

一种构建载体的新方法: 一步式混合胶回收连接法

李顺姬^{1a, 1b}, 胡珏^{1a, 1b}, 刘双清^{1b}, 成小文^{1a, 1b}, 黄国华^{1a, 1b, 2*}

(1.湖南农业大学 a.病毒研究所; b.植物保护学院, 湖南 长沙 410128; 2.植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘要:以构建原核表达载体重组质粒 G4FPAGB1 为例, 介绍了一种新的载体构建方法。棉铃虫单核衣壳核多角体病毒 G4 毒株基因组上的 Ha-FP-A 片段用 *Hin* d III 和 *Eco* R V 双酶切, Ha-FP-B 片段用 *Xho* I 和 *Bam* H I 双酶切, 绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)基因片段用 *Eco* R V 和 *Xho* I 双酶切, 载体质粒 pBluescript SK (+)用 *Hin* d III 和 *Bam* H I 双酶切。酶切产物经电泳检测后, 将所有含目的片段的胶块切下, 放在同一个离心管中进行 DNA 回收, 得到的混合 DNA 产物直接加入连接酶进行连接、转化。结果表明, 3 个目的片段均成功连接到载体质粒上。本方法可高效、简单地构建包含多个目的片段的重组质粒。

关键词: 载体构建; 克隆方法; 一步式混合胶回收

中图分类号: Q78 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2015)01-0058-04

A novel method for vector construction: Gel extraction of mixed target DNA fragments before ligation

Li Shunji^{1a, 1b}, Hu Jue^{1a, 1b}, Liu Shuangqing^{1b}, Cheng Xiaowen^{1a, 1b}, Huang Guohua^{1a, 1b, 2*}

(1.a.Institute of Virology; b.College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: A simple vector construction procedure, allowing rapidly and efficiently clone DNA fragments into cloning vector, was recommended in this study by taken target DNA fragments, Ha-FP-A and Ha-FP-B from *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedro virus (HaSNPV) of G4, green fluorescent protein gene (GFP) and an appropriate cloning vector of G4FPAGB1 as examples. Fragment of them were digested as follows: Ha-FP-A by *Hin* d III and *Eco* R V, Ha-FP-B by *Xho* I and *Bam* H I, GFP by *Eco* R V and *Xho* I, and the vector by *Hin* d III and *Bam* H I, respectively. All these fragments and vectors were determined with electrophoresis first, and then extracted from the gel at the same tube. Following the ligation system developed, the mixture of target DNA fragments was automatically ligated and transformed. The Results showed that the 3 target DNA fragments were all successfully ligated to the plasmid vector. Therefore, this method was simple, efficient and universal for the recombination of plasmid vector production.

Keywords: vector construction; cloning method; one-step mixed gel extraction

载体构建是分子生物学与基因工程中的一种重要的实验技术^[1], 一般要求较高的重组效率和准确性以及更多的目的片段相连^[2-3]。目前包含多个

片段的载体构建往往需要对多个片段单独进行回收, 测定目的片段 DNA 浓度, 再根据各浓度大小进行配比调整, 构建中间载体, 多次连接转化, 费

时,费力,且难以保证高效率^[4]。本研究中以棉铃虫单核衣壳核多角体病毒(*Heliocoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedro virus, HaSNPV) G4 毒株上 2 个目的片段(Ha-fp-A、Ha-fp-B)与绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)基因、pBluescript SK (+)载体质粒为材料,拟建立一种简单、通用、高效的表达载体构建方法。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 质粒及菌株

G4 毒株基因组 DNA(GenBank 登录号: AF271059.2)为湖南农业大学病毒研究所保存; pBluescript SK(+) 载体质粒(以下简称 SK 质粒)购于美国 Stratagene(加利福尼亚)公司;大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.2 工具酶及试剂

限制性内切酶 *Hin* d III、*Eco* R V、*Xho* I、*Bam* H I 以及 DNA 连接酶和质粒提取试剂盒、DNA Marker 均购自北京全式金生物技术有限公司;PCR 高保真 *Pfu* 酶和胶回收用 Glass milk 试剂盒购自 Bio101(美国加利福尼亚)公司。

1.1.3 荧光标记基因

GFP 基因片段(内含 *Hin* d III酶切位点)由植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室保存于 pBlueGFP 质粒中^[5]。

1.1.4 引物

扩增目的片段 Ha-fp-A 与 Ha-fp-B(以下简称 A 片段、B 片段)的 PCR 引物碱基序列见表 1。所有附加酶切位点的引物均由深圳华大基因公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 The primer sequences

扩增片段	引物名称	附加酶切位点	引物序列(5'→3')
Ha-fp-A	Ha-FP-A-F	<i>Hin</i> d III	gcgAAGCTT <u>GAGCCACGTG</u> TTTTTCGAC
	Ha-FP-A-R	<i>Eco</i> R V	gcgGATATCCCGTAAATTTCTACCGTGTGCG
Ha-fp-B	Ha-FP-B-F	<i>Xho</i> I	gcgCTCGAGCTACAAGTACGTGTCGCTG
	Ha-FP-B-R	<i>Bam</i> H I	gcgGGATCCTTCGTCGCGGTACGTTTC

下划线标注的碱基代表外切酶的识别位点;小写字母代表保护碱基。

1.2 方法

1.2.1 目的片段的 PCR 扩增

用 PCR 扩增 A 片段、B 片段,PCR 反应体系为 10 ng/ μ L 模板 DNA(G4 病毒株)1 μ L, 20 μ mol/L 上游引物(Ha-FP-A-F 或 Ha-FP-B-F)1.25 μ L, 20 μ mol/L 下游引物(Ha-FP-A-R 或 Ha-FP-B-R)1.25 μ L, 10 \times *Pfu* Buffer 10 μ L, dNTP (2.5 mmol) 4 μ L, 2.5 U *Pfu* 酶 0.5 μ L, ddH₂O 38 μ L。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min、55 $^{\circ}$ C 退火 1 min、68 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环。

1.2.2 目的片段的酶切以及质粒线性化

将 A 片段、B 片段的 PCR 产物分别连接至 SK 载体质粒上,提取阳性质粒,再分别以 *Hin* d III和 *Eco* R V 双酶切获得备用的 A 片段;以 *Xho* I 和 *Bam* H I 双酶切获得备用的 B 片段;pBlueGFP 质粒载体以 *Eco* R V 和 *Xho* I 双酶切获得荧光标记基因 *GFP*,再

以 *Hin* d III与 *Bam* H I 双酶切使 SK 质粒线性化。

1.2.3 回收、连接与转化

对 1.2.2 的所有酶切产物进行电泳,将所有需要连接的片段的凝胶放入同一离心管中,按每克胶块 3 mL 的量加入 NaI 溶液,50 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 5 min,使胶块溶解,加入 5 μ L 左右的 Glass milk 悬浮液上下摇动 20 min 后,6 000g 快速离心 10 s,去上清;加入 500 μ L NEET wash 溶液洗脱沉淀,14 800g 离心 1 min,去上清,重复 3 次,在 50 $^{\circ}$ C 下干燥,弃所有液体,5 μ L ddH₂O 重新悬浮,在 50 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 10 min 左右,最后 14 800g 离心 1 min,取 5 μ L 上清至一干净的离心管中,加入 5 \times DNA 连接缓冲液 2 μ L、dd H₂O 2 μ L 以及 DNA 连接酶 1 μ L 充分混匀配成连接体系,4 $^{\circ}$ C 连接过夜。取冰浴后的连接产物 3 μ L,加入冰上冻融的 DH5 α 大肠杆菌感受态 50 μ L 中,用电转仪进行电击(BioRad 公司,200 μ L 转化杯,2.5 kV,200 Ω ,25 μ F),然后室温下加入 500 μ L 的 SOC

培养基, 37 °C 低速(250 r/min)振荡培养 1 h。

1.2.4 重组质粒的酶切鉴定

取 1.2.3 所得菌液涂在含有 IPTG 和氨苄青霉素的固体培养基板上, 倒置隔夜培养 12~16 h, 挑取白色单菌落, 用引物 Ha-FP-A-F 和 Ha-FP-B-R 筛选出阳性菌落, 提取质粒 DNA, 以 *Hind* III 与 *Bam* H I 双酶切进行质粒鉴定。

2 结果与分析

2.1 目的片段 A、B 的 PCR 扩增结果

以 HaSNPV 的 G4 毒株基因组 DNA 为模板, 按照 1.2.1 的条件扩增目的片段(A、B), 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。A 片段大小约为 600 bp, 与目标长度 637 bp 相近; B 片段大小约为 500 bp, 与目标长度 531 bp 相近。

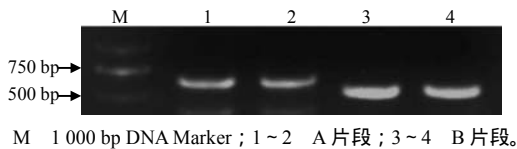


图 1 A 片段与 B 片段的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification for A and B fragments

2.2 目的片段的获得以及载体质粒线性化结果

酶切结果如图 2 所示。A 片段、B 片段的阳性质粒分别经 *Hin* d III、*Eco* R V 和 *Xho* I、*Bam* H I 双酶切, 得到 A 片段大小约为 600 bp, B 片段大小

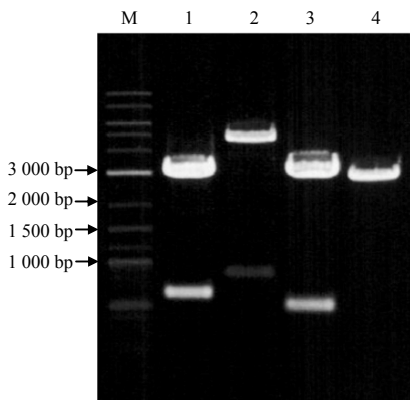


图 2 限制性内切酶 *Hin* d III、*Eco* R V、*Xho* I 以及 *Bam* H I 酶切结果

Fig. 2 Fragments digested by *Hin* d III, *Eco* R V, *Xho* I and *Bam* H I

约 500 bp; 含荧光标记基因 *GFP* 的 pBlueGFP 质粒载体经 *Eco* R V 和 *Xho* I 酶切得到 *GFP* 基因片段的大小约为 900 bp, pBlueGFP 质粒约为 5 000 bp; SK 质粒经 *Hin* d III 与 *Bam* H I 酶切线性化后大小约 2 900 bp。上述所有片段的酶切结果均与预期一致。经酶切后得到 A 片段左端、B 片段右端分别具有可与线性化的 SK 质粒连接的黏性末端, 而 A 片段右端、B 片段左端分别具有可与 *GFP* 片段连接的黏性末端。

2.3 含目的载体的阳性菌落检测结果

阳性菌落筛选检验结果如图 3 所示。PCR 扩增产物(引物为 Ha-FP-A-F 和 Ha-FP-B-R)的大小约为 2 000 bp, 与预期片段大小(A 片段+*GFP* 基因片段+B 片段)一致, SK 质粒载体 G4FPAGB1(即将 A 片段、*GFP* 片段、B 片段同时连接在 SK 质粒上构建的载体)构建的连接转化成功率为 62.5%。

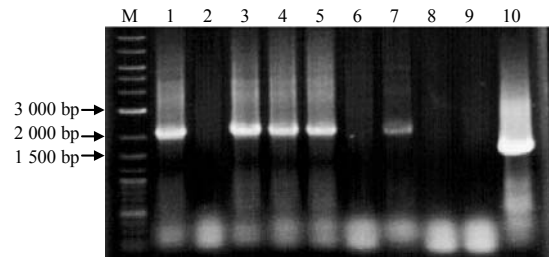


图 3 重组菌落的筛选结果

Fig. 3 Identification of recombinant clones from colony PCR

2.4 最终构建载体的验证结果

Hin d III 与 *Bam* H I 双酶切 G4FPAGB1 载体后的琼脂糖凝胶电泳结果见图 4。在 3 000、1 300、700 bp 处显示有 3 条亮带, 这与该质粒载体图谱

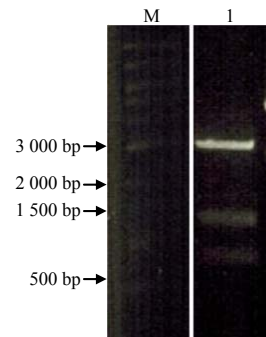


图 4 重组质粒经 *Hin* d III 与 *Bam* H I 双酶切验证的准确性

Fig. 4 Accuracy confirmation of the recombinant plasmid with *Hin* d III and *Bam* H I digested

(SK 质粒载体、A 片段+GFP 基因片段 *Hin* d III 酶切位点的前部分、B 片段+GFP 基因片段 *Hin* d III 酶切位点的后部分)完全吻合,证明用该方法构建载体成功。

3 结论与讨论

1) 提高回收效率,确保连接成功。目的片段 DNA 的浓度越大,连接的成功率越高^[6]。目前,DNA 胶回收的方法主要包括回收柱试剂盒法、Glass milk 法、低熔点琼脂糖法以及透析法^[7-10]。利用 Glass milk 试剂盒对 DNA 进行胶回收不受体积限制,其根据凝胶的体积加入对应量的 Glass milk 悬浮,利用 Glass milk 分子表面积大的特性,DNA 量越多,能够结合的 DNA 就越多。本方法基于 Glass milk 试剂盒将各个目的片段 DNA 混合进行回收,以增大 DNA 总量,使得 DNA 分子绑定率增加,从而避免了分开进行 DNA 片段回收时的回收率低、连接效率不高等问题。

2) 减浓度配比,实验简单高效。常规的多片段载体构建需对各个片段进行单独的胶回收,如果是 3 个以上的片段,则需准确把握各目的片段和载体的浓度,选择合适的浓度配比,并构建多个中间载体进行多次连接转化,而自连环化等情况易影响中间载体的构建。本研究方法能够一次性将 3~5 个目的片段进行胶回收,可节省大量的试剂、时间及精力,正确率在 90%以上,整个流程从拿到目的片段到获得所需载体可在 24 h 内完成。另有文献^[11-13]报道,可通过设计 PCR 同源引物,将几个目的片段分别克隆,然后利用相邻片段的末端同源区域进行一步式的载体构建,如此能够省去限制性内切酶酶切处理步骤,但该方法需要建立在已知目的片段序列的基础上,并且在设计同源引物的时候需要考虑匹配性等多方面因素。通常情况下,对于局部已知序列的目的片段,用本文介绍的方法,只需在引物合成时加上相应的限制性内切酶酶切位点进行常规 PCR 扩增,一步回收所有目的片段 DNA 即可。

参考文献:

- [1] Brown T. Gene cloning and DNA analysis: An introduction[M]. Manhattan: John Wiley & Sons, 2010.
- [2] Dugaiczky A, Boyer H W, Goodman H M. Ligation of *Eco*RI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures[J]. Journal of Molecular Biology, 1975, 96(1): 171-184.
- [3] Burns D M, Beacham I R. A method for the ligation of DNA following isolation from low melting temperature agarose[J]. Analytical Biochemistry, 1983, 135(1): 48-51.
- [4] Ish-Horowicz D, Burke J F. Rapid and efficient cosmid cloning[J]. Nucleic Acids Research, 1981, 9(13): 2898-2989.
- [5] Cheng X W, Krell P J, Arif B M. P34.8 (GP37) is not essential for baculovirus replication[J]. Journal of General Virology, 2001, 82(2): 299-305.
- [6] Capecchi M R. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells[J]. Cell, 1980, 22(2): 479-488.
- [7] Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979, 76(2): 615-619.
- [8] 苏明, 窦科峰, 赵爱志, 等. 提高柱式胶回收试剂盒 DNA 回收效率的最佳条件[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(6): 505-507.
- [9] 郑晶, 申洪. 创伤弧菌溶细胞毒素及金属蛋白酶的基因克隆、蛋白表达、抗体制备及其致病性研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2008.
- [10] 胡静, 温进坤. 三种从琼脂糖凝胶回收 DNA 片段方法的比较[J]. 中华医学遗传学杂志, 1994(4): 238-240.
- [11] 欧阳平, 李玉, 严红, 等. 一种载体构建的新方法: 一步克隆法[J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 2007, 29(2): 178-181.
- [12] Aslanidis C, de Jong P J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR)[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18 (20): 6069-6074.
- [13] 陆云华, 马立新, 蒋思婧. 一种通用高效的复杂载体构建的新方法[J]. 遗传, 2006, 28(2): 212-218.

责任编辑: 苏爱华

英文编辑: 王 库