

一种自制 T-载体的构建

贾翠娟 董兆麟

(西北大学生物系 西安 710069)

摘要: Taq DNA 聚合酶由于其具有非模板依赖型末端转移酶活性常使 PCR 产物的 3' 末端形成一个 dA 突出。实验通过在 pGEM-7Zf (+) 质粒的多克隆位点中插入少数新的酶识别位点, 使其改造成能被 *Xcm* I 限制内切酶消化后可形成 3' 末端具有一个 dT 突出的 pGEMX T-载体, 从而易于与具有 3' dA 的 PCR 产物直接连接, 并通过蓝白斑筛选而获得重组克隆。这种新构建的载体由于新添了相应的酶切位点还可用 *Bam*HI 或 *Hind* III 单酶切出其中所插入的片断, 方便了后续分析工作的进行。

关键词: PCR 产物, T-载体, 克隆

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 05-0056-05

THE CONSTRUCTION OF A NEW TYPE OF T-VECTOR

JIA Cui-Juan DONG Zhao-Lin

(Department of Biology, Northwest University, Xian 710069)

Abstract: The template-independent terminal transferase activity of Taq DNA polymerase results in an overhanging dA at the 3' end of its PCR products. The pGEMX vector constructed in this experiment forms a single overhanging dT at its 3' end as the result of cleavage with *Xcm* I restriction enzyme. This vector is very efficient for direct cloning of PCR product obtained by using Taq DNA polymerase. Recombinant colonies can be selected by Blue/white screening. Moreover, insertion fragment can be easily released from the vector simply with either *Bam*HI or *Hind* III digestion.

Key words: PCR product, T-vector, Cloning

PCR 是分子生物学和基因工程研究中的一项基本技术, 它被广泛用于体外扩增已知或未知的特异 DNA 片段, 具有极其重要的作用。将 PCR 产物克隆进一定的载体通常是实现 PCR 产物多种用途的必经之路。正因为如此, 许多学者探索了很多不同的克隆方法。如平端连接法^[1], 无连接酶亚克隆法^[2], 共环消解法^[3], 粘端克隆法^[4]等并建立了若干相应载体。不过这些现有的克隆载体虽然能够达到克隆的目的, 但是也各有一定的不足之处。例如有的载体容易自连, 有的不好筛选阳性克隆, 有的实验费用较高, 而且一般情况下克隆效率也都不太高。

Taq DNA 聚合酶因为其较好的耐高温性能和较高的碱基掺入率而经常在 PCR 反应中被采用。它具有的非模板依赖型末端转移酶活性往往会给 PCR 产物的 3' 端加上一个 dA^[5], 因此具有一个 3' dT 突出的 T-载体无疑成了克隆此类产物的最方便的首选载体。T-载体上的 3' dT 突出正好与 PCR 产物的 3' dA 配对, 从而促成了彼此的相连。此外, 即使对于平末端的 PCR 产物, 通过一个简单的加尾过程 (加 2 μ L 2mmol/L dATP, 2 Weiss 单位 Taq DNA 聚合酶/50 μ L PCR 反应体系, 72 $^{\circ}$ C 保温 10min) 也就可以与 T-载体实现快

收稿日期: 2000-03-17, 修回日期: 2000-04-24

速的连接。

近年来发展起来的 T-载体的构建方法有平末端加 T 法^[6]和限制酶切法^[7-9]这两大类。但前者缺点较多^[10]，最主要的是 dTTP 的掺入几率小，并且连接不稳定，载体容易发生自连。限制性酶切法与前者相比优越性较多，其所形成的 T-载体不但末端的 dT 突出稳定，而且使用前用相应的酶，例如 *Xcm* I, *Asp* E I, *Hph* I, *Mbo* II 或 *Mnl* I 等酶处理一下回收后即可使用。此类 T-载体与外源片断的连接效率也更高。

本实验就是通过改造 pGEM-7Zf (+) 质粒，在不影响编码 β -半乳糖苷酶的情况下，给其多克隆位点增加一些有用的酶切位点，使其不但可以用 *Xcm* I 限制性内切酶进行酶切后转变成为一种 T-载体，而且应用这种 T-载体所构建的重组质粒可以用 *Bam* H I 或 *Hind* III 进行单酶切切出其中的插入片断，很方便于满足后续进一步研究的需要。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌种：*E. coli* XLI-Blue，由本实验室保存。

1.1.2 质粒：pGEM-7Zf (+) 质粒，由本实验室提供。

1.1.3 培养基：LB 培养基，含氨苄青霉素 100 μ g/mL。

1.1.4 工具酶及化学试剂：T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品；限制性内切酶为 TaKaRa 和 Biolabs 公司产品；抗生素为华美生物工程公司产品；化学药品均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 插入片断的合成：设计两个 DNA 单链序列，使其含 *Bam* H I, *Hind* III, *Nco* I 及两个 *Xcm* I 酶识别序列，由上海 Sangon 公司合成，其碱基序列如下：

5'GGG, ATC, CAA, GCT, TCC, CAT, GGC, GCC, ATG, TCA, TGA, GTG, GAT, A 3'

5'AGC, TTA, TCC, ACT, CAT, GAC, ATG, GCG, CCA, TGG, GAA, GCT, TGG, ATC, CC 3'

1.2.2 两个 DNA 单链片段的复性：将两个 DNA 单链片段分别以 660ng 和 726ng (摩尔比 1:1) 加入占体系 1/7 的复性缓冲液 (1mol/L Tris. Cl (pH7.6), 100mmol/L MgCl₂, 160mmol/L DTT) 中，用无菌去离子水补足到 60 μ L，将反应管置于 85 $^{\circ}$ C 水中，自然冷却到室温。

1.2.3 质粒酶切：酶切体系中加入 *Sma* I 和 *Hind* III 各 5 Weiss 单位，10 \times basal 缓冲液 (TaKaRa) 3 μ L，pGEM-7Zf (+) 质粒 1 μ g，用无菌去离子水补足到 30 μ L，37 $^{\circ}$ C 温育 3h，去掉 *Cla* I 和 *Csp*45I 酶识别序列，用 Agarose Gel DNA Extraction Kit (Boehringer Mannheim) 从 1% 琼脂糖凝胶中回收切开的线状质粒。

1.2.4 DNA 连接：将复性后的双链 DNA 片断和酶切后的载体以摩尔比 15:1，分别 20ng 和 100ng 加入连接体系，用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。

1.2.5 感受态细胞的制备和转化：选用 *E. coli* XLI-Blue 作为受体菌，用 TSS 法制备感受细胞并转化，方法见文献 [11]。37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 12~16h 进行蓝白斑筛选。

1.2.6 序列测定：重组子经纯化后，接种到液体 LB 培养基中，37 $^{\circ}$ C 和 250r/min 摇床上培养 12~16h，碱法提取质粒作为模板，用 T 7 Sequencing Kit (Amersham Pharmacia)，

M13 reverse sequencing primer 做测序反应，进行6%聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影分析。

2 结果与分析

将改造后的质粒(命名为pGEMX)进行转化试验，每微克质粒DNA得到了10⁶个转化子。蓝白斑试验的结果是平板上全部菌落均呈现为蓝色，说明所进行的改造并未影响β-半乳糖苷酶的编码，保证了采用这一新构建的载体仍然可以方便地通过蓝白斑筛选直观地挑选有外源片断插入的阳性克隆。

2.1 酶切分析

将分离良好的菌落挑几个划线纯化，碱法提取质粒，采用改造后酶切位点已经消失的ClaI，以及新添的NcoI酶切位点和载体上原有的ScaI酶切位点进行酶切分析。结果证明ClaI不能切开该质粒，而用NcoI和ScaI则能将质粒切成约1.2kb和1.8kb两个片断，符合改造后的质粒所应有的酶切模式(电泳照片略)。

2.2 测序鉴定

对一个经过酶切分析正确的克隆的质粒进行多克隆位点区域测序的结果表明多克隆位点插入片断正确(图1)。

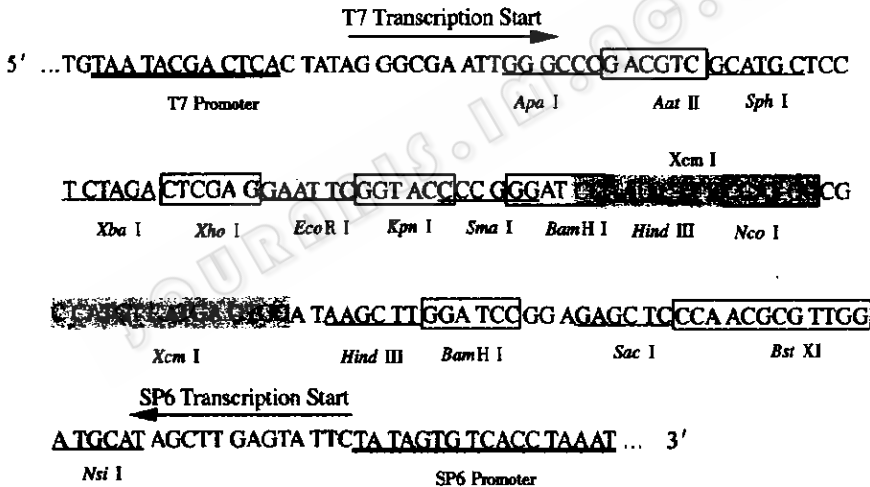


图1 改造后的pGEMX质粒中的启动子及多克隆位点序列

2.3 酶切制备T-载体

用XcmI酶切经过插入改造而获得的pGEMX质粒，37℃水浴3h，1%琼脂糖凝胶电泳后用Agarose Gel DNA Extraction Kit (Boehringer Mannheim)回收切开的线状pGEMX T-载体，切口两端的酶识别位点如图2。

2.4 连接效率检验

将40ng pGEMX T-载体与1.4kb大小的PCR产物分别以摩尔比1:1, 1:2, 1:3, 1:4加入连接体系，用T4 DNA连接酶连接，16℃连接过夜后取3/10的连接物进行转化，用XL1-Blue感受态细胞转化的结果如表1。

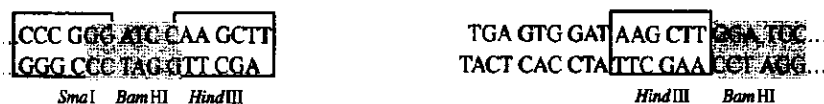


图2 T-载体切口两端的酶识别位点

表1 pGEMX T-载体与1.4kb的PCR产物以不同摩尔比连接后的转化结果

载体 (PCR 产物)	1:0	1:1	1:2	1:3	1:4
蓝	1	14	14	19	10
白	0	53	71	250	36
总计	1	67	85	269	46
转化频率 (个/ μ g)	83	5.6×10^3	7.1×10^3	2.2×10^4	3.8×10^3
白斑率	0	0.79	0.84	0.93	0.78

表1显示,转化效率以摩尔比为1:3时最高,每微克质粒可得到 2.2×10^4 个转化菌落,白斑占93%。

即使是仅略小于载体(约3kb)的2.5kb的PCR产物,以摩尔比1:3连接时,每微克质粒也可得到 1.8×10^4 个转化菌落,白斑占90%。

由于载体本身小,所以与PCR产物连接后很容易用单菌落电泳来检测外源片断是否已经插入。在检测试验中所挑的31个白斑单菌落电泳的结果证明,其中有29个都显示有外源片断插入,插入几率为94%。

本T-载体一般用40ng即可得到很高效率的连接效果,每微克载体可以得到大约 2.0×10^4 个转化菌落。插入片断的量可用下式计算:PCR产物(ng) = 载体量(40ng) / 载体长度(bp) \times PCR产物/载体摩尔比(3:1) \times PCR产物长度(bp)。

3 讨论

在分子生物学实验中,不论研究已知基因还是未知基因,往往需要将扩增的PCR产物装入适当的载体中,以便用于各种分析。T-质粒载体克隆PCR产物虽然已经得到了广泛的使用,但如何进一步地改进所使用的T-载体,降低使用成本,方便插入片断的分析鉴定一直是基因克隆工作者所希望的。

为获得一个使用成本低,可传代使用,测序结果理想的T-载体,本实验通过改造pGEM-7Zf(+)质粒构建了pGEMX T-载体。

此T-载体与购买的商品T-载体相比,我们在实验中发现pGEMX质粒载体 α -互补现象更明显,蓝斑显色更充分;此外,改造后的质粒可传代扩增,使用前只需用Xcm I限制内切酶酶切一下即可,实验室自制使用更经济方便。

本实验中质粒构建时增加的BamH I和Hind III酶切位点还可使插入pGEMX T-载体的DNA片断可以采用BamH I或HindIII单酶切出,直接用来判断插入片断大小是否正确或其它进一步的分析。用单酶酶切插入片断的好处是不但比较经济,还可以避免双酶切时协调所需合适缓冲液方面的困难,又可以得到更为完全的酶切效果。为方便分析插入片断,整个pGEMX质粒的酶切位点总结如表2,表3。

表2 酶切位点有1到5个的酶

酶	酶切次数	位点	酶	酶切次数	位点
<i>Aac</i> I	1	101	<i>Hind</i> III	2	66, 96
<i>Afw</i> 44I	2	837, 2083	<i>Kpn</i> I	1	53
<i>Apa</i> I	1	14	<i>Mlu</i> I	1	120
<i>Ava</i> I	2	37, 54	<i>Nae</i> I	1	2716
<i>Ava</i> II	2	1554, 1776	<i>Nco</i> I	1	72
<i>Ava</i> III	1	128	<i>Pvu</i> I	2	1786, 2885
<i>Bam</i> H I	2	60, 102	<i>Sac</i> I	1	115
<i>Ban</i> I	4	49, 267, 1364, 2650	<i>Sca</i> I	1	1896
<i>Ban</i> II	3	14, 115, 2688	<i>Sma</i> I	1	56
<i>Bcc</i> I	5	1451, 1575, 1862 2600, 2618	<i>Sph</i> I	1	26
<i>Bgl</i> I	2	1536, 2857	<i>Sst</i> I	1	115
<i>Dde</i> I	4	798, 1207, 1373 1913	<i>Xba</i> I	1	31
<i>Dra</i> I	3	1282, 1301, 1993	<i>Xcm</i> I	2	65, 82
<i>Eco</i> R I	1	43	<i>Xho</i> I	1	37
			<i>Xma</i> I	1	54
			<i>Xmn</i> I	1	2015

表3 无酶切位点的酶

<i>Acc</i> I	<i>Ace</i> II	<i>Ama</i> I	<i>Asc</i> I	<i>Bal</i> I	<i>Bbs</i> I
<i>Bcl</i> I	<i>Bcu</i> I	<i>Bgl</i> II	<i>Cla</i> I	<i>Csp</i> I	<i>Csp</i> 45 I
<i>Dsa</i> I	<i>Dsa</i> VI	<i>Eca</i> I	<i>Eco</i> 47 III	<i>Eco</i> E I	<i>Eco</i> N I
<i>Eco</i> R V	<i>Fin</i> I	<i>Hinc</i> II	<i>Hpa</i> I	<i>Nde</i> I	<i>Nhe</i> I
<i>Not</i> I	<i>Pau</i> I	<i>Pfu</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Sac</i> II	<i>Sai</i> I
<i>Spe</i> I	<i>Ssu</i> I	<i>Sty</i> I			

pGEMX 质粒的拷贝数也高, 每个细胞通常含有 500~700 个拷贝数, 有利于从大肠杆菌中提取大量质粒供分析用。此外, 许多常用试剂盒提供的通用引物都可用于该载体中插入片段的测序, 如 pUC/M13 forward or reverse, T 7, SP6 sequencing primers。

致谢 本实验是在中国科学院微生物研究所 802 课题组的大力支持下完成的, 对此谨表衷心的感谢!

参考文献

- [1] Hemsley A, Arnheim N, Toney M D, *et al.* Nucl Acid Res, 1989, 17: 6545~6551.
- [2] 林万明主编. PCR 技术操作和应用指南. 北京: 人民军医出版社, 1993, 109.
- [3] Jung V, Pestka S B, Pestka S. Nucl Acids Res, 1990, 18: 6156.
- [4] Scharf S J, Horn G T, Erlich H A. Science, 1986, 233: 1076~1078.
- [5] Clark J M. Nucl Acids Res, 1988, 16: 9677~9686.
- [6] Marchuk D, Drumm M, Saulino A, *et al.* Nucl Acids Res, 1990, 19: 1154.
- [7] Jooyeon C, William B, Srinivasan C. Gene, 1993, 136: 369~370.
- [8] Ichihara Y, Kurosawa Y. Gene, 1993, 130: 153~154.
- [9] Schutte B C., Ranade K, Pruessner J, *et al.* BioTechniques, 1997, 22: 40~44.
- [10] Hengen P N. Trends Biotechnol, 1995, 20: 85~86.
- [11] Cathie T C, Roger H M. Methods in Enzymology, 1993, 218: 622~623.