DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.02.021

(Tca) and in the mitochondria (Mca) of the cerebral cortex were determined and the effects of ketamine observed. It was found that 20 minutes after ischemia, the amount of EAA transmitters (Glu and Asp) in the brain tissue was decreased and it was further decreased after reperfusion. Tca and Mca were increased 20 minutes after ischemia and they were further increased, being higher than the level during ischemic stage and the control value, after reperfusion. Ketamine increased the level of EAA transmitters and decreased the level of Tca and Mca in the process of ischemia-reperfusion.

Key words ketamine; ischemia-reperfusion; calcium; excitatory amino acid transmitter; rabbit

用α-互补法筛选HPV DNA重组质粒

Selecting HPV-DNA recombinants by α-complementation

孙仁山 谭 骏* 李文维** (第三军医大学附属西南医院皮肤科) 重庆,630038

由于人乳头瘤病毒(Human Papillomavirus,HPV)与性病及宫颈癌的密切关系,使得有关HPV的研究不断增多,至今已分离鉴定了60多个HPV型别。我们在分离鉴定HPV-CA DNA时[1],为了获得HPV DNA重组质粒,成功地应用了α-互补原理(α-Complementation)进行筛选,该方法比快速破碎法有省时、简单、直观等优点,现报道如下:

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒及主要试剂

大肠杆菌JM103系本校遗传室保存菌种;载体PUC_{19}及X-gal(5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷)与IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)均购自华美生物工程公司。

1.2 方法与步骤[2]

1.2.1 常规制作含氨苄青霉素(0.1 mg/ml)的LB平板,待其凝固后,滴加20 mg/ml的X-gal 0.04 ml与0.25 mol/L的IPTG 0.016 ml。平板直径为11 cm。

1.2.2 用涂布棒将上述溶液均匀地涂布于培养基表面,在37℃孵箱里放置4 h,使X-gal的溶剂二甲基甲酰胺挥发干净。

1.2.3 接种0.1 ml转化菌至X-gal平板,待接种液被培养基吸收后,平板倒置,37℃条件下孵育12~16 h。

1.2.4 保存平板于4℃环境下数小时,使颜色显示充分。

1.2.5 观察结果、蓝白色菌落计数并以快速破碎法验证。

2 结果与讨论

大肠杆菌JM103的LacZ基因系一缺陷基因,因此它不能表达有活性的β-半乳糖苷酶。PUC_{19}含有部分LacZ基因,它所产生的α-肽(α-peptide)可与JM103的LacZ基因表达产物互补,产生有活性的β-半乳糖苷酶,该酶在IPTG诱导下,可代谢X-gal产生蓝色。当目的基因插入PUC_{19}的多克隆位点时,将不能产生α-互补,最后呈现的将是白色或无色菌落。

本实验菌落计数,得到比较清晰的蓝色菌落为284个;白色菌落为67个,二者之比大约为4∶1。经快速破碎法验证,大部分白色菌落的质粒载体含有插入片段;而蓝色菌落的质粒均为空载体。少部分白色菌落携带空的质粒载体,我们考虑与IPTG或/和X-gal涂布不均匀有关系。

α-互补法对比快速细胞破碎法,省去了细菌扩增、细菌破碎液电泳、紫外灯下观察等步骤;比插入失活法(Insertional Inactivation)也有简单、直观等优点。因此,在进行目的基因亚克隆时,α-互补法是一种值得推荐的重组子筛选方法。

关键词 α-互补;DNA重组;质粒

中图法分类号 Q343

参考文献

1 孙仁山,李文维,谭 骏.从尖锐湿疣中克隆人乳头瘤病毒基因组的初步研究.免疫学杂志,1993;9(1):27

2 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Identification and analysis of recombinants. In "Molecular Cloning". New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989:1.85~1.86

(收稿1995-08-02,修回1996-02-17)

(编辑 仇玉福)

* 基础部分子生物学教研室 重庆,630038

** 附属大坪医院皮肤科 重庆,630042

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net