的粘性末端“4—7kb”的目的DNA片段和载体 λ gt11DNA进行连接。连接反应液在0.4%琼脂糖凝胶上检查连接质量, 如连接完全, 即可进行体外包装。

体外包装^[14]用分别从大肠杆菌BHB 2688和BHB2690制备的包装蛋白包装上述连接好的DNA。

文库扩增^[13]是用双层平皿法^[17]把包装好的噬菌体感染大肠杆菌Y1088, 后与X-gal (终浓度2.5 μ g/ μ l) 和IPTG (终浓度5 mM) 混合均匀, 铺浇上层^[17], 在42℃培养8—12h或过夜。平皿上即出现透明的重组噬斑。在 λ gt11DNA的EcoRI切点插入了“外源”DNA片段后, 破坏了lac Z基因, 使 β -半乳糖苷酶失去活性, 不能再与其底物X-gal起蓝色反应, 故形成无色透明噬斑, 有别于没有外源DNA插入的 λ gt11蓝色噬斑。从大肠杆菌Y1088平皿上挑出透明重组噬斑转入SM缓冲液, 并加入0.3%CHCl₃, 4℃过夜, 离心后取上清液按4%比例(V/V)加入氯仿, 4℃保存。

8. 编码L-天门冬酰胺酶的基因片段(目的片段)的分离: 取扩增后的基因文库或包装后的反应液, 稀释到适当浓度, 感染大肠杆菌Y1090。用同位素标记的免疫探针方法检测目的蛋白。用IPTG饱和并凉干的硝酸纤维素膜(NC膜)复印在Y1090平皿上, 开始长出噬斑。菌细胞裂解释放出的抗原就固定于NC膜上。以纯化的IgG和¹²⁵I-蛋白A相继处理NC膜, 目的蛋白与IgG、¹²⁵I-蛋白A结合成抗原-抗体复合物, 用放射自显影可检测得

到带有所需目的基因片段的克隆株。

9. L-天门冬酰胺酶活性的化学测定: 基本上按照Wade和Phillips^[18]的方法加以改进的微量快速比色法进行。

实验结果

(一) 琥珀酸弧菌染色体DNA及“目的”DNA片段的制备

基因克隆需要高度纯化的DNA, 琥珀酸弧菌过夜培养物提纯的染色体DNA紫外吸收曲线具典型核酸吸收特征, $A_{260}/A_{280} = 2.2$, 说明其纯度已能满足基因克隆的要求^[16]。将此纯化的染色体DNA, 用EcoRI酶进行部份酶切后经凝胶电泳和电泳洗脱收集4—7kb左右的DNA片段, 并经进一步纯化和电泳鉴定, 结果见图版I-2。

(二) 载体 λ gt11DNA的制备

我们用柱层析代替氯化铯密度梯度超速离心纯化 λ gt11 DNA, 用不同的核酸内切酶进行酶解后的凝胶电泳结果(图版I-3)与Young和Davis^[16]所得的 λ gt11的物理图谱相符, 说明我们制备的 λ gt11 DNA是达到克隆工作要求的。

纯化的 λ gt11DNA经退火后, cos顺序相连。经EcoRI酶切后形成19.6kb的左臂和24.1kb的右臂, 再经CIP处理, 用T4DNA连接酶连接后其自身环化的比例仅为0.1%左右。用完整的 λ gt11DNA分子进行体外包装, 每微克DNA可达 10^7 — 10^8 pfu。以上数据都表明所制备的 λ gt11 DNA纯度高, cos顺序完整, 有侵染宿主菌活力。

(三) 包装蛋白的鉴定

应用 λ 噬菌体进行基因克隆需要高效价的包装蛋白。我们分别用不同的 λ DNA进行体外包装试验, 效价均在每微克 10^7 — 10^8 pfu之间, 说明我们制备的包装

蛋白达到克隆工作的要求。

(四) 载体 λ gt11DNA和4—7kb“外源”DNA的连接与重组噬斑出现频率

λ gt11的单一EcoR I 切点,最多可插入7.2kb的外源DNA^[18],据此,我们用具有EcoR I粘性末端的4—7kb的外源DNA与经退火、EcoR I 酶切、CIP处理的 λ gt11载体连接。我们共进行了三次连接反应,分别进行体外包装。从每包装取1/10量的DNA感染宿主大肠杆菌Y1088后从出现的蓝色噬斑和无色透明噬斑的比例计算,重组效率三次平均为27%。

表2 重组噬菌体(λ gt11-AS)的L-天门冬酰胺酶活力

Table 2 L-Asparaginase activities of recombinant phages(λ gt11-AS)

菌株 Strain	L-天门冬酰胺酶活力 Asparaginase activity(u/ml)	蛋白质 Protein(mg/ml)	L-天门冬酰胺酶比活力 Asparaginase specific activity(u/mg)
Y1090/ λ gt11-AS-3	3.0	2.52	1.19
Y1090/ λ gt11-AS-8	3.45	2.52	1.37
λ gt11	0.36	2.30	0.15

(六) 重组噬斑菌体 λ gt11-AS DNA的插入片段分析

从分离纯化的48个重组噬斑中随机挑选10个作进一步的DNA分析。由这些重组噬菌体制备DNA并进行琼脂糖凝胶电泳,证明所有10个重组噬菌体的DNA分子量均比载体 λ gt11大。用EcoR I 对其中的5株进行酶切和凝胶电泳分析以确定包含有L-天门冬酰胺酶基因的插入片段的大小,结果表明插入的DNA片段的分子量均相同为5.8kb(图版I-4)即我们得到一个正克隆株。

(七) 从重组噬菌体 λ gt11-AS溶源化大肠杆菌验证正克隆

为了进一步验证所得的正克隆,我们又在具有高频率溶源化的另一株宿主菌(大肠杆菌Y1089)进行溶源化与诱导^[18],选得重组噬菌体溶源菌(Y1089/

(五) 目的基因的表达

为了简便手续,尽速筛到正克隆株,我们用包装后的重组分子直接感染大肠杆菌Y1090,用前述制备的¹²⁵I 标记的抗体探针检出融合蛋白,从56128个重组噬斑中得到9个带有目的基因片段的重组噬斑(称之 λ gt11-AS),见图2-A。图2-C是经过一次纯化的48个重组噬斑放射自显影的检测结果。

通过奈氏试剂化学比色法^[18]也证实了这些重组噬菌体具有天门冬酰胺酶的活性,见表2。

λ gt11-AS)。我们在这些高频溶源宿主菌大肠杆菌Y1089的裂解液中,用奈氏试剂测定法分析的结果(见图3),证明仍有L-天门冬酰胺酶活力存在。

此外,我们又通过DNA分子杂交方法^[14],以³²P标记的5.8kb片段为探针,识别到琥珀酸弧菌的染色体核酸分子中具有与L-天门冬酰胺酶同源的部分(图版I-1),这证明我们所克隆到的携带L-天门冬酰胺酶基因的目片段来自琥珀酸弧菌。

讨 论

1. 自从1983年Young和Davis成功构建 λ gt11表达型载体以来,由于这个载体系统的优越性许多生物学家^[10-23]都纷纷用之于各自的克隆工作中。我们在

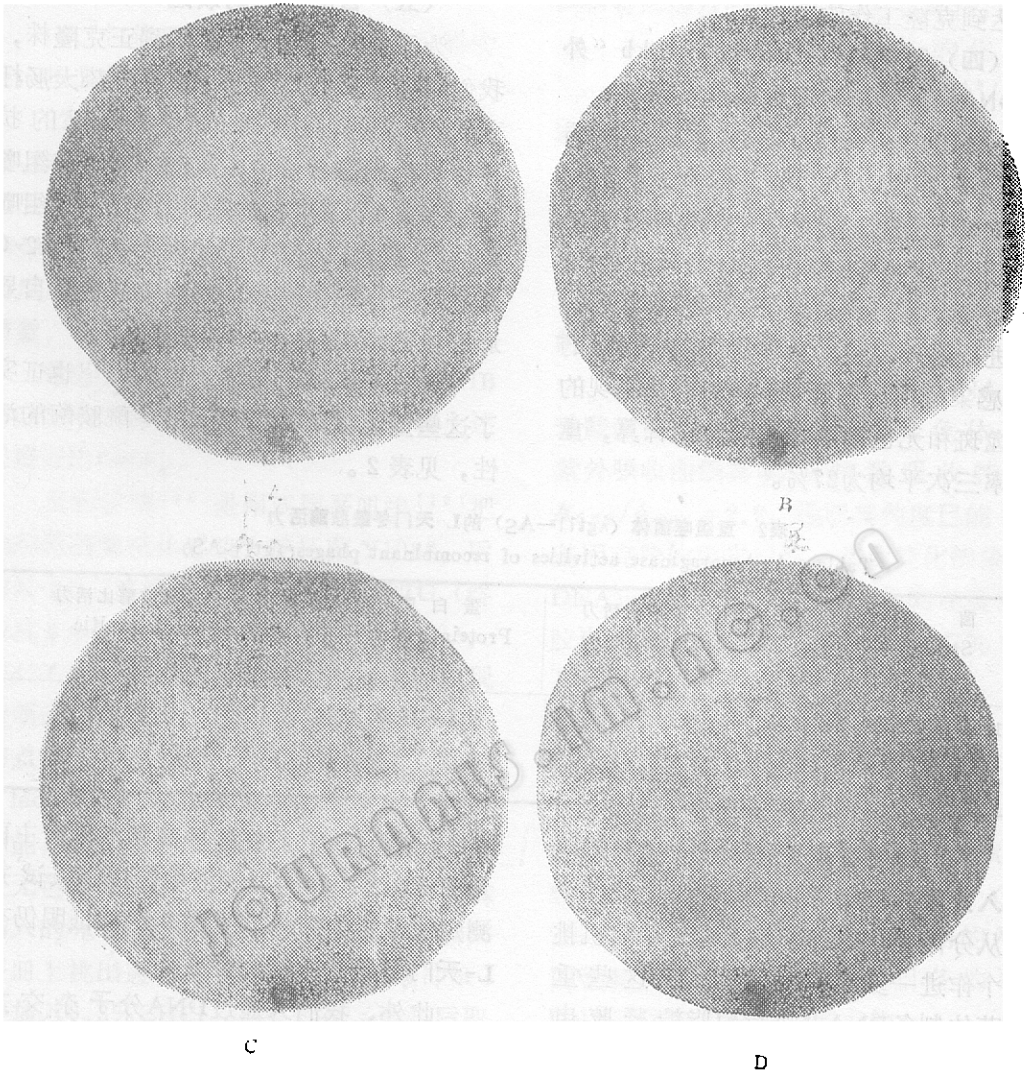


图2 放射免疫法筛选出的重组噬斑

Fig. 2 Recombinant plaques screened by radioimmunoassay

A. 重组噬菌体 recombinant phage λ gt11-AS-1 (6.25×10^2 pfu/plate)

B. D. λ gt11 (8.2×10 pfu/plate)

C. 重组噬菌体 recombinant phage λ gt11-AS-2 (6.0×10^2 pfu/plate)

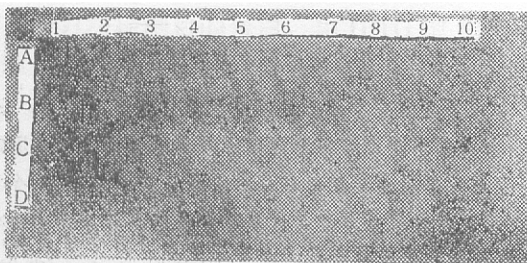


图3 重组噬菌体 λ gt11-AS溶源菌的L-天门冬酰胺酶活力

Fig. 3 L-Asparaginase activities of (λ gt11-AS) recombinant lysogens

B3. Y1089/ λ gt11-AS-3-4 B4. Y1089/ λ gt11-AS-3-7

B5. Y1089/ λ gt11-AS-8-5 B6. Y1089/ λ gt11-AS-8-6

B7. Y1090/ λ gt11

国内的条件下,应用此载体系统分离琥珀酸弧菌L-天门冬酰胺酶的基因。在实际工作中,我们体会到固然 λ gt11载体系统具有控制细胞生长,保证外源DNA和融合蛋白的稳定性,调节基因的高效表达等优点。为了重组DNA的高频率出现和融合蛋白高效率的表达,不但需要有高纯度的供体DNA和载体DNA,而且高效价的包装蛋白和高质量的抗体探针尤为重要。在条件具备的基础上,应用 λ gt11载体进行基因克隆和表达工作,尽管步骤多、周期长,但一次连接包装后,可获得上万(2—5万)的重组噬斑,辅以灵敏度高的放射免疫探针,即可较稳地筛到正克隆。为此我们认为用鸟枪法从染色体DNA中克隆某一特定基因, λ gt11是一个良好的载体系统。

2. Young和Davis的工作^[13]指出以 λ gt11载体构建重组子的表达效率,不但取决于所插入外源DNA和 β -半乳糖苷酶的转录方向是否一致,而且插入的DNA要与半乳糖苷酶结构基因lacZ的读码框架相符。我们以琥珀酸弧菌染色体DNA的4—

7kb大小的片段与 λ gt11连接并进行体外包装,放射免疫探针、化学测定和凝胶电泳分析等一系列实验,证明我们已分离到编码L-天门冬酰胺酶的基因,DNA长约5.8kb,且可推论此片段的插入方向可能和 β -半乳糖苷酶的转录方向是一致的,且具有与lacZ相符的读码框架,因而得以表达。另一种可能是插入的5.8kb片段较大,其本身带有启动子和SD顺序能进行转录和翻译,这些工作有待今后进一步深入。

3. 在本工作进入筛选时,看到Gilbert^[28]等从菊欧文氏菌(*Erwinia chrysanthemi*)中分离到编码L-天门冬酰胺酶的基因片段,长为4.7kb。我们从琥珀酸弧菌染色体DNA通过不同的载体系统,获得编码L-天门冬酰胺酶的基因片段,长为5.8kb。从这两种细菌来源获得的L-天门冬酰胺酶基因片段都是用EcoRI切下,但其DNA片段长度各不相同。推测不同来源的L-天门冬酰胺酶基因结构很可能是不相同的。当然这一结论尚有待于以后的次级克隆、酶切图谱和核苷酸顺序分析等的结果加以肯定。

参 考 文 献

- [1] Abuchowski, A. and Davis, F.: *Souble Protein Polymer Adducts in Enzyme as Drugs*, ed. J. S. Helcenberg and J. Roberts, J. Wiley and Sons Press, N. Y. p367, 1981.
- [2] Distasio, J. A. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 155:528, 1977.
- [3] 孟广震等:微生物学报, 13:102—106, 1973.
- [4] Darden D. L. and Distasio, J. A.: *Int. J. Cancer*, 27:59—65, 1981.
- [5] Liu, F. S. and Zajic, J. E.: *Canadian J. Microbiol.*, 18:1953—1957, 1972.
- [6] Boyd, J. W. et al.: *J. Bacteriol.*, 106:578—587, 1971.
- [7] Durden, D. L. and Distasio, J. A.: *Cancer Res.*, 40:1125, 1980.
- [8] Wolin, N. J. et al.: *J. Bacteriol.*, 81:911—917, 1961.
- [9] Kafkewitz D. and Goodman, D.: *Appl. Microbiol.*, 27:206—209, 1974.
- [10] Distasio, J. A. and Niederman, R. A.: *J. Biol. Chem.*, 251:6927—6933, 1976.
- [11] Abuchowski, A. et al.: *Prep. Biochem.*, 9:205—211, 1979.
- [12] Young R. A. and Davis, R. W.: *Science*, 222:778—782, 1983.
- [13] Huynh, R. A. et al.: in *DNA Cloning Techniques—A Practical Approach*, ed. David Glover, IRL Press, Oxford, 1—62, 1984.
- [14] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour

Laboratory, New York, 1982.

- [15] Albranes, E. and Kafkewitz, D.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 35:25—30, 1978.
- [16] Young, R. A. and Davis, R. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80:1194—1198, 1983.
- [17] Schleif, R. F. and Wensink, P. C.: *Practical Methods in Molecular Biology*, Springer-Verlag, N.Y., 27—33, 1982.
- [18] Wade, H. E. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 69:299—312, 1971.
- [19] Benfield, P. A. et al.: *Gene*, 39:263—267, 1985.
- [20] Johnson, L. M. et al.: *Cell*, 43:269—277, 1985.
- [21] Snyder, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:730—734, 1986.
- [22] Timmins, J. G. et al.: *Gene*, 39:89—93, 1985.
- [23] Young, R. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82(9) 2583—2587, 1985.
- [24] Gilbert, H. J. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 132:151—160, 1986.

PRIMARY CLONING AND EXPRESSION OF THE *VIBRIO SUCCINOGENES* L-ASPARAGINASE GENE

Guan Yingqien Chen Jianmin Pong Hueilin He Yunsheng Jiao Ruishen

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

Huang Engshang

(Cancer Research Center, Univ. of N. Carolina, U.S.A.)

L-Asparaginase gene was cloned from *Vibrio succinogenes* chromosomal DNA using the expression vector λ gt11, which allowed the insertion of foreign DNA into the β -galactosidase structural gene lac Z, thus promoted the synthesis of a hybrid protein. Recombinants were detected by radioimmunological assay using purified anti-L-asparaginase IgG. Out of 56128 recombinant plaques, nine phages were shown to produce L-asparaginase antigen, indicating these recombinants carried the L-asparaginase gene.

DNA was extracted from 5 of these phages and found to contain the same 5.8kb EcoRI fragment(AS-8) by agarose gel electrophoresis. Hence, only one positive recombinant coding for L-asparaginase was cloned. Nessler reaction analysis performed on the recombinant phages showed positive color reaction which indicated that the expressed protein possessed L-asparaginase activity. Southern hybridization analysis indicated that sequence homology existed between the cloned 5.8 kb AS-8 DNA fragment and *V. succinogenes* chromosomal DNA.

Key words

Vibrio; L-asparaginase; vector λ gt11; gene cloning and expression

图 版 说 明

1. *V. succinogenes* 总DNA与³²P标记的 λ gt11-AS8 DNA间的Southern blot杂交
Southern blot hybridization
between chromosomal DNA of
V. succinogenes and ³²P labelled
 λ gt11-AS-8 DNA
A. *V. S* DNA + EcoR I
B. λ gt11-AS-8 DNA + EcoR I
C. λ gt11-AS-8 DNA
2. *V. succinogenes* DNA 经EcoR I 酶解后的琼脂糖凝胶电泳
Electrophoretic pattern of
V. succinogenes DNA digested
with EcoR I
a. *V. S* DNA
b. *V. S* DNA + EcoR I
c. *V. S* DNA (4—7kb fragments)
d. λ + Hind III (marker)
3. λ gt11 DNA经限制性内切酶消化后的琼脂糖凝胶电泳
Electrophoretic pattern of
 λ gt11 DNA digested with
restriction endonuclease
(a) λ gt11 DNA (b) λ gt11 DNA + EcoR I (c) λ gt11 DNA + Pst I (d) λ gt11 DNA + Hind III
(e) λ DNA + Hind III
4. 经EcoR I 酶解的重组噬菌体 (λ gt11-AS)DNA的电泳分析
Electrophoretic pattern of EcoR I —cleaved recombinant phages λ gt11-AS DNA
a. λ gt11-AS-12 b. λ gt11-AS-8 c. λ gt11 d. λ gt11 + EcoR I e. λ gt11-AS-8 + EcoR I
f. λ gt11-AS-12 + EcoR I g. λ + Hind III h. λ gt11-AS-13 + EcoR I i. λ gt11-AS-14 +
EcoR I j. λ gt11-AS-3 + EcoR I

Guan Yingqien et al.: Primary cloning and expression of the *Vibrio succinogenes* L-asparaginase gene

