

DNA 克隆载体的“三片段克隆法”改造策略

谢 锋, 朱 蕾, 尚广东

(江苏省生物多样性和生物技术重点实验室, 江苏 南京 210046)

[摘要] 将一个或多个 DNA 片段克隆至载体是分子生物学研究中最常用的技术之一. 本研究使用新颖的 Red/ET DNA 重组克隆技术原理一步法将结合转移片段 oriT、阿普霉素抗性基因 Am 和链霉素抗性基因 (spL) 克隆至常用的克隆载体 pBluescript KS(-), 同时去除载体的氨苄青霉素抗性基因 (bla). 此“三片段克隆法”简便、快速, 避免了经典的克隆策略常常难以寻找合适的限制性内切酶、长片段 PCR、暴露于紫外线和凝胶回收等步骤所可能引入的碱基突变等等难以克服的问题, 有可能成为通用的克隆策略. 所得到的结合转移载体在通过结合转移将外源片段从大肠杆菌等转移至放线菌方面将有着广泛的用途.

[关键词] 重组工程, 三片段克隆法, 结合转移载体

[中图分类号] Q819 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2007)04-0080-04

A General Method for Direct DNA Vector Modification

Xie Feng, Zhu Lei, Shang Guangdong

(Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, Nanjing 210046, China)

Abstract: Cloning one or more DNA fragments into a vector is the one of most commonly used techniques in molecular biology. Classic cloning strategy, when dealt with complicated cloning steps, like multiple fragments insertion, selective marker exchange, are often troubled by the choice of restriction enzymes, the base mutations caused by long fragment PCR, UV exposure and gel purification. We made use of the Red/ET technology to clone two fragments into the vector while remove the unnecessary vector part in a single step. This three pieces cloning manipulation is straightforward and convenient, with the potential to be a general cloning strategy for vector engineering.

Key words: recombineering, three pieces cloning, conjugal transfer vector

0 引言

DNA 载体的改造, 如 DNA 片段的插入以及抗性基因的置换等是分子生物学的基本操作, 它也是以后的生物化学和遗传学研究的基础.

传统的克隆策略是: 将载体和外源片段以限制性内切酶作用以产生相同或互补的粘端或钝端; T4 连接酶介导的 DNA 分子间的连接; 大肠杆菌感受态细胞的转化; 抗性菌落的生长、培养; 质粒提取、鉴定等. 与 PCR 技术相结合, 此克隆策略在简单的基因克隆操作方面是非常有效的. 然而, 当面临负责的多片段克隆时, 克隆策略的缺点也是比较明显的, 如常常难以或不可能有足够的限制性内切酶可供选择. 并且, 凝胶纯化、紫外线照射、长片段 PCR 等均可能引入碱基突变而破坏基因的功能.

利用在大肠杆菌内寡核苷酸之间的同源重组的 Red/ET^[1] 克隆技术是分子生物学研究手段中一个新成员, 其在越来越多的研究领域如小鼠基因组学、线虫基因组学等得到了良好的应用^[2,3]. Red/ET 克隆技

收稿日期: 2007-06-05. 修回日期: 2007-06-20.

基金项目: “十一五” 863 国家高技术研究发展计划 (2006AA02Z159) 资助项目.

作者简介: 谢锋 (1982—), 硕士研究生, 主要从事重组工程在次级代谢产物来源的药物中的学习与研究. E-mail: XF_821026@163.com

通讯联系人: 尚广东 (1969—), 副教授, 主要从事微生物药物的教学与研究. E-mail: shanggd@hotmail.com

术是基因克隆手段的巨大变革,在涉及多个片段和/长 DNA 片段时尤为有效。

Red/ET克隆系统的组成是:噬菌体的 *red* 基因,是 5'->3'外切酶,作用于双链 DNA 分子而产生 3'突出的分子;噬菌体的 *red* 基因,为单链结合蛋白,其结合在 DNA 分子的 3'突出端而防止宿主菌大肠杆菌的 DNA 内切酶对外源 DNA 的降解,*red* 基因同时表现重组酶活性,即促进两个单链、同源 DNA 分子之间的退火;*gam* 基因,其抑制宿主菌 *RecBCD* 外切酶的活性;*recA* 基因,其可以提高重组酶的活性^[4]。

本研究报道一种基于 Red/ET原理的直接对 DNA 载体进行改造的方法。此“三片段克隆法”(由于有 3 个分子介入 DNA 克隆的过程而命名)为一步法克隆 2 个片段至靶载体,并可去除载体上的多余部分(如果必要的话)。

70%的药物来源是放线菌,随着放线菌分子生物学的迅速发展,提供基因工程的手段对以抗生素为代表的生理活性物质产生菌的遗传操纵以提高目的化合物的产量、改善目的组份或通过构效关系分析而有针对性地得到新的活性更佳的化合物成为药物研发领域的一个热点。对生理活性物质产生菌进行操作的一个关键点是外源基因的导入,大肠杆菌和放线菌之间的结合转移是目前首选的技术。

为构建在大肠杆菌和放线菌之间进行结合转移的载体,本研究将结合转移片段 *oriT*、阿普霉素抗性基因 (*Am*) 和链霉素抗性基因 (*ap_r*) 克隆至常用的克隆载体 *pBluescript KS(-)*,同时去除载体的 *bla* (氨苄青霉素抗性基因)。*oriT* 为 *IncP* 转移区,负责大肠杆菌和放线菌之间的 DNA 片段转移,*Am* 是广泛应用于放线菌中的抗性筛选标记^[5],*ap_r* 为负选择标记,即含有 *ap_r* 基因的菌株不能在有链霉素环境中生存^[6]。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

含重组酶质粒的菌株 HS996/*pSC101 - gba - tet*,*pACYC177* 和 *pACYC184* 由德国 Dresden University 张友明博士惠赠;*Streptomyces coelicolor* A3(2) 和 *pOJ446* 由英国 John Innes 研究所 Keith Chater 教授馈赠。常规克隆宿主菌 *E. coli* DH 10B、*pBluescript KS(-)* 由本室保存。

1.1.2 试剂和仪器

pfu 聚合酶购自上海生工公司,中国;各种限制性内切酶购自 Takara 公司,日本;PCR 引物由上海生工公司合成,中国;PCR 仪为 Bio-Rad 公司 MJ researcher PTC-200 仪,美国;电转化仪为 Bio-Rad 公司 Gene Pulser II[®] 电转化仪,美国。

1.2 方法

(1) 大肠杆菌培养,感受态细胞的转化,质粒提取,鉴定等按文献 [7] 进行。

(2) 表达重组酶的 HS996/*pSC101 - gba - tet* 的电转化感受态细胞的制备:

将在 -70℃ 冻存的 HS996/*pSC101 - gba - tet* 划线于含 10 μg/mL 四环素的 LB 固体平板上,30℃ 培养 20 h 以上。挑取单菌落至 10 mL 10 μg/mL 四环素的 LB 液体培养基,于 30℃ 过夜振荡培养,按 1/50 的体积转接至 20 mL 同样的培养基,30℃ 振荡培养,至 A_{260} 为 0.2 时,加入终浓度为 0.15% 的 L-阿拉伯糖,37℃ 振荡培养至 A_{600} 为 0.4 时,12 000 r/min, 4℃ 离心 3 min,弃上清,以 10% 的甘油洗涤沉淀 2 次,最终悬浮于 200 μL 10% 的甘油中。50 μL 分装,用于一次转化。

(3) PCR 扩增 *oriT - Am* 基因盒和 *ap_r* 基因。

引物 CT1: 5'-AAG AAG ATC CTT TGT AT CTT TTCTACGGGGTCTGACGCTCA GTGGAACGAA ctgcaggt ccccgggatcggtc-3',前 50 个碱基是 *pBluescript KS(-)* (GenBank 登陆号 X52329) *bla* 区域的 3'端 (nt 1801-1850),后 23 个碱基 (小写) 对应 *pOJ446 oriT* 区域的 3'端;引物 CT2: 5'-TCAGCCAA TCGACTG-GCGAG CGGCA TCGCA-3',为 *pOJ446 Am* 的 5'端;引物 CT3: 5'-TGCGA TGCCGCTCGCC AG TCGATT-GGCTGA cgggtgcgccatttg ttttg-3',前 30 个碱基是 CT2 的反向互补序列,后面 21 碱基 (小写) 对应 *ap_r* 的 5'端;引物 CT4: 5'-TGGCACTTTTCGGGGAAA GTGCGCG GA ACCCC TATTTG TTTA TTTTCTgccct-tacgaggcattcttac-3',前 50 个碱基是 *pBluescript KS(-)* *bla* 区域的 5'端 (nt 2911-2960),后面 21 碱基 (小写) 对应 *ap_r* 的 3'端。

(4) PCR 反应体系: 250 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 1 $\mu\text{mol/L}$ 引物 250 $\mu\text{mol/L}$ MgCl_2 , 200 ng 染色体 DNA (或 100 ng 质粒), 5U pfu, 5% DMSO, 加 ddH₂O 至 100 μL . 97 $^{\circ}\text{C}$ 处理 5 min 后, PCR 循环条件: 97 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 共 30 个循环, 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min.

以 pOJ446 为模板, CT1 和 CT2 扩增出 2.0 kb 的 oriT - Am 基因盒; 以 *S. coelicolor* 基因组 DNA (提取方法见文献 [8]) 为模板, CT3 和 CT4 扩增出 0.6 kb 的 rpsL 基因.

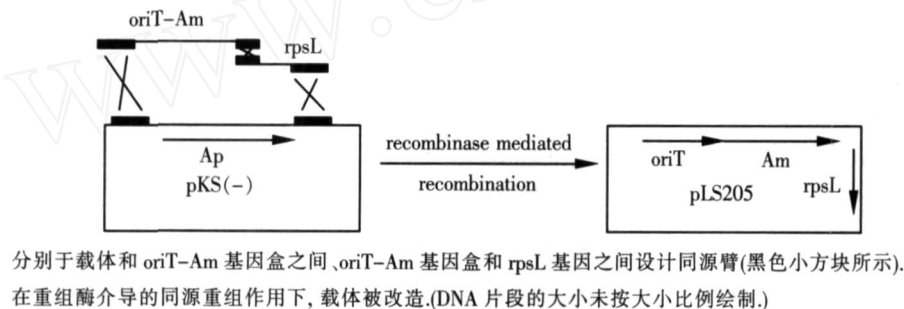
琼脂糖电泳鉴定正确后, PCR 反应以乙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤, 室温干燥后, 溶解于 10 mmol/L pH 8.0 Tris Cl, DNA 浓度调节至 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

(5) 三片段克隆. 首先 pBluescript KS(-) 转化至 HS996/pSC101 - gab - tet 的感受态细胞, 以 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四环素在 30 $^{\circ}\text{C}$ 进行筛选, 所得菌株为 HS996/pSC101 - gab - tet + pBluescript KS(-). 随之, 0.3 μg oriT - Am 基因盒 DNA 片段和 0.3 μg 的 rpsL DNA 片段共转化 0.15% 诱导重组酶表达的 HS996/pSC101 - gab - tet + pBluescript KS(-), 转化子以 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿普霉素在 37 $^{\circ}\text{C}$ 进行筛选.

2 结果

2.1 克隆策略

三片段克隆法的策略见图 1. 具体的方法是: pBluescript KS(-) 待交换部位的左侧和 oriT - Am 基因盒的 5' 端设计 50 个碱基的同源臂; oriT - Am 基因盒的 3' 端和 rpsL 基因的 5' 端设计 30 个碱基的同源臂; rpsL 基因的 3' 端和 pBluescript KS(-) 待交换部位的右侧设计 50 个碱基的同源. 经过重组酶介导的同源交换; oriT - Am 基因盒和 rpsL 基因连接在一起, 并克隆至 pBluescript KS(-), 同时, bla 部分被去除.



分别于载体和 oriT-Am 基因盒之间, oriT-Am 基因盒和 rpsL 基因之间设计同源臂(黑色小方块所示). 在重组酶介导的同源重组作用下, 载体被改造.(DNA 片段的大小未按大小比例绘制)

图 1 “三片段克隆法”示意图

Fig.1 Scheme of the “triple cloning”

2.2 三片段克隆法构建放线菌结合转移载体

一次重组酶介导的转化约获得 100 个菌落, 挑取其中 12 个, 按标准方法进行验证, 发现其中 11 个均显示与预期相符的酶切结果, 所得质粒命名为 pLS205. 质粒图谱及其电泳结果见图 2.

经过抗生素筛选及高温 (37 $^{\circ}\text{C}$) 培养, pBluescript KS(-) 和 pSC101 - gba - tet (温度敏感型复制子) 分别在新的转化子中失去. 因此, 理论上来说, 只有正确的克隆可被获得. 显示出与预期不符的克隆可能是由于非特异性基因重组.

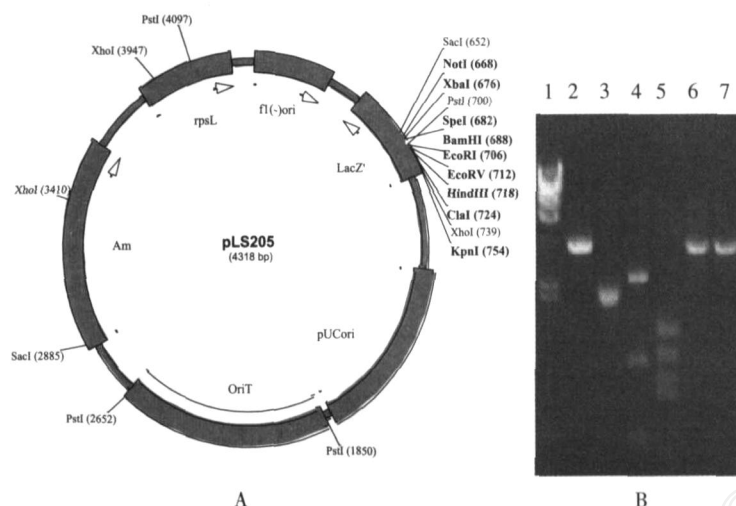
3 讨论

由 Cohen 和 Boyer 于 1973 年提出的传统的基因克隆方法, 开创了分子生物学的先河, 与 Mullis 等于 1985 年提出的 PCR 技术一起, 它们成为基因操作的经典手段. 然而, 当需要多轮的克隆操作时, 经典的方法常常非常耗时、设计困难. 所可能引入的突变 (如紫外线照射, 酶的非特异性切割) 也可能随着实验次数的增加而增加, 这在酶的活性位点被突变时或单核苷酸多型性实验时尤为重要.

上世纪 90 年代末出现并得到迅速发展的 Red/ET 克隆技术, 极大地改变了克隆操作. 它使得一些难以进行甚至不能进行的实验成为常规的实验室工作.

本研究中所报道的一步法将两个片段克隆至目的载体并去除不必要的载体部分的“三片段克隆法”简便有效. 克隆效率高且不会有任何突变. 引物设计简单直接. 所选择的靶载体的范围可以涵盖 PAC, BAC, cosmid, plasmid 等等. 尽管本研究将 bla 区域去除, 而原理上来说只要有 100 个碱基对同源区, 可以

任意进行基因重组实验,即同源交换可以发生在载体的多克隆位点,而无须担心任何限制性内切酶位点的限制.本方法有可能成为通用的对 DNA 载体进行改造的方法.



(A) pLS205 质粒图谱. 图谱为 Gene Construction Kit 2.5 (Textco, Inc)所绘, oriT, Am and rpsL 如图所示. 单酶切位点用粗体表示.(B) pLS205 酶切图谱. 选用 6 种限制性内切酶来酶切 pLS205, 得到的酶切片段与预期完全一致.
1.DNA/HindIII; 2.EcoRI: 4.3 kb; 3.SacI:2.1,2.2 kb; 4.XhoI/0.5,1.1,2.7 kb; 5.PstI/0.8, 0.9, 1.2,1.4 kb; 6.HindII/4.3 kb; 7.BamHI/4.3 kb.

图 2 pLS205 的质粒图谱及酶切鉴定

Fig.2 Plasmid map of pLS205 and its digestion pattern

本研所得到的新型大肠杆菌和放线菌之间的结合转移载体可以用来高效地得到突变株,由于采用了链霉素的负筛选,质粒不能在宿主细胞的染色体外生存,而只用通过相同片段间同源重组而整合至染色体上,同时去除质粒骨架部分,这样经过一步就获得了基因工程菌株.本载体有着较为广泛的应用前景.

致谢 感谢张友明博士惠赠 HS996 /pSC101 - gba - tet和实验方面的建议.

[参考文献]

- [1] Zhang Y, Buchholz F, Muylers J P, et al A new logic for DNA engineering using recombination in Escherichia coli[J]. Nat Genet, 1998, 20(2): 123-128.
- [2] Glaser S, Anastassiadis K, Stewart A F. Current issues in mouse genome engineering[J]. Nat Genet, 2005, 37(1): 1 187-1 193.
- [3] Sarov M, Schneider S, Pozniakovski A. A recombineering pipeline for functional genomics applied to Caenorhabditis elegans [J]. NatMethods, 2006, 3(10): 839-844.
- [4] Wang J, Sarov M, Rientjes J, et al An improved recombineering approach by adding RecA to lambda Red recombination [J]. Mol Biotechnol, 2006, 32(1): 43-53.
- [5] Bieman M, Logan R, O'Brien K, et al Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from Escherichia coli to Streptomyces spp[J]. Gene, 1992, 116(1): 43-49.
- [6] Hosted T J, Baltz R H. Use of pSL for dominance selection and gene replacement in streptomyces roseosporus[J]. J Bacteriol, 1997, 179(1): 180-186.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Kieser T, Bibb M J, Buttner M J. Practical Streptomyces Genetics[M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000: 247-248.

[责任编辑:孙德泉]