

用基于“*Neo/E*”的技术构建重组质粒

Construction of Recombinant Plasmid Using *Neo/E* Technology

李山虎,王 健,李杰之,黄翠芬,周建光*

LI Shan-Hu, WANG Jian, LI Jie-Zhi, HUANG Cui-Fen and ZHOU Jian-Guang*

军事医学科学院生物工程研究所,北京 100850

Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

摘 要 根据重组工程原理,建立了一种用于构建重组质粒的“*neo/E*”(抗生素/单酶切位点)选择与反选择新方法。首先采用 PCR 方法扩增出线性打靶分子,然后进行两步体内同源重组:(1)*neo/E* 基因敲入,重组子呈现 *neo* 抗性表型;(2)目的基因替换 *neo/E* 基因。用限制酶 E 消化时,发生第二步重组的 DNA 分子不能被消化,能够转化大肠杆菌受体菌 DH5 α 。应用该方法构建了重组质粒 pGL3-Basic PC1900T。PCR 及测序鉴定证明:外源片段重组率为 20%,所建立的重组工程选择与反选择新技术为质粒构建提供了新的解决方案。

关键词 Red 重组酶,重组工程,反选择技术

中图分类号 Q812 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0520-04

Abstract A new *neo/E* counterselection technique was set up using *Red* recombination, which could be used in constructing recombinant plasmid. Firstly, linear targeting cassettes were amplified by PCR; secondly, two steps of homology recombination occurred *in vivo*: (1) The *neo/E* counterselection targeting cassette, consisting of a unique endonuclease recognition site and an antibiotic resistance gene, was introduced into the targeted region. (2) The *neo/E* cassette was replaced in the second round of recombination by another linear targeting cassettes DNA fragment carrying the targeted gene. For selecting a correct recombinant plasmid from the mixture of nonrecombinant and recombinant clones, the unique endonuclease recognition site in the nonrecombinant clones was cut by endonuclease and then transformed into the *E. coli* competent cells, up to 20% correct recombinants were yielded. A recombinant plasmid of pGL3-Basic PC1900T was successfully constructed in this way. Application of this technique offers a new and highly efficient way for recombinant plasmids construction.

Key words red recombination system, recombineering, counterselection

构建重组质粒是分子生物学研究中的常规技术,是用限制酶分别对两条 DNA 链酶切,产生的互补末端经连接酶连接成一个完整 DNA 分子的过程。为方便外源基因插入,商业化载体大多携带多克隆位点。但一些重组质粒构建过程复杂,需要经过多

步骤 PCR、加入限制酶接头或者多次克隆。除了过程烦琐之外,还产生比较严重的后果,例如:多次 PCR 增加 DNA 突变几率,在加入限制酶接头的同时引入了多余的 DNA 序列等。

重组工程是近年来建立的一种基于噬菌体重组

Received: January 12, 2005; Accepted: March 24, 2005.

This work was supported by a grant from the Medical Science Foundation of PLA (No.01MA089).

* Corresponding author. Tel: 86-10-66931807; E-mail: zhoujgx@public.bta.net.cn

军队“十五”医药卫生科学基金资助(No.01MA089).

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

酶、短同源臂和体内同源重组的新型遗传工程技术^[1],它通过 PCR 扩增出携带 40~50bp 同源臂的线性 DNA 打靶分子,将其电击转化到噬菌体重组酶表达的菌株,通过体内同源重组,完成基因剔除、敲入和克隆工作。

为研究与 PC-1 基因在前列腺癌不同阶段差异表达有关的调控序列,首先构建了含 PC-1 基因翻译起始位点上游 1099bp DNA 序列的质粒 pGL3-Basic PC1090,拟进一步对 1099bp 的 DNA 序列进行逐段分析。在没有合适限制酶位点的情况下,我们根据重组工程原理,建立了一种基于“ neo/E (抗生素-单酶切位点)的新型选择与反选择方法。通过两步体内同源重组,缺失了-1 至-750bp 处的 DNA 序列,又将一个 mini 启动子序列插入其中,构建了重组质粒 pGL3-Basic PC1900T。

1 材料和方法

1.1 材料

携带 λ 噬菌体 Red 重组酶基因的大肠杆菌菌株 DY330 由美国国立卫生院肿瘤研究所 Donald Court 博士馈赠。DY330 基因型为 :W3110 △lacU169 gal490 λcl857 △(cro-bioA)²¹。pGL3-Basic PC1090 (Ap^R)为携带 PC-1 基因翻译起始位点上游 1099bp DNA 序列的重组质粒,由本研究室构建保存。pTRE 2-luc 为携带 mini 启动子序列的质粒,由本研究室保存。各种限制酶、聚合酶均为 TaKaRa 公司产品。质粒提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒均为 Promega 公司产品。

1.2 PCR 引物

引物由上海博亚公司合成。在 P1、P2 和 P3、P4 引物中,小写字母序列用做体内同源重组的同源臂(图 1),大写字母序列用做 PCR 引物,以扩增线性打靶分子。P1、P2 大写字母与 kan 筛选标记基因 3'和 5'端相同,P3、P4 大写字母与 pTRE2-luc 质粒上的 mini 启动子 3'和 5'端序列相同。P2 引物的方框内为 Bgl II 酶切位点。P5、P6 为重组质粒的鉴定引物。引物序列如下:

P1 : 5' ataccgggagctttccattcaaagtagattcttctctTATGGACAGCAAGCGAACCG 3'

P2 : 5' ttaccaacagtagccgaatgccaagcttacttagatcgc agatct TCAGAAGAACTCGTCAAGAAG3'

P3 : 5' ataccgggagctttccattcaaagtagattcttctctGTAGGCGTGTACGGTGGG3'

P4 : 5' ttaccaacagtagccgaatgccaagcttacttagatcgcGGCTGGATCGGT

CCCGGTG3'

P5 : 5' CTAGCAAAATAGGCTG3'

P6 : 5' GGCTGGATCGGTCCCGGTG3'

1.3 电穿孔转化和酶切筛选

感受态细胞的制备见参考文献 [3]取 2μL 线性 DNA (100ng/μL), 2μL 质粒 (100ng/μL) 和 46μL 冰冷的感受态细胞,混匀后电穿孔转化,电击后立即加入 1 mL 无抗性的 LB 液体培养液,30℃ 震荡培养 2h。涂布含相应抗生素的 LB 固体培养基,筛选重组子。酶切筛选:在 30℃ 震荡培养 2h 后转入 5mL 有氨苄青霉素抗性(100ng/mL)的 LB 液体培养基 30℃ 继续震荡培养 5h,抽提质粒并溶于 20μL 无菌水中,取 5μL 质粒 DNA 用 Bgl II 酶切过夜(20μL 酶切体系),取 5μL 酶切产物,氯化钙法转化至大肠杆菌 DH5α,涂布氨苄青霉素(100ng/mL)抗性 LB 平皿,37℃ 培养过夜。

1.4 重组质粒的鉴定

质粒提取、酶切等步骤均按常规分子克隆方法进行。测序由上海博亚公司完成。

2 结果

2.1 引物的设计

同源臂决定了目的基因插入重组质粒中的位置,同源臂序列(A)位于 PC-1 基因翻译起始位点上游-757bp 至-797bp(40 bp)处,同源臂序列(B)位于 pGL3-Basic 载体的 42 bp 至 81bp(40 bp)处(图 1)。同源臂设计遵循 GC 分布均匀含量约 50% 原则,长度均为 40 个碱基。与模板结合互补部分的引物按常规方法设计。P1、P2 引物与 P3、P4 引物同源臂相同。

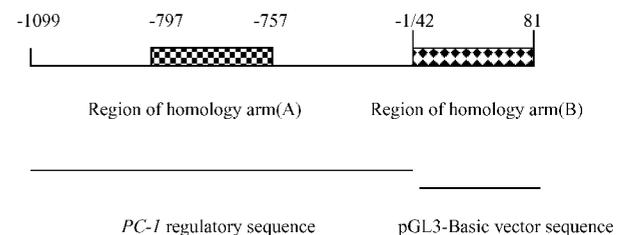


图 1 同源臂位置

Fig.1 The sites of homology region

2.2 线性打靶 DNA 片段的制备

扩增线性打靶 DNA 分子的 PCR 引物包括两部分,5'端为同源臂序列,3'端为与模板互补的 PCR 引物。通过普通的 PCR 反应将上述同源臂和酶切位点加载到线性打靶 DNA 片段的双侧。以 kan 基因为模板,用 P1、P2 引物按常规 PCR 方法扩增,得到

具有 *kan* 基因和 *Bgl* II 酶切位点(1300bp) 2 个筛选标记的线性打靶 DNA 片段 S1, 该 DNA 片段的 5' 端带有 40bp 同源臂(A), 3' 端带有 40bp 同源臂(B)。以 mini 启动子序列为模板, 用 P3、P4 引物扩增得到带有同样(A)和(B)同源臂以及 mini 启动子调控序列(350bp)的线性打靶 DNA 片段 S2(图 2)。

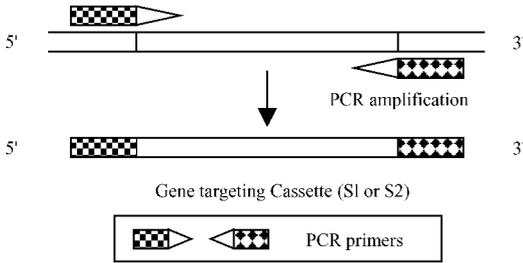


图 2 PCR 扩增打靶片段

Fig.2 Gene targeting cassette (S1 or S2) by PCR amplification

2.3 重组质粒的构建

将上述 P1、P2 引物扩增的线性打靶 DNA 分子片段 S1 与 pGL3-Basic PC1900 质粒共同电击转化 DY330 菌株。42℃ 温度诱导 15 min, 使 λ 噬菌体 *Red* 重组酶基因表达, S1 与 pGL3-Basic PC1900 质粒中 *PC-1* 基因启动子同源序列之间发生重组后, 将 *kan*

基因和 *Bgl* II 酶切位点插入到 pGL3-Basic PC1900 质粒中, 替代了 *PC-1* 基因启动子-1 至-797bp 之间的 DNA 序列。重组质粒呈现 *kan* 抗性并产生了一个新的 *Bgl* II 酶切位点, 命名阳性克隆为 pGL3-Basic PC1900KB。

按照同样的方法, 将 pGL3-Basic PC1900KB 与 P3、P4 引物扩增的线性打靶 DNA 片段 S2 共同电击转化 DY330 菌株, 发生同源重组后, S2 替代了 *kan* 基因和 *Bgl* II 酶切位点, 重组质粒呈现 *kan* 敏感和 *Bgl* II 酶切位点消失表型。按千分之一重组效率计算, 培养 5h 便可获得足够的 *kan*^S 重组质粒, 抽提质粒后, 再用 *Bgl* II 消化过夜以去除没有发生重组的质粒(图 3)。将酶切产物转化 DH5 α 氨基青霉素抗性 LB 平皿筛选。在挑选的 10 个克隆中, 经 PCR 和测序鉴定出 2 个正确的重组质粒, 命名为 pGL3-Basic PC1900T(图 4)。

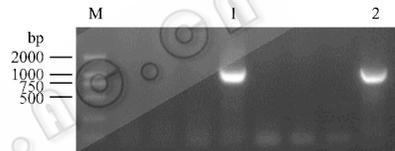


图 4 pGL3-Basic PC1900T 质粒的 PCR 鉴定

Fig.4 PCR analysis of recombinant plasmid pGL3-Basic PC1900T
1, 2: PCR fragment; M: DL2000 DNA marker.

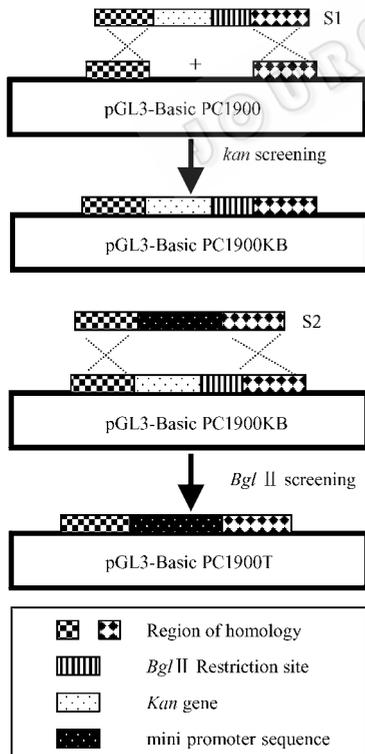


图 3 pGL3-Basic PC1900T 质粒的构建示意图

Fig.3 Construction delineation of recombinant plasmid pGL3-Basic PC1900T

3 讨论

大肠杆菌体内同源重组是细菌遗传学最基本的分析工具。然而, *RecA* 介导的反应需要先将长度为 500 ~ 1000 个碱基对左右的同源臂装载在质粒载体上, 构建环状质粒打靶载体, 过程十分烦琐。1998 年 Stewart 等证明了在大肠杆菌体内, λ 噬菌体 *recE* 和 *recT* 重组酶基因表达产物能够介导线性打靶分子进行同源重组。同源臂长度仅为 40 ~ 50bp, 并首先建立了 ET 克隆或者 *RecET* 克隆系统。2000 年, 美国国立卫生研究院 Court 博士的研究室将缺陷型 λ 前噬菌体整合在大肠杆菌染色体上, 使 *Red* 重组酶基因能够按照 λ 噬菌体自然方式进行时空有序的表达, 建立了多个不同基因型的重组工程菌株 DY330、DY331 等。*Red* 重组酶基因介导的单链 DNA 重组效率可高达 6%^[4]。2001 年, Copeland NG 等在 *Nat Rev Genet*, 2001, 2(10):769 上发表的综述文章中应用了重组工程术语^[5]。

国外研究人员主要将重组技术应用于转基因载体的构建或者对 BAC 中真核基因组 DNA 进行基因突变、基因剔除等基因改造、基因敲入工作开展较

少^[6]。在先前的工作中,我们应用重组工程技术之一 :*sacB/neo* 选择反选择方法,将外源基因准确插入到大肠杆菌染色体 DNA 靶序列中。我们发现该方法存在假阳性较多、筛选困难等问题。文献报道对 *sacB/neo* 方法评价褒贬不一。

为了建立了一种适合质粒构建的选择与反选择技术,解决一些复杂的质粒构建问题,我们根据重组工程原理,建立了一种基于“*neo/E*”的新型选择与反选择方法。该过程分两步重组(1)将 *neo/E* 基因敲入,重组子呈现 *neo* 抗性表型(2)用目的基因替换 *neo/E* 基因。用限制酶 E 消化时,发生第二步重组的 DNA 分子不能被消化,能够转化大肠杆菌受体菌 DH5 α 。我们应用该方法构建了重组质粒 pGL3-Basic PC1900T。本研究适用于没有合适酶切位点的质粒构建,可能在含大片段基因组 DNA 的质粒例如 BAC 的基因改造中发挥作用。为较为困难构建的质粒提供了一种快速、简单的解决方案。

REFERENCES(参考文献)

- [1] ZHOU JQ(周建光), HONG X(洪鑫), HUANG CF(黄翠芬). Recombineering and its application. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报). 2003, **30**(10): 983 - 988
- [2] Daiguan Yu, Hilary M Ellis, E-Chiang Lee *et al.* An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *PNAS* 2000, **97**: 5978 - 5983
- [3] Daiguan Yu, James A, Sawitzke, Hilary Ellis *et al.* Recombineering with overlapping single-stranded DNA oligonucleotides: Testing a recombination intermediate. *PNAS*, 2003, **100**(12): 7207 - 7212
- [4] Ellis HM, Yu D, DiTizio T *et al.* High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *PNAS*, 2001, **98**(12): 6742 - 6746
- [5] Copeland NG, Jenkins NA, Court DL. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet*, 2001, **2**(10): 769 - 779
- [6] Lee EC, Yu D, Martinez de Velasco J *et al.* A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics*, 2001, **73**: 56 - 65