

利用半补齐技术构建以质粒为载体的基因文库

洪 扬 雷 虹

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

提 要

在以质粒为载体的基因文库构建中, 引入末端半补齐技术, 可以显著提高文库转化子中重组子所占的比例(>70%), 从而可以大大减轻文库构建和筛选的工作量. 与常用的碱性磷酸酯酶法相比, 半补齐技术具有连接产物转化率高、能防止外源片段自身间发生连接反应等优点, 可望在以质粒为载体的基因文库构建中取代碱性磷酸酯酶法.

关键词 基因文库构建, 半补齐, 质粒载体

用于构建基因文库的载体有质粒、 λ -噬菌体、粘粒 (cosmid) 等. 质粒虽然包容大插入片段的能力较小, 但因其实验方法成熟, 操作简便, 在原核生物基因文库的构建中仍被广泛采用.

以质粒为载体构建基因文库, 最核心的问题是如何提高文库转化子中重组子的比例, 这个比例极大地影响着文库构建的成败以及对文库筛选的工作量. 一般说来, 按 shotgun 策略构建基因文库, 染色体 DNA 多用 *Sau3A I* 作部分降解, 回收特定大小范围的片段后, 同 *BamH I* 酶切的载体相连接后转化宿主菌. 由于单酶切片段与载体的连接效率在实际实验中只有 10% 左右 (理论值最高为 25%^[1]), 故一般都选择碱性磷酸酯酶对载体作末端脱磷酸化来提高外源片段的插入机率.

末端半补齐 (partial-filling) 原是为使某些不相容的酶切末端能彼此连接而设计的一项技术^[2], Zabarosky 首先将其应用于以噬菌体为载体的基因文库^[3]. 本文则介绍将末端半补齐技术进一步应用到以质粒为载体的基因文库构建中, 以取代常用的碱性磷酸酯酶法. 在作者构建地衣芽孢杆菌 2709 基因文库以及从中筛选 2709 碱性蛋白酶基因的工作中, 应用末端半补齐技术获得了非常好的效果.

1 材料与方法

1.1 材料 各种工具酶购自 New England Biolabs, Pharmacia, Boehringer Mannheim 以及 Promega 等公司. ATP 和 4 种 dNTP 购自 Pharmacia. 异丙基硫代 β -D 半乳糖苷 (IPTG), 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D 半乳糖苷 (X-gal) 购自 Sigma. pUC18 质粒为本实验室保存, 其它试剂均为分析纯产品. 大肠杆菌 DH5 α MCR 购自 BRL 公司. 地衣芽孢杆菌 2709 购自中国科技大学生物系.

1.2 地衣芽孢杆菌 2709 染色体 DNA 的制备 按 Marmur 方法^[4], 但有较大修改. 第一次乙醇沉淀的 DNA 纤维溶于 TE (10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0) 中, 经反复酚、氯仿抽提后再对大体积 TE 缓冲液透析至透析外液 A_{270} 接近于零, 透析后的 DNA 溶液保存于 4℃.

1.3 2709 染色体 DNA 的 *Sau3A I* 部分降解 参考 Sambrook 等^[1]. 经小量试验和放大试验后, 最终确定的反应条件为每 μ g DNA 中加 *Sau3A I* 0.23U, 37℃ 反应 3min. 通过 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分离、回收 2—9kb 之间的 DNA 片段. DNA 片段的回收采用透析袋

法^[1].

1.4 末端半补齐反应 参考 Sambrook 等^[1]. DNA 片段 0.5—3 μ g, 10 $\times$ Sau3A I 缓冲液 (1mol/L NaCl, 10m mol/L Tris-HCl, 100m mol/L MgCl₂, pH7.5) 5 μ l, 每种 dNTP (5m mol/L) 视需要各加 1 μ l, Klenow 大片段酶 (5U/ μ l) 2—4 μ l, 最后加入双蒸水至总体积为 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 30min, 酚-仿抽提后乙醇沉淀回收反应产物, 溶解于 TE 缓冲液中.

1.5 感受态细胞制备 采用 CaCl₂ 法^[1], 但略有修改. 取 -70 $^{\circ}$ C 深冻的 DH5 α MCR 菌种, 划单菌落于 LB 平板, 27 $^{\circ}$ C 培养约 20h, 接 1—3 个单菌落于 5ml LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 6—8h 至菌液接近于饱和. 按 1% 接种量 (500 μ l) 转接入 50ml LB 中, 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养 2h 后, 4 $^{\circ}$ C 3000g 离心 5min 收集菌体, 用冰冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 25ml 悬浮菌体, 冰上静置 30min 后再悬浮于 5ml 0.1 mol/L CaCl₂ 中, 保存于 0 $^{\circ}$ C 冰浴. 按此法制备的 DH5 α MCR 感受态细胞于 0 $^{\circ}$ C 冰浴中保存 24h 后, 转化率可上升 10 倍, 每 μ g pUC18 DNA 可达 10⁷—10⁸CFU (CFU: clone forming unit).

1.6 连接与转化 参考 Sambrook 等^[1].

连接反应在 16 $^{\circ}$ C 进行 4h 后于 4 $^{\circ}$ C 保存. 转化中注意严格控制转化的 DNA 量 (200 μ l 感受态细胞中 DNA 量小于 10ng, 体积小于 10 μ l), 以防止饱和现象的发生. Heatshock 时间为 90s.

其余 DNA 重组操作均参见文献 [1].

2 结果与讨论

采用末端半补齐技术的地衣芽孢杆菌 2709 基因文库构建流程参见图 1. 2709 染色体 DNA 的 Sau3A I 部分降解片段 2709-Sau3A I 并不直接与选定的 pUC18 载体连接, 而是由大片段酶用 dATP, dGTP 将 Sau3A I 末端 5' GATC3' 补上两个碱基, 但仍留有两个碱基的 5' 突出 (5'GA3'), 这一操作即称作末端半补齐^[1] (图 1), 此半补齐产物记作 '2709-Sau3A I +'. 文库载体 pUC18 则用 Sal I 酶切, 其产物 pUC18-Sal I 由大片段酶用 dCTP 和 dTTP 作末端半补齐, 半补齐后产物记作 'pUC18-Sal I +'. 通过末端半补齐操作, 不仅使得 Sau3A I 酶切末端同 Sal I 酶切末端得以相容, 更重要的是我们设想在基因文库中引入末端半补齐技术可有以下几个重要的优点:

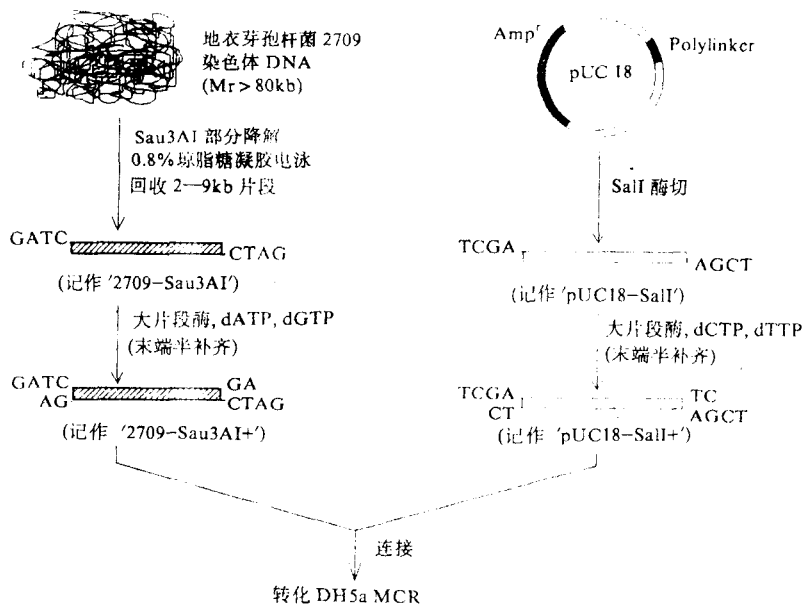


图 1 采用末端半补齐技术构建地衣芽孢杆菌 2709 基因文库

a. 彻底消除载体自环化的可能性. 载体酶切末端经适当碱基半补齐后, 其自身末端间已不能互补, 只有在相应的外源片段插入后, 才能形成环化的产物. 因此极大地提高了连接产物中重组质粒的比例 (可达 70%—80%^[2]), 使组成基因文库的总转化子数目大大减少, 减轻对文库进行筛选所需的工作量.

b. 经末端半补齐过的插入片段其自身末端也失去了彼此间退火连接的能力, 因而消除了插入片段自身相互连接后再插入到载体中的可能性, 这一点对从基因文库中获得真实的克隆基因是很重要的.

c. 同常用的碱性磷酸酯酶处理法相比, 采用半补齐技术处理的连接产物为完整的共价闭合质粒, 不像碱性磷酸酯酶法那样留有缺口, 因而半补齐法的连接产物其转化率不受影响. 同时, 半补齐法中阻止外源片段发生自身连接反

应的效果也是碱性磷酸酯酶法所不具备的. 而且从我们的实验看, 在技术操作上半补齐法并不比碱性磷酸酯酶法复杂, 甚至还更简单一些.

为验证末端半补齐技术的实际效果, 在地衣芽孢杆菌 2709 的基因文库构建过程中, 我们用 pUC18-Sal I + 与 pUC18 的 BamH I 酶切载体同时做了一组连接反应 (表 1), 其中反应①, ②和④, ⑤分别用以检验 pUC18-BamH I 和 pUC18-Sal I + 载体的自连接情况, ③和⑥则分别是 pUC18-BamH I 和 2709-Sau3A I, pUC18-Sal I + 和 2709-Sau3A I + 的连接反应, 用以对照检验末端半补齐技术的实际效果. 反应⑦用以检查回收的 2709-Sau3A I + 片段中是否有质粒污染. 连接反应在 16℃ 进行 4h 后, 转化 DH5 α MCR 感受态细胞, 其中③, ④, ⑤, ⑥的转化子涂于 X-gal 平板上, 结果见表 1.

表 1 pUC18 普通单酶切载体与半补齐载体的连接与转化实验

№	载体/ng	插入片段/ μ g	连接酶/ μ l	总转化子数	蓝色菌斑	白色菌斑
①	pUC18-BamH I : 5	无	0	~450	(未检验)	(未检验)
②	pUC18-BamH I : 5	无	0.5	$>3 \times 10^3$	(未检验)	(未检验)
③	pUC18-BamH I : 50	2709-Sau3A I : ~1.0	0.5	$\sim 6 \times 10^3$	$\sim 6 \times 10^3$	~300
④	pUC18-Sal I + : 5	无	0	114	114	0
⑤	pUC18-Sal I + : 5	无	0.5	116	112	4
⑥	pUC18-Sal I + : 50	2709-Sau3A I + : ~1.0	0.5	1 350	350	1 000
⑦	无	2709-Sau3A I + : ~1.3	0.5	0	(未检验)	(未检验)

注: pUC18-BamH I : BamH I 酶切的 pUC18 载体; ③和⑥中只取 1/50 的连接产物用于转化.

从表 1 的数据可以分析出, 在正常的 pUC18-BamH I 载体中, 载体的自环化现象非常显著, 这表现在连接产物②中的转化子数目远远大于连接产物①. 而连接产物④, ⑤则清楚地显示, 经末端半补齐后的 pUC18-Sal I + 载体, 其自环化现象已几乎被完全消除, 由于在 DNA 量相等的情况下, ④和⑤的转化子数目几乎相等, 可以认为这些转化子的出现仅仅是由于酶切反应不可能达到完全所致.

在同外源片段的连接上, 末端半补齐技术确实显示了极大的优越性: 在 pUC18-BamH I

同 2709-Sau3A I 的连接产物③中, 其转化子的在 X-gal 平板上的白斑/蓝斑比例仅有 5% 左右, 而 pUC18-Sal I + 同 2709-Sau3A I + 的连接产物⑥, 其转化子的白斑/蓝斑比例高达 300% (1 000/350), 二者的对比十分鲜明. 表 1 数据还表明, ⑥中连接产物的转化率按载体的量计算, 每 μ g pUC18-Sal I + 达到 10^6 CFU 以上, 仅比 pUC18 质粒的转化率 ($\sim 10^7$ CFU/ μ g) 低一个数量级, 这说明采用半补齐技术得到的连接产物由于是共价闭合的, 从而保持了较高的转化率.

从⑥的转化子中随机挑选 19 个白斑作重组质粒鉴定的结果表明(未发表数据),在这 19 个白斑中,除一个在鉴定过程中可能因被杂菌污染而未检测到质粒外,其余 18 个质粒均含有大小分布在约 2—7kb 之间的插入片段.由此推算,⑥的转化子中,至少 70%以上 [$75\% \times (18/19) > 70\%$] 为重组子,表明用半补齐技术构建的文库质量确实是非常令人满意的.最终构建 2 709 基因文库时,⑥中连接产物的 1/2 (另外的 1/2 暂存于 -20°C) 转化后共获得约 3×10^4 个转化子,按 70% 的比例推算,其中有约 2×10^4 个以上的重组子,远高于理论上建库所需的重组子数目 (约 5×10^3). 从 2709 基因文库中,已通过原位杂交手段成功地筛选到了所需的 2 709 碱性蛋白酶基因 (另文发表).

需要提及的是通过末端半补齐得到的连接产物,其连接处的酶切位点一般均被破坏,在本实验中 Sau3A I 位点虽保持完整,但 Sal I 位点已不存在.这一缺点对于构建基因文库并不构成特别的影响,因为采用 Sau3A I 同 BamH I 直接连接,其位点能被 BamH I 再切开的机率也只有 1/4. 如果在文库构建中采用 pUC18/19 或其它含有类似多克隆位点的质粒载体,在 Sal I 位点前后分别有 EcoR I, Sac I, Kpn I, BamH I, Pst I, Hind III 等多个常用酶切位点可以被后继的 DNA 重组操作所充分利

用,完全能够弥补半补齐技术的不足.

在构建文库的过程中,即使不使用 Sau3A I 切割染色体,但只要所用的内切酶具有两个以上碱基突出的 5' 末端,可考虑使用半补齐技术,具体的半补齐设计参考有关文献^[1,5].

在以质粒为载体的基因文库构建中,目前尚未见有采用末端半补齐技术的报导.而我们通过实验认为,在此类基因文库构建中,末端半补齐技术完全可以取代目前广泛使用的碱性磷酸酯酶处理法.

致谢: 承蒙韩玉珉副研究员审阅, 特此致谢.

参 考 文 献

- 1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*. second edition, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 2 Hung M-C and Wensink P C. Different restriction enzyme-generated sticky DNA ends can be joined *in vitro*. *Nucleic Acid Res*, 1984; **12**: 1863
- 3 Zabarosky E R, Allikmets R. An improved technique for the efficient construction of gene libraries by partial filling-in of cohesive ends. *Gene*, 1986; **42**: 119
- 4 Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol*, 1961; **3**: 208
- 5 Korch C. Cross index for improving cloning selectivity by partially filling in 5'-extensions of DNA produced by type II restriction endonucleases. *Nucleic Acid Res*, 1987; **15**: 3199

《高效液相色谱法纯化蛋白质理论与技术》征订

本书以高效液相色谱法为主详细地介绍了分离纯化蛋白质时的理论与技术,包括分离机理、填料合成、影响分离因素、最佳化条件选择以及应用例子.应用例子侧重于基因重组蛋白质的纯化,如 α -干扰素、 γ -干扰素、白细胞介素-2 等.书中对纯化蛋白质时常用的方法如盐析、细胞破碎、离心、电泳、经典柱色谱以及蛋白质定量与纯度测定等也作了简单地介绍,同时对近年新兴的一些纯化技术如结晶、双水相萃取、径向色谱、融合蛋白亲和层析都给予了一定的说明.书中也尽可

能多地收集了国内学者在这方面的研究成果.各章之后都附有大量的参考文献可供读者参考.

全书共十一章,140 余张图,35 万字,是个理论与实践相结合的书籍.可供从事分析化学、生物化学、生物制品学、免疫学以及从事与蛋白质纯化相关技术的研究人员和大学生参考.

全书订价 15.50 元,5 本以上按八折优惠,免费邮寄.需要者请与西安第四军医大学唐都医院科技开发部郭立安联系,邮编 710038,款到邮书.