

单菌落 PCR 法直接快速鉴定重组克隆*

陈书霞¹ 王晓武² 房玉林^{3*}

(西北农林科技大学园艺学院 杨凌 712100)¹

(中国农业科学院蔬菜花卉所 北京 100086)² (西北农林科技大学葡萄酒学院 杨凌 712100)³

摘要: 利用单菌落 PCR 法直接筛选含有 GFP、LTB-ST 外源基因的重组克隆, 阳性克隆可以扩增出目的条带, 和质粒 PCR 扩增的结果一致。同时, 单菌落 PCR 法也可应用于重组质粒转化后的农杆菌的筛选, 单菌落 PCR 法的扩增结果和农杆菌液扩增的结果一致。结果表明, 单菌落 PCR 法是一个有效简便的鉴定重组阳性克隆的方法。

关键词: 单菌落 PCR 法, GFP, LTB-ST, 重组克隆, 筛选

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0052-05

Rapid Characterization of Recombination Clone by PCR Screening of Individual Bacterial Colonies*

CHEN Shu-Xia¹ WANG Xiao-Wu² FANG Yu-Lin^{3*}

(Department of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling 712100)¹

(Institute of Vegetable Crops, China Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100086)²

(College of Enology, Northwest A & F University, Yangling 712100)³

Abstract: The recombination clones contained GFP, LTB-ST foreign gene were screening by PCR using individual bacterial colonies as template, the aimed band was amplified from positive clones, the result was as well as plasmid PCR. The selecting of agrobacterium transformed with recombination plasmid could also use this method of PCR screening of individual bacterial colonies. The result of individual bacterial colonies PCR was as well as that of PCR using bacterial solution as template. It showed that the method individual bacterial colonies PCR was an efficient, easy one that characterized recombination clones.

Key words: Individual bacterial colonies PCR, GFP, LTB-ST, Recombination clone, Screening

在基因工程操作过程中常常涉及到阳性克隆的筛选。尤其要筛选的重组质粒菌落比较多时, 如何快速简便的挑选出阳性克隆是关键的一环。通常, 重组质粒菌落的筛选有探针杂交、小规模制备质粒 DNA 进行酶切鉴定或 PCR 扩增、蓝白斑筛选等多种方法。其中 PCR 技术能够快速、灵敏、特异地扩增目的基因片段, 操作程序相对简单, 在基因工程操作中应用得很广泛。但是常规的 PCR 扩增需要进行细菌培养、质粒制备等多步操作后才能进行基因扩增, 操作繁琐, 耗时较长, 同时在反复的操作中 DNA 量损失也较大, 产率较低^[1]。为了简化操作程序, Gussow 和 Clackon 提出菌落 PCR 的方法, 即用无菌牙签挑取单个菌落到 TE 缓冲液中, 煮沸 5min, 涡旋振荡后短暂离心, 用 1~2μL 裂解液作为 DNA 模板^[2], 省去抽提模板 DNA 这一步, 大大节约了时间和成本, 是一种经济、快速、准确的好方法^[3]。我们在应用的过程中, 发现还可以对其进行进

* 西北农林科技大学科研专项基金资助 (No. 052R067)

** 通讯作者 Tel: 029-87091364, E-mail: fangyulin@sohu.com

收稿日期: 2005-08-01, 修回日期: 2005-09-03

一步改良,即利用牙签直接沾取一点单菌落作为模板进行扩增反应^[4],更大量的节约了时间,简化了操作程序,和常规 PCR 进行比较以后发现,单菌落 PCR 可以有效的筛选出阳性重组克隆,对转化后的农杆菌进行筛选也同样有效。本实验中采用绿色荧光蛋白基因 (green fluorescent protein, GFP) 和不耐热肠毒素 B 亚基和耐热肠毒素融合基因 (LTB-ST) 作为扩增对象。利用单菌落 PCR 对重组克隆进行筛选,并和常规 PCR 结果进行了比较,提供了一种简便快速经济的筛选重组克隆的有效方法。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

所用的感受态大肠杆菌购自北京天为时代生物技术公司,含有 GFP 基因的表达载体 PAVA319、95TM 芜菁花叶病毒表达载体、PVX 病毒表达载体及农杆菌 MOG101 和 LBA4404 由中国农业科学院蔬菜所生物技术室保存,含有融合基因 LTB-ST 的表达载体由军事医学科学院流行病学研究室张兆山研究员提供。大肠杆菌辅助 HB101 质粒由中国农业科学院生物工程研究中心提供。GFP-95TM、LTB-ST-PVX 为本实验所构建的重组菌。

1.2 内切酶及试剂

各种工具酶购自 Promega 公司及六合通生物技术公司。所用常规化学试剂由中国农业科学院蔬菜所生物技术室保存。

1.3 PCR 反应产物的制备

根据 GenBank 中公布的 GFP 和 LTB-ST 的序列分别进行引物设计。GFP 的引物为: GFP F 5' ATG GGT AAA GGA GAA CTT TTC 3' 为上游引物;

GFP R 5' CGC GGTACC GAT AGA TCT GTA TAG TTC ATC 3' 为下游引物。

根据 LTB-ST 的融合基因序列设计引物。所设计的引物为:

LTB-ST F 5' GGC ATCGAT ATG AAT AAA GTA AAA TTT TAT GTT TTA T 3' 为上游引物;

LTB-ST R 5' TCT CGCGCCGC GCA CCC GGT ACA AAG AGG AT 3' 为下游引物。

为了和载体相连接,分别在设计 GFP 引物和 LTB-ST 融合基因引物时加上酶切位点。以 PAVA319 为模板以 GFP F 和 GFP R 为引物扩增 GFP 基因,扩增产物经过 *KpnI* 酶切以后,与经过 *NaeI* 和 *KpnI* 双酶切的 95TM 芜菁花叶病毒表达载体相连。然后以 PXZL01 为模板以 LTB-ST F 和 LTB-ST R 为引物进行 LTB-ST 融合基因的扩增,扩增产物与 PVX 病毒表达载体经过 *Clal* 和 *NotI* 双酶切后进行连接,将两个基因的连接产物转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,并涂布于含有卡那霉素 (50mg/ μ L) 的 LB 固体培养基上,37℃ 培养过夜,等菌落长至一定大小。

1.4 PCR 扩增与菌落备份

先配制 PCR 扩增反应液,扩增液采用 10 μ L 反应体系。同时准备对进行扩增的菌落进行备份。预先做好 1 块含有卡那霉素的空白 LB 平板在其背面分格,并对所分的格进行编号。用灭菌的枪头轻轻在 1 个菌落上沾 1 下,在空白平皿上对应背面所分的小格点 1 下。再换取另外 1 个灭菌枪头轻沾该菌落,在扩增液中轻轻吹打几下,确保枪头上的菌体吹入扩增液中。将扩增管瞬时离心后进行反应。反应在 PCR 200 型 PCR 仪

上进行, GFP 的扩增程序是 95℃ 3min; 94℃ 30s, 54℃ 30s, 72℃ 1min, 30cycles; 72℃ 5min. LTB-ST 的扩增程序是 94℃ 3min; 94℃ 1min, 58℃ 2min, 72℃ 2min, 35 cycles; 72℃ 5min. 将备份的平皿用 parafilm 膜封好, 置 37℃ 培养, 菌落出现后放入 4℃ 冰箱保存。

为了验证单菌落 PCR 的扩增效果, 对所扩增的菌落进行摇菌, 收集菌体, 用碱裂解法提取质粒, 用质粒作为模板进行 PCR 扩增。然后比较单菌落 PCR 和质粒 PCR 的结果。

1.5 重组质粒转化农杆菌 MOG101

制备感受态农杆菌, 将所筛选到的阳性克隆利用三亲融合法转入农杆菌 MOG101 中。用无菌枪头挑取转化成功的农杆菌阳性克隆, 接种在附加有相应抗生素的 YEP 液体培养基中, 28℃, 180r/min, 培养至 OD 值为 0.5。取少量菌液作模板, 采用常规 PCR 进行 PCR 扩增。同时, 用无菌枪头挑取一点农杆菌阳性克隆, 在预先配制好的扩增液中轻轻吹打几下, 确保枪头上的菌体吹入扩增液中, 进行单菌落 PCR 扩增。比较两者的结果。

2 结果分析

2.1 GFP 重组菌的单菌落 PCR 和质粒 PCR 扩增结果

用挑取的部分菌落直接作 PCR 扩增, 经电泳分析发现可以扩增出约 719bp 的条带, 与期望的条带大小一致, 在所检测的克隆中有 6 个表现为阳性, 重复扩增结果稳定 (图 1)。为了验证单菌落 PCR 的正确性, 提取这 6 个表现为阳性的菌落的质粒, 进行质粒 PCR 扩增, 结果 (图 2)。进行的质粒 PCR 能清晰的扩增出来 GFP 基因的目的片段。但从结果的比较来看, 单菌落 PCR 扩增的效果不如质粒 PCR, 单菌落 PCR 的扩增产物量表现得并不一致, 扩增产物量有的多, 有的少。而质粒 PCR 扩增的条带清晰, 较整齐。

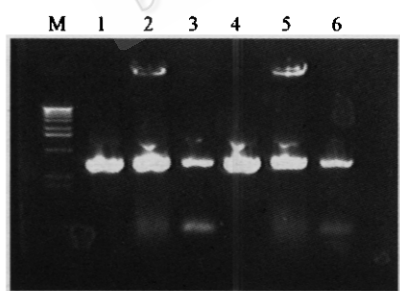


图 1 GFP 重组菌的单菌落 PCR 扩增

M 1kb ladder, 1 PAVA319, 2~6 GFP 重组菌

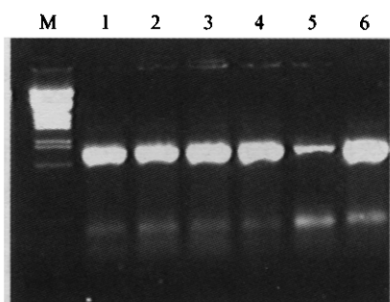


图 2 GFP 重组质粒 PCR 扩增

M λDNA/EcoRI + HindIII, 1 PAVA319, 2~6 GFP 重组质粒

2.2 LTB-ST 重组菌的单菌落 PCR 和质粒 PCR 扩增结果

用单菌落 PCR 法直接进行 LTB-ST 重组菌的扩增, 在所检测的 3 个克隆中, 经过电泳检测发现有两个克隆扩增出了大约 600bp 的条带 (如图 3), 同时进行质粒 PCR (如图 4) 进行验证, 发现能够扩增出该条带, 空白对照没有扩出该带, 说明不存在污染的情况, 而且单菌落 PCR 和质粒 PCR 的扩增结果是一致的。

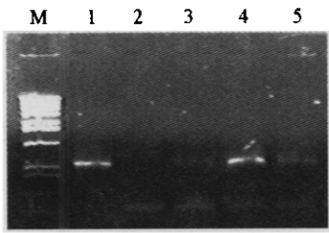


图 3 LTB-ST 重组菌的单菌落 PCR 扩增
M 1kb ladder, 1 PXZL01, 2 空白对照,
3~5 LTB-ST 重组菌

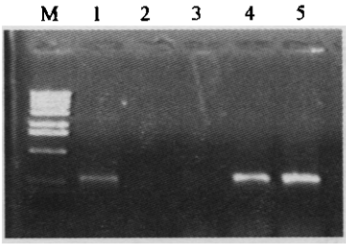


图 4 LTB-ST 重组质粒 PCR 扩增
M 1kb ladder, 1 PXZL01, 2 空白对照,
3~5 LTB-ST 重组质粒

2.3 GFP 农杆菌克隆的单菌落 PCR 和质粒 PCR 扩增结果

将所筛选到的 GFP-95TM 阳性克隆利用三亲融合法转入农杆菌 MOG101 中以后, 用无菌枪头挑取部分菌落直接作单菌落 PCR 扩增, 发现能扩增出目的条带 (如图 5)。摇菌以后, 取少量菌液作模板进行 PCR 扩增, 扩增的结果 (如图 6) 和单菌落 PCR 扩增结果相同。

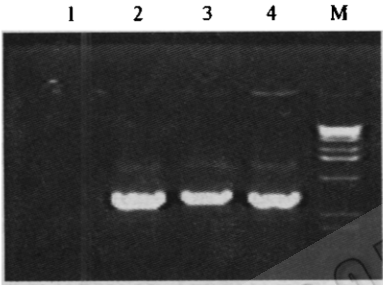


图 5 GFP 重组质粒转化农杆菌后的
单菌落 PCR 扩增
1 MOG101, 2~3 导入重组质粒的农杆菌,
M λ DNA/*EcoRI* + *HindIII*

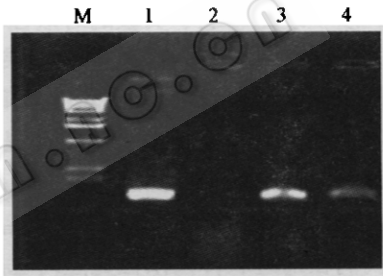


图 6 GFP 重组质粒转化农杆菌后的
菌液 PCR 扩增
M λ DNA/*EcoRI* + *HindIII*, 1 阳性对照,
2 MOG101, 3, 4 导入重组质粒的农杆菌

2.4 LTB-ST 农杆菌克隆的单菌落 PCR 和质粒 PCR 扩增结果

所筛选到的 LTB-ST-PVX 阳性克隆利用三亲融合法转入农杆菌 LBA4404 中以后, 用无菌枪头挑取部分菌落直接作单菌落 PCR 扩增, 发现能扩增出目的条带 (如图 7)。摇菌以后, 取少量菌液作模板进行 PCR 扩增, 扩增的结果 (如图 8) 和单菌落 PCR 扩增结果相同。

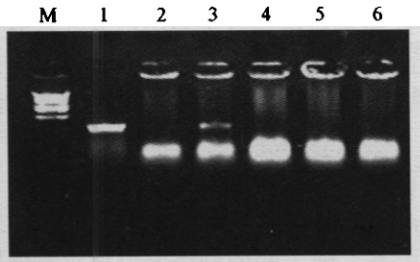


图 7 LTB-ST 重组质粒转化农杆菌后的
单菌落 PCR 扩增
M 1kb ladder, 1 阳性对照,
2, 4~6 阴性农杆菌, 3 阳性农杆菌

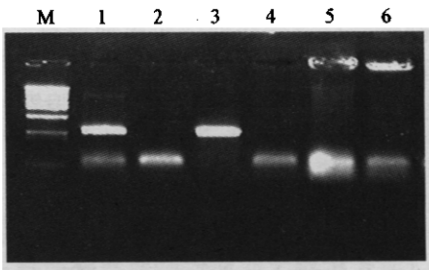


图 8 LTB-ST 重组质粒转化农杆菌后的
菌液 PCR 扩增
M 1Kb ladder, 1 阳性对照,
2, 4~6 阴性农杆菌, 3 阳性农杆菌

2.5 测序验证

将用单菌落 PCR 鉴定的重组质粒转入 Top10 大肠杆菌以后, 送交测序公司代为测序, 测序结果经 DNASTar 分析是正确的, 在所分析的核苷酸序列中, 目的基因内部核苷酸无错位、移码和无义突变现象。证明单菌落 PCR 进行重组菌阳性克隆的鉴定是非常有效的。

3 讨论

常规 PCR 技术是目前分子生物学技术中的一种常用的鉴定方法和技术手段, 在严格操作的前提下, PCR 的结果十分可靠的。但常规 PCR 扩增需要一些前期准备工作, 如 DNA 模板的制备与纯化, 操作繁琐, 耗时费力, 成本较高, 而且 DNA 制备过程中的某种试剂对扩增会带来不良影响等^[4], 凡此种种都为实验带来了很大不便。因此, 很多研究者在前人研究的基础上, 做了一系列的改进, 希望能够简便快速的挑选阳性重组克隆^[3,6]。如有的研究认为需将待筛选的重组克隆放入 LB 培养基中, 煮沸以释放 DNA^[2], 或者要求延长 PCR 的预热时间^[7], 此种改进虽然有效地简化了试验流程, 但某种程度上还是影响了实验的时效性。我们用单菌落直接作 PCR 扩增, 且 PCR 预热时间为 3min, 就可以扩增出理想的效果。除了可以用来筛选 DNA 重组克隆之外, 也可以用来筛选重组 DNA 转化后的农杆菌阳性克隆。农杆菌质粒的提取还没有一个较好的办法, 至今还是采用大肠杆菌的质粒提取方法, 但效果一直不佳。筛选转化后农杆菌阳性克隆一般都是将农杆菌进行扩繁, 即在摇床上对农杆菌进行振荡培养, 然后再用摇出的农杆菌液作为模板进行 PCR 扩增。但农杆菌的扩繁需要较长的时间。为了节约时间, 我们在筛选农杆菌阳性克隆时也用单菌落 PCR 方法进行筛选, 发现此种方法能有效准确的筛选出阳性克隆。

就单菌落 PCR 和质粒 PCR 的扩增效果来说, 单菌落 PCR 的扩增效果不如质粒 PCR。从电泳图上可以看出, 单菌落 PCR 在扩增的过程中存在一些非特异扩增, 而且扩增出的目的条带的产物量也不一致, 有的多有的少, 而质粒 PCR 扩增的条带比较整齐一致。这可能是因为挑取重组克隆时所挑取的样品量不一致。而提取的质粒在扩增前一般都调整到一个大致相同的浓度, 加样品的时候一般 10 μ L 反应体系加 1 μ L 进行扩增。同样的道理, 用农杆菌液进行扩增的效果也比单菌落 PCR 扩增的效果好。但从总的试验效果来看, 单菌落 PCR 能够有效准确的筛选出阳性克隆, 无疑是一个简便有效的筛选重组克隆好方法。

参考文献

- [1] 徐 丽, 蔡俊鹏. 华南理工大学学报 (自然科学版), 2004, 32 (5): 51 ~ 56.
- [2] Cussow D, Glackson T. Nucleic Acids Res, 1989, 17: 4000.
- [3] 唐晔盛, 李 英. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29 (2): 316 ~ 318.
- [4] 刘伏玲, 倪晓燕, 马咸成. 中国现代医学杂志, 2002, 12 (9): 70 ~ 76.
- [5] 蓝海燕, 田颖川. 新疆农业大学学报, 1999, 22 (3): 197 ~ 199.
- [6] Tonu T, Harvey F L. BioTechniques, 1994, 17: 443 ~ 445.
- [7] 生秀杰, 周伟强, 姜 莉, 等. 中华检验医学杂志, 2002, 25 (4): 239 ~ 240.