

便于抗性基因分离和分子重组的系列质粒的构建*

刘大伟 牛丹丹 张 梁 石贵阳 王正祥**

(江南大学生物工程学院和工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘要 在分子克隆实验中,选择性标记特别是抗生素抗性标记是最常用和不可或缺分子材料。为便于实验室获得和使用携带有不同末端序列的选择性标记,以质粒 pBlueScript SK(-)为基础,构建了分别携带有卡那霉素、博来霉素、红霉素、潮霉素和庆大霉素等抗性基因的系列质粒 pSKsymKm、pSKsymBle、pSKsymEry、pSKsymHyg 和 pSKsymGm。通过限制性酶切和胶回收技术,可以从上述构建的质粒中方便地获得带有理想接头的抗生素抗性基因。

关键词 选择性标记,抗性基因,分离

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0926-03

Concise Plasmids for Antibiotic Resistance Cassette Recovery and *in Vitro* Recombination*

LIU Da-Wei NIU Dan-Dan ZHANG Liang SHI Gui-Yang WANG Zheng-Xiang**

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education and School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract In gene manipulation, different selectable markers with various linkers are necessary. In order to get selectable markers directly, we constructed from pBlueScript SK(-) a series of particular plasmids, pSKsymKm, pSKsymBle, pSKsymEry, pSKsymHyg and pSKsymGm, each contains Kanamycin, Bleomycin, Erythromycin, Hygromycin or Gentamycin resistance cassette. By restriction enzyme digestion and gel extraction, any of five antibiotic resistance genes with specific ends can be conveniently obtained.

Key words Selectable marker, Antibiotic, Recovery

在基因操作中,经常需要获得一些常用的功能性或可选择性基因片段,常用的方法是先得到它基因序列的信息,通过多聚酶链反应(PCR)等方法获得。此外,也可以通过将该基因储存到一个质粒载体中,从而可以方便、安全、快速地获得。

在细菌的基因工程中,选择性标记的选择与获得都是至关重要的。抗生素抗性基因就是选择性标记中重要的一类(表1)。在基因克隆操作中,高效的选择性标记的合理和有效使用,将会提升筛选阳性克隆的工作效率。当构建某个基因的突变体时,也是经常采用在其中插入一选择性标记。因此,获得需要的选择性标记尤其是抗生素抗性基因将是分子、遗传研究中必须的一步。

表1 常用抗生素及它们的作用模式

抗生素	基因	来源	作用模式	Ref
Kan	<i>aphA2</i>	<i>E. coli</i> Tn601	抑制蛋白质合成,阻遏转录和引起错配	[2,3,5]
Gm	<i>aac3</i>	<i>E. coli</i>	通过绑定到50S核糖体亚基的L6蛋白上阻止蛋白质合成	[2,7]
Hyg B	<i>HphphIV</i>	<i>E. coli</i>	阻止肽合成,抑制肽链延伸	[3,6,11]
Ery	<i>erm</i>	<i>Str. pyogenes</i>	绑定到核糖体大亚基新生肽输出通道的入口,阻止长度长于6和8个氨基酸之间的肽链合成	[10]
Ble	<i>ble</i>	<i>E. coli</i> Tn5	在Fe ²⁺ 和分子氧存在下,引起DNA解链	[3,4,9]

* 新世纪优秀人才支撑计划 (No. NCET-04-9704)

** 通讯作者 Tel 0510-85918121, Fax 0510-85879781, E-mail zzwang@sytu.edu.cn

收稿日期:2007-01-11,修回日期:2007-05-09

传统获得抗生素抗性基因的方法之一是设计带有特别接头的引物进行 PCR 反应。不足之处是它需要较多的时间去设计引物以及摸索 PCR 反应条件,而且经常需要不止一个抗生素选择性标记。为了解决这个问题,本研究中使用了一种质粒载体来携带不同的抗生素抗性基因,通过相应的限制性内切酶酶切和胶回收快捷地得到抗生素抗性基因。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

Escherichia coli JM109, *Bacillus subtilis* 168, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 均由江南大学中国高校工业微生物资源和信息中心(<http://CICIM-CU.sytu.edu.cn>)提供。pSKsym(图 1A)由 Overhage 等提供^[1],其它质粒的性质见表 2。pSUP5011, pMut4, pRS41-H, pBBR1MCS-5 和 pDG148-*Stu* 均由江南大学中国高校工业微生物资源和信息中心提供。涉及的携带有质粒的细菌均使用 LB 培养基,于 37℃ 培养。

表 2 本研究中所涉及的抗生素抗性标记

抗性	表现型	来源	应用范围
Km	Kanamycin resistance	pSUP5011 ^[12]	支原体, G ⁺ /G ⁻ 细菌
Ery	Erythromycin resistance	pMut4	G ⁺ /G ⁻ 细菌
Hyg	Hygromycin resistance	pRS41-H	真核/原核
Gm	Gentamycin resistance	pBBR1MCS-5 ^[13]	支原体, G ⁺ /G ⁻ 细菌
Ble	Bleomycin resistance	pDG148- <i>Stu</i> ^[14]	真核/原核

1.2 试剂

限制性内切酶、T4 连接酶、Taq 和 Pfu DNA 聚合酶购自 Fermentas 公司;卡那霉素、红霉素、庆大霉素是 BBI 公司的产品;潮霉素 B、博来霉素为 Invivogen 公司产品;胰蛋白胨和酵母膏均为 Oxoid 产品;其它生化试剂是国产分析纯。

1.3 质粒构建

本研究构建质粒所需抗性基因通过 PCR 扩增得到,所使用的引物见表 3。获得的卡那霉素抗性基因的 PCR 产物用 *Sma* I 消化后与经同样酶消化的 pSKsym 的 DNA 连接。用连接产物转化 *E. coli* JM109,通过在含有卡那霉素抗性的 LB 平板上筛选而得到质粒 pSKsymKm。Gm, Ery, Ble 和 Hyg 组份的克隆方法依此类同。所有重组质粒都用 *Sma* I 酶切,在 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳中检测。

表 3 本研究中所使用的引物

Primer	Sequence
Gm1	AA <u>ACC</u> CGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGCGCATGC
Gm2	TTTCCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAG
Ery1	GGGCAAAAGAAAAACGAAATGATACACCAATCA
Ery2	GGGACCTCTTTAGCTCTCTTGAAGCTG
Ble1	GGGCTGTTCATGGCGCATTAAACGG
Ble2	GGGTTTTGCTCTCTGCTCTGTTA
Kan1	AA <u>ACC</u> CGGGACAGCAAGCGAACCGGAATGACCAGCTGGGG
Kan2	AA <u>ACC</u> CGGGCGTCGCTTGGTCGGTCATTTGGAACCCC
Hyg1	GGGACATTTTATGATGGCCGACCG
Hyg2	GGGA <u>ACT</u> CCTTCCTTTTCGGTTAGAGCG

1.4 常用克隆宿主细胞对抗生素的耐受性实验

选择 *E. coli* JM109, *B. subtilis* 168 和 *B. licheniformis* (ATCC14580)等作为模式菌株,检测它们对抗生素的耐受性。这些模式菌株都在 LB 培养基中(含 2% 的琼脂)培养,在 37℃ 培养 12h。

2 结果与讨论

依据序列信息设计引物,通过 PCR 扩增获得相应抗性基因片段;将得到的基因片段连接到经过限制性酶切的 pSKsym 质粒上,转化 *E. coli* JM109,在含有该抗生素的抗性平板上筛选转化子,提取质粒用 *Sma* I 酶切电泳检测。

以 pSKsym 为基础,构建一组携带有各种选择性标记的质粒 pSKsymKm, pSKsymGm, pSKsym Ery, pSKsymBle 和 pSKsymHyg(图 1)。从中回收的 Km, Gm, Ery, Ble 和 Hyg 基因片段,分别带有 *Sma* I, *Eco*RI, *Hind*III 或 *Sal* I 酶切位点。

其中插入的抗性基因片段最长的(图 1 E)有 1.3kb,最短的(图 1 F)仅有约 800bp,其余的长度相仿,约 1kb(图 1. B, C 和 D)。从酶切位点来看,除了 pSKsymHyg(图 1 E)中的抗性基因中含有一个 *Eco*RI 位点不能作为接头外,其余的抗性基因中均不含有与接头中相同的酶切位点。此外,接头中所选取的酶切位点涵盖了平端与粘端,而且所使用的限制性内切酶都是较廉价并在实验室中广泛使用的。从所包含的抗性基因上来看,其应用范围涵盖了革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、酵母菌和丝状真菌等实验室中常用的实验材料,基本可以满足各方面的需要。

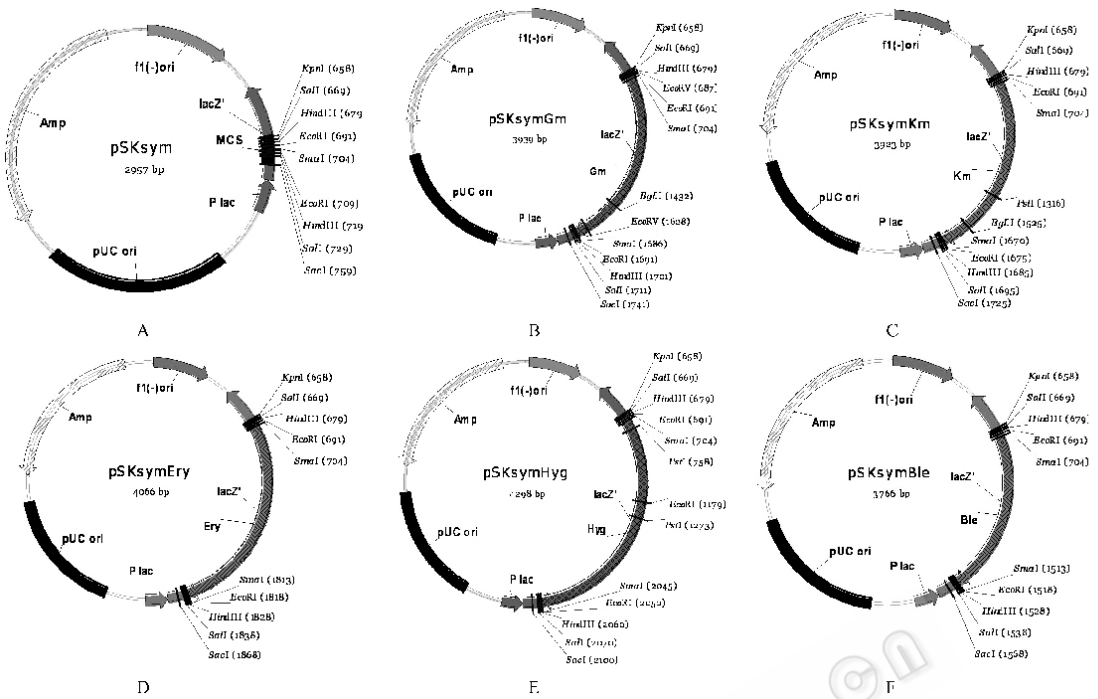


图1 本研究中所构建质粒的物理图谱

A pSKsym, B pSKsym Gm, C pSKsym Km, D pSKsym Ery, E pSKsym Hyg, F pSKsym Ble

表4 本研究中抗生素的筛选浓度

抗生素	最合适的抗生素筛选浓度 (μg/mL)		
抗性	<i>E. coli</i> JM109	<i>B. subtilis</i> 168	<i>B. licheniformis</i> (ATCC14580)
Km	30	8	10
Ery	150	250	5
Hyg	30	30	30
Gm	15	5	5
Ble	3	50	3

本研究得到了相关模式菌株在基因操作实验中所常用的抗生素选择浓度(表4)。这里着重选择了有代表性的革兰氏阳性菌和阴性菌进行了抗性实验,其中的地衣芽胞杆菌(ATCC14580)作为新的G⁺菌模式菌株,其全基因组序列图谱在04年9月公布,可以预见对它的研究将成为热点,所以给予了较多的关注。另外,表4列出的抗生素选择浓度是本实验室长期实验基础上所积累起来的,适用于各种拷贝的质粒的克隆与筛选。不过,在使用该数据时要注意相应抗生素的使用条件,例如博来霉素的使用是pH依赖的,pH越高,菌体对其越敏感,一般使用低盐LB平板,pH7.5。

致谢 德国 A. Steinbuchel 教授为本研究提供了重要的研究材料 pSKsym, pSUP5011 和 pBBR1MCS-5, 特此致谢。

参考文献

[1] Overhage J, Priefert H, Rabenhorst J, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 52: 820 ~ 828.

[2] Elisabeth A R, Karen E, Roger B. Current Protocols in Molecular Biology: John Wiley & Sons, Inc. 2002.

[3] Miki B, McHugh S. J Biotechnol, 2004, 107: 193 ~ 232.

[4] Perez P, Tiraby G, Kallerhoff J, et al. Plant Mol Biol. 1989, 13: 365 ~ 73.

[5] Carrer H, Hockenberry T N, Svab Z, et al. Mol Gen Genet, 1993, 241: 49 ~ 56.

[6] Waldron C, Murphy E B, Roberts J L, et al. Plant Mol Biol, 1985, 5: 103 ~ 108.

[7] Julian D, Gerard D W. Trends Microbiol, 1997, 5: 234 ~ 239.

[8] Foster T J. Microbiol Rev, 1983, 47: 361 ~ 409.

[9] Pittillo R, Woolley C, Rice L. Appl Microbiol, 1971, 22(4): 564 ~ 566.

[10] Lovmar M, Nilsson K, Vimberg V, et al. J Biol Chem, 2006, 281: 6742 ~ 6750.

[11] Pfister P, Risch M, Brodersen D E, et al. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2003, 47: 1496 ~ 1502.

[12] Simon R. Mol Gen Genet, 1984, 196: 413 ~ 420.

[13] Kovach M E, Elzer P H, Robertson G T, et al. Gene, 1995, 166: 175 ~ 176.

[14] Joseph P, Fantino J R, Herbaud M L, et al. FEMS Microbiol, 2001, 205: 91 ~ 97.