

快速鉴定重组质粒菌落的新方法

董北

(康奈尔大学医学院医学系, 纽约)

阎锡蕴*

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

筛选含重组质粒菌落常用的方法有探针杂交、小规模制备质粒 DNA 进行限制酶切鉴定、 α 互补及插入失活。我们在此介绍一种新方法, 即半菌落 PCR 扩增法。该方法不仅可在 3h 内筛选出大量样品, 而且可同时鉴定插入基因的方向。与常规的方法相比, 它具有快速、准确、方便的优点, 亦可用于噬菌斑的筛选。

试验步骤如下:

1 半菌落细胞裂解

首先将琼脂培养板上待鉴定的克隆编号, 然后将每个克隆的一半移至装有 10 μ l 蒸馏水的试管内, 并在试管壁上标记相应的号码。均匀混合后于 -70 $^{\circ}$ C 冷育 15min, 开水煮沸 5min, 冷却至室温以备下一步使用。

2 PCR 扩增

在每个含有 10 μ l 细胞裂解物的试管内加

入 10 μ l PCR 反应混合液 (10 \times PCR 缓冲液 2 μ l, 2.5mol/L dNTP 1 μ l, 10pmol/L 引物各 1 μ l, Taq DNA 聚合酶 0.5unit, 加蒸馏水至 10 μ l)。均匀混合后加 20 μ l 矿物油覆盖于反应混合液之上, 进行 20 次扩增循环。每个循环条件应根据扩增 DNA 片段的大小及引物的 T_m 值而定。一般为 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min。

3 电泳分析

反应结束后, 取出 10 μ l DNA 扩增产物, 进行琼脂糖凝胶电泳分析。

当正确重组质粒确定之后, 将该克隆的另一部分 (保留在琼脂培养板上的) 进一步培养, 用于菌种保存、质粒制备以及 DNA 分析等后续工作。

* 联系人

1996-04-23 收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>