

文章编号: 0529-6579 (2000) S2-0048-04

制备 12 kb 重组质粒载体的方法*

周 晓 强

(华美生物工程公司, 河南 洛阳 471003)

摘 要: 利用质粒载体 pGEM-7Zf (+) 克隆了一个长达 9224 bp 的 DNA 片段, 重组质粒大小达到 12003 bp. 该重组质粒可以转化到 JM109 受体菌中, 并且在随后的继代培养过程中具有较高的产量和相当高的稳定性. 对于利用质粒载体来克隆 DNA 片段来说, 设计的方法具有普遍的使用价值, 对于较大的 DNA 片段克隆, 该方法具有简便、可靠的特点, 不仅能够保证克隆成功, 而且极大的减少了筛选或鉴定重组菌的工作量.

关键词: 质粒载体; 克隆; 9 224 bp DNA 插入片段

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A

质粒载体一般应用于较小片段的 DNA 克隆或亚克隆, 对于较大的 DNA 片段 (7 kb), 一般要采用 λ 载体, 而对于更大的 DNA 片段 (> 10 kb), 一般要采用粘性质粒载体. 由于质粒的转化效率与其大小成反比, 而当质粒大于 15 kb 时, 转化效率将成为限制因素^[1]. 那么, 质粒载体能够插入的 DNA 片段究竟有多大, 现有的资料还没能明确说明. 为了制备质粒 DNA 相对分子质量标准, 或者用体外转录的方法制备 RNA 分子量标准, 都需要用质粒载体克隆尽可能大的 DNA 片段.

本文利用质粒载体 pGEM-7Zf (+) 来克隆长达 9 224 bp 的 DNA 片段, 使重组质粒大小达到 12 003 bp, 并就克隆方法的设计和选择在理论和实验上进行了探讨.

1 材料和方法

pGEM-7Zf (+) 质粒载体, Lambda DNA/*Eco*R I DNA 相对分子质量标准、Lambda DNA/*Hind*III DNA 相对分子质量标准, JM109 受体菌, 内切酶 *Eco*R I 和 *Sph* I、*T*₄ DNA 连接酶, 试剂盒 Onetube™ Recombinant Plasmid Screening System、RESINcolumn™ System for DNA Purification from Agarose Gel 和 RESINcolumn™ Mini-scale Plasmid DNA Purification System 等试剂均由华美生物工程公司生产.

1.1 DNA 插入片段的制备

将 Lambda DNA/*Eco*R I DNA 相对分子质量标准点样于 0.7% 琼脂糖凝胶并在 TAE 电泳缓冲液中电泳, 电泳后将最大的 DNA 片段 (21 226 bp) 从琼脂糖凝胶中挖出, 利用

* 收稿日期: 2000-01-06; 作者简介: 周晓强 (1965~), 男, 工程师, 硕士.

RESINcolumn™ System for DNA Purification from Agarose Gel 将该 DNA 片段纯化并溶解于 TE 缓冲液 (pH 8.0) 中. 将纯化的 DNA 片段用内切酶 *Sph* I 消化后, 可以得到 3 个长度分别为 2 212, 9 224, 9 790 bp 的 DNA 片段^[1], 其中的 9 224 bp 片段含有 *Sph* I 和 *Eco* R I 粘性末端, 该片段可以插入到 pGEM-7Zf (+) 质粒的 *Sph* I - *Eco* R I 位点中, 而 2 212 bp 和 9 790 bp 片段不具备和酶切质粒相匹配的两个粘性末端, 故不需要进一步的分离去除. 最后用 TE 缓冲液 (pH 8.0) 将酶切产物稀释到 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 待用.

1.2 质粒载体的酶切及纯化

将 pGEM-7Zf (+) 质粒载体用内切酶 *Sph* I 或 *Eco* R I 共同消化 1 h 后, 在 67 $^{\circ}\text{C}$ 加热 15 min 以灭活内切酶, 然后将酶切质粒点样于 0.7% 琼脂糖凝胶并在 TAE 电泳缓冲液中电泳, 电泳后将质粒大片段从琼脂糖凝胶中挖出, 利用 RESINcolumn™ System for DNA Purification from Agarose Gel 将该 DNA 片段纯化, 最后用 TE 缓冲液 (pH 8.0) 将 DNA 稀释到终浓度 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 待用.

1.3 DNA 插入片段和质粒 DNA 大片段的连接

由于 DNA 插入片段是一个 DNA 片段的混合物, 因此在每个 15 μL 连接反应体系中, 加入 600 ng DNA 插入片段混合物 (其中 9 224 bp DNA 片段的质量为 260 ng) 和 200 ng pGEM-7Zf (+) 的 *Sph* I、*Eco* R I 双酶切大片段 (2 983 bp), 使质粒 DNA 大片段和 9 224 bp 的 DNA 插入片段的摩尔数比为 3:1. 同时建立 3 个连接反应, 分别在下列温度条件下进行连接反应, 即: (1) 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应 16 h, (2) 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应 16 h, (3) 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 再反应 16 h. 随后将反应管在 67 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 以灭活 T_4 DNA 连接酶, 连接产物保存到 4 $^{\circ}\text{C}$ 待用. 该实验的阴性对照反应中只加入质粒大片段而不加 DNA 插入片段.

1.4 重组质粒的转化

根据 Cohen 等^[2]的方法, 用氯化钙制备大肠杆菌 (JM109) 感受态细胞, 每次用 0.6 μL DNA 连接产物进行质粒的转化, 然后将 100 μL 转化产物铺平板进行受体菌的培养.

1.5 重组菌的筛选和鉴定

将转化菌斑培养到直径达 2 mm 后, 用 Onetube™ Recombinant Plasmid Screening System 鉴定转化菌质粒的大小. 然后将含有重组质粒的菌斑重划平板, 分别挑取一个单菌落接种到 100 mL LB 液体培养基中进行过夜培养, 用 RESINcolumn™ Mini-scale Plasmid DNA Purification System 提取培养菌体的质粒, 并用 *Sph* I 和 *Eco* R I 对纯化质粒进行双酶切消化以鉴定 DNA 插入片段的大小. 由于 9 224 bp 的 DNA 插入片段含有 2 个 *Sty* I 位点^[3], 而 pGEM-7Zf (+) 质粒不含 *Sty* I 位点, 因此重组质粒用 *Sty* I 酶切后将产生一条长度为 1882 bp 的 DNA 小片段.

2 结 果

2.1 重组质粒的制备和转化

分别将在 3 个连接反应条件下制备的连接产物进行转化, 结果表明, 在 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 16 h 或在 4 $^{\circ}\text{C}$ 连接 16 h 后的重组质粒分别转化 JM109 受体菌, 没有菌斑形成, 而在 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 2 h 后、4 $^{\circ}\text{C}$ 再连接 16 h 后得到的重组质粒转化后形成 4 个菌斑.

2.2 重组菌的鉴定

当平板培养基上的菌落生长 48 h 后, 菌落的直径可达到 2 mm, 对 4 个菌落的质粒大

小进行快速鉴定, 4个菌落均含有同样大小的质粒. 将4个菌落分别进行过夜培养并进行质粒纯化和酶切鉴定, 发现4个菌落的重组质粒都具有相同的酶切特性(如图1): 即当重组质粒经 *Sph* I 和 *Eco* R I 双酶切后, 得到2条 DNA 片段, 最大的 DNA 片段为插入片段, 长度约为 9 kb; 而当重组质粒用 *Sty* I 酶切后, 产生的 DNA 小片段约为 1 900 bp, 从而说明 DNA 插入片段确实是 9224 bp 的 DNA 片段.

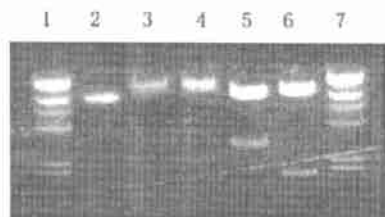


图1 重组质粒和其酶切产物的琼脂糖凝胶电泳

2 转化菌斑培养菌中的重组质粒

3 重组质粒的 *Sph* I 酶切产物

4 重组质粒的 *Eco* R I 酶切产物

5 重组质粒的 *Sph* I 和 *Eco* R I 双酶切产物

6 重组质粒的 *Sty* I 酶切产物

1, 7 Lambda DNA/*Hind* III markers

3 讨论

本文利用传统的质粒克隆方法, 用质粒载体 pGEM7Zf (+) 克隆了一个长达 9 224 bp 的 DNA 片段, 重组质粒大小达到 12 203 bp, 尽管 12 203 bp 大的 pGEM7Zf (+) 重组质粒转化后得到的转化率极低, 即在一次平板上仅有 4 个菌落, 但这 4 个菌落均是含有 12 203 bp 质粒的转化菌. 这就表明, 当质粒大小达到 12 kb 时, 转化效率急速下降, 这与质粒大于 15 kb 时, 转化效率将成为限制因素这一结论^[4]是相符合的, 因此, 要将 9 kb 的 DNA 片段插入到质粒载体中, 还要将 12 kb 的重组质粒转化成功, 必须在一方面尽可能的增加目的重组质粒的数量优势, 同时在另一方面, 必须尽可能的减少目的重组质粒在转化过程中所面临的来自其它环化质粒的竞争能力, 否则, 即便 DNA 片段能够和质粒片段连接, 高达 12 kb 的重组质粒也不可能转化成功. 本文选用 *Sph* I 和 *Eco* R I 来进行 DNA 片段的酶切, 可以达到上述要求, 原因是, 5' - *Sph* I - *Eco* R I - 3' 酶切片段的 *Sph* I 端带有 4 个碱基组成的 3' 突出端, 而其 *Eco* R I 端带有 4 个碱基组成的 5' 突出端, 因此, 质粒载体经 *Sph* I 和 *Eco* R I 酶切后, 质粒大片段不能自我环化, 从而减少阴性重组质粒的数量, 另外, *Sph* I - *Eco* R I DNA 片段也只能以正确的方向插入到质粒载体, 否则不能与质粒大片段连接. 这样一来, 就大大增加了获取目的重组菌的机率, 特别在质粒增大, 转化效率降低的情况下, 也能够确保克隆成功. 由此可见, 本文选择的双酶切位点, 保证了用质粒载体成功的克隆 9 224 bp 的 DNA 片段, 并且整个过程非常简单, 结果也非常可靠. 用同样的克隆方法, 只不过改变了 DNA 插入片段的酶切位点类型, 即插入 DNA 片段带有一个钝端和一个粘端, 这样一来, 质粒载体双酶切大片段也不能自我环化, DNA 插入片段同样也只能以正确的方向插入到质粒载体, 但实际情况是, 当含有一个钝端和一个突出端的 DNA 插入片段达到 7 kb 时, 重组质粒转化不成功(资料未公布), 原因可能是钝端连接比较困难. 如将 DNA 插入片段的两端均设计为钝端, 质粒载体的钝端用 CIAP 进行处理, 当 DNA 插入片段达到 6 kb 时, 转化菌落较少并且都是自我环化质粒的转化产物, 同时, 单独用 CIAP 处理的质粒载体进行连接和转化, 都将出现自我环化质粒的转化菌落(资料未公布), 从而也说明, CIAP 处理难以彻底避免质粒载体的自我环化, 如果用这种方法克隆 6 kb 的 DNA 插入片段, 即便 DNA 插入片段能够有效连接, 重组质粒的转化也会因为自我

环化质粒的竞争而难以成功。

另外需要说明的是, 如果用 12 kb 的纯化质粒进行 JM109 转化实验, 相对于 3 kb 的 pGEM-7Zf (+) 质粒载体, 转化效率将下降 80% ~ 90% (资料未公布)。这就表明, 尽管 12 kb 重组质粒对 JM109 的转化效率较低, 但还不能成为制备 12 kb 重组质粒的限制因素。因此, 高达 9224 bp 的 DNA 插入片段能否与质粒片段有效连接将是重组质粒转化能否成功的关键因素。由于本文的 DNA 插入片段本身是一个 DNA 片段的混合物, 所以选择了 3 种 DNA 连接温度条件, 结果只有在 16 °C 反应 2 h 后, 4 °C 再反应 16 h, 转化才获得成功, 原因是 16 °C 反应 2 h 是 *Eco*R I 酶切片段的最佳连接温度条件, 而 4 °C 反应 16 h 是 *Sph* I 酶切片段的最佳连接温度条件^[4]。之所以首先在 16 °C 而不是在 4 °C 进行连接反应, 原因是 DNA 插入片段混合物中含有较多的 *Sph* I 末端, 因此首先连接 *Eco*R I 末端, 而后是 *Sph* I 末端可以降低 *Sph* I 末端的竞争, 提高了目的 DNA 插入片段与质粒 DNA 片段的连接效率。因此, 本文选择的双温度条件连接大大提高了连接产物中重组质粒的数量, 从而使转化效率较低的 12 kb 重组质粒得以转化成功。

综上所述, 用质粒载体制备高达到 12 kb 的重组质粒并转化成功的两个关键分别是双酶切位点的选择和 DNA 连接温度条件的优化。即使酶切 DNA 片段在同一条 DNA 链的两端均带有突出端, 这对于较小的 DNA 片段克隆, 都不失为一个有效和最佳的选择, 因为不仅能够保证克隆的成功, 而且避免了阴性重组菌的形成, 从而也使重组菌的筛选或鉴定变得非常简单。另一方面, 当 DNA 插入片段较大时, 应尽可能的优化 DNA 连接温度条件, 以促进 DNA 插入片段的连接进而提高重组质粒的含量, 从而提高转化成功率。而对于质粒载体 pGEM-7Zf (+) 能否克隆更大的 DNA 片段, 即使重组质粒达到 14 ~ 15 kb 并转化成功, 是下一步将要进行的工作。

参考文献:

- [1] 金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [2] COHEN S N, CHANG A C Y, HSU L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli*. by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci*, 1972, 69: 2110.
- [3] Promega Biological Research Products Catalog (1993/1994). Table 2A. Restriction Enzyme: Promega's Acceptance Criteria. Promega Corporation, 3 ~ 4.
- [4] SANGER F, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage λ DNA. *Mol Biol*, 1986, 162: 729.

A Method to Construct 12 kb Plasmid Vector

ZHOU Xiao-qiang *

Abstract: A method is described for the construction of a 12 003 bp plasmid DNA by cloning a 9 224 bp DNA fragment into pGEM-7Zf (+) DNA vector. This 12 kb recombinant plasmid can be transformed easy into JM109 cells, on the other hand, the plasmid yield and the stability are very high during the successive culturing. This method is simple and reliable for the DNA cloning with plasmid DNA vector, especially for the larger DNA fragments. It ensures the success and saves the labour in colony screening and identification.

Keywords: plasmid DNA vector; cloning; 9 224 bp DNA insert

* Sino-American Biotechnology Company, Henan Province, Luoyang City 471003