

利用同序异尾限制性内切酶快速克隆多基因片段的新方法

杜广营 朱乃硕*

(复旦大学生命科学学院病毒与分子免疫实验室, 复旦金鹰生物医药研发中心, 上海 200433)

摘要 介绍一种可以快速进行多基因片段克隆的新方法——同序异尾限制性内切酶 (isoschizomer-heterotail restriction endonuclease, IHRE) 一步克隆法, 该方法可以一步完成多达 6 个 DNA 片段的连接, 具有简单快速、节省试剂、成功率高、不引入非目的基因序列等很多优点. 应用该方法已经成功完成对人肠激酶轻链多基因克隆、HSV 多表位 DNA 疫苗的构建等.

关键词 分子生物学, 同序异尾限制性内切酶 (IHRE), 克隆, 多片段基因

学科分类号 Q781

分子生物学实验中, 经常会遇到需要把多个基因片段连在一起的情况, 比如构建多效价复合疫苗、真核基因多个外显子的拼接等. 一种常规的方法是在各片段两端设计不同的限制性内切酶识别位点, PCR 扩增出片段, 为了保证粘性末端的正确性, 分别用不同的内切酶剪切, 回收酶切的 DNA 片段, 两两连接后再次 PCR 扩增, 再酶切再连接. 这种常规方法有很多缺点: a. 操作繁琐, 耗用很多时间和试剂; b. 其中任何一步出现问题都会使最终的实验失败, 成功率较低, 并且由于中间操作环节太多, 查找失败原因的难度也很大; c. 这种方法经常会引入酶切识别序列或粘性接头等非目的基因序列, 影响后续实验研究. 我们在实验过程中建立了一种可以快速进行多基因片段克隆的方法——同序异尾限制性内切酶 (isoschizomer-heterotail restriction endonuclease, IHRE) 一步克隆法, 只利用一个限制性内切酶即可对多个 DNA 片段实现一步连接, 具有快速、省酶、成功率高、不引入非目的基因序列等很多优点. 此方法与 Gene SOEing 方法^[1]作用相似, 可对多个基因序列进行正确拼接和克隆.

本实验方法建立的基础是有些限制性内切酶的识别序列和剪切位点的不一致性. 这类酶属于 II 型限制性内切酶, 有时又被称为 II S 型酶, 它们的特点是在识别位点之外的固定位置切开 DNA. 这些酶大小约为 400~650 个氨基酸, 它们识别连续的非

对称序列, 有一个结合识别位点的结构域和一个专门切割 DNA 的功能域. 一般认为, 这些酶主要以单体形式结合到 DNA 上, 但与邻近的酶结合成二聚体, 协同切开 DNA 链. 为方便, 我们暂时将这类限制性内切酶命名为同序异尾限制性内切酶 (IHRE), 即识别序列相同、切出的粘性末端不同. 以 *Bbs* I 酶为例, 其剪切位点在识别序列之外的下游 N2~N6 位 (图 1), 且对剪切位置的碱基无限制, 故可根据所扩增基因特异性要求选择相应的序列合成引物, 多个扩增片段所用的引物都加有同一种限制性内切酶 (如 *Bbs* I) 识别序列, 经酶切后形成的粘性末端各不相同, 每两个片段首尾相接处的粘性末端是互补的, 而与其另一端或其他片段的粘性末端是非互补的, 这样多个片段经酶切后可以首尾依次相连, 不仅保持了酶切条件的同一性 (所有片段可在一个条件下同时酶切), 而且保证了连接的特异性. 更为有利的是经过拼接后的片段内不含有该酶识别序列或残留碱基, 能保证目的基因序列的正确性.

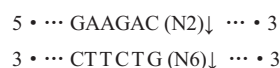


Fig. 1 Recognition Sequence of *Bbs* I

* 通讯联系人.

Tel: 021-65642813, Fax: 021-65641215, E-mail: nzhu@fudan.edu.cn

收稿日期: 2005-12-26, 接受日期: 2006-02-16

本方法中用的限制性内切酶剪切出的粘性末端有 4 个碱基, 这 4 个碱基可以根据需要任意选择(只要不会引入新的不想要的酶切识别序列即可). 这样待连接的两个片段的前一片段后 4 个碱基和后一个片段前 4 个碱基, 加起来有 8 个碱基可以用来设计粘性末端. 所以一般情况下都可以设计出满足要求的引物.

我们实验室已经成功地应用同序异尾限制性内切酶一步克隆法构建了多个多片段克隆载体, 下面以人肠激酶轻链基因 EK_L (EK light chain, EK_L) 克隆为例介绍该方法.

肠激酶 (enterokinase, EK , EC3.4.21.9) 是哺乳动物消化系统中最基础的丝氨酸蛋白水解酶之一. 该酶能高度特异性识别序列 $Asp-Asp-Asp-Asp-Lys(DDDDK)$, 将 Lys 羧基参与的肽键酶解开, 并且能够在广谱 pH (4.5~9.5) 和温度 (4~45°C) 范围内特异性地水解底物^[2], 融合蛋白经 EK 酶解获得的目标蛋白或多肽具有和野生型完全一致的氨基酸序列, 因此 EK 目前广泛应用于切割融合蛋白中载体蛋白 (或标签序列) 和目标蛋白之间的肽键. 但目前市售的 EK 价格极其昂贵, 特别是从十二指肠组织中纯化的 EK , 常含有其他蛋白水解酶的污染, 从而限制了其广泛应用. 我们通过基因工程手段来生产具有催化活性的人肠激酶轻链, 其基因由 5 个外显子组成.

1 材料和方法

1.1 菌种、质粒和主要试剂

大肠杆菌菌株 DH5 α , 温度诱导型原核表达载体 pBV220 均为本实验室保存; 小量柱离心式质粒抽提纯化试剂盒、胶回收试剂盒和 Taq plus 聚合酶购自上海申能博彩生物公司; T4 连接酶购自 New England BioLabs; $BamH$ I、 $EcoR$ I 购自 Takara 公司; DNA Makers: 100 bp Ladder Marker 购自北京鼎国生物技术发展中心; λ -EcoT14 I digest 购自 Takara 公司.

1.2 引物

本实验中用到的所有引物由上海生工生物工程有限公司合成. 扩增 Exon1 的引物: $E1u$, 5' gCTgAATTCATgCACCACCACCACCACATT-
 $EcoR$ I 6 $\times$ His-tag
gTTggAggAAgTAATg 3'; $E1d$, 5' AgCTgAAgAC
(TA)CTCCATACACgCAGTgTgCgg 3'. 扩增 Exon2
的引物: $E2u$, 5' AgCTgAAgAC(TA)gAgAACTT-

AgAgCCATCC 3'; $E2d$, 5' AgCTgAAgAC(CC)CT
gTgTAATTCACCTTTAAATTC 3'. 扩增 Exon3 的引
物: $E3u$, 5' AgCTgAAgAC(CC)ACAgATTACATA-
CAACCTATTTg 3'; $E3d$, 5' AgCTgAAgAC(TA)
gTACCTTgATATACAACCGTCC 3'. 扩增 Exon4 的
引物: $E4u$, 5' AgCTgAAgAC(TA)gTACTACTgC-
AAACATATTg 3'; $E4d$, 5' AgCTgAAgAC(TA)
CTgACAAGaATCTATTCC 3'. 扩增 Exon5 的引物:
 $E5u$, 5' AAATgAAgAC(TA)TCAgggggATTCAgg-
AggAC 3'; $E5d$, 5' ggTggATCCTTATCA ATgTAg-
 $BamH$ I
AAAACCTTTgTATCCATTCCg 3'.

上述引物名称中, u 、 d 分别代表上、下游引物. 在引物 $E1u$ 和引物 $E5d$ 中分别引入 $EcoR$ I 和 $BamH$ I 酶切位点, 以使片段插入载体. 其他引物中的下划线部分为 Bbs I 酶的识别序列.

1.3 PCR 和分子克隆

按下面的实验流程, 所有操作严格按照试剂盒说明书或参照《分子克隆》进行:

PCR 分别扩增 5 个外显子片段 $\rightarrow$ 产物经 PCR 产物回收试剂盒回收 $\rightarrow$ 分别用 Bbs I 酶切 $\rightarrow$ 乙醇沉淀法回收各酶切产物 $\rightarrow$ 5 个片段的酶切产物于同一连接体系内 4°C 过夜连接 $\rightarrow$ 以连接液为模板、Exon1 的上游引物 $E1u$ 和 Exon5 的下游引物 $E5d$ 为引物进行 PCR 扩增 $\rightarrow$ 得到 750 bp 左右的肠激酶轻链基因 (含酶切位点及编码 6 $\times$ His 的序列) $\rightarrow$ $EcoR$ I、 $BamH$ I 双切 $\rightarrow$ 连到双切过的 pBV220 载体 $\rightarrow$ 进行转化 $\rightarrow$ 鉴定阳性克隆 $\rightarrow$ 测序.

2 结 果

2.1 PCR 扩增外显子

利用 PCR 方法扩增得到肠激酶轻链的 5 个外显子. Exon1~5 的大小分别为 176 bp、206 bp、120 bp、166 bp、180 bp (含两端酶切位点和保护碱基), PCR 产物经 1.8% 琼脂糖凝胶电泳的结果见图 2.

2.2 EK_L 外显子拼接基因的获得

将 PCR 产物分别用 Bbs I 酶切, 回收酶切产物并一起混合进行连接. 以此连接液为模板 Exon1 的上游引物 $E1u$ 和 Exon5 的下游引物 $E5d$ 为引物进行 PCR 扩增, 成功扩增到大约 750 bp 的片段和一些非特异扩增产物. 将 750 bp 大小的片段回收并用 $EcoR$ I 和 $BamH$ I 双切, 克隆到 pBV220 载体, 命名为 pBV- EK_L .

分别用 PCR 的方法和 *EcoR* I、*Bam*H I 双酶切的方法验证 pBV-EK_L 转化子(图 3)。挑选经过验证正确的克隆进行双向测序, 测序结果表明, 序列完全正确, 没有突变或错连产生。

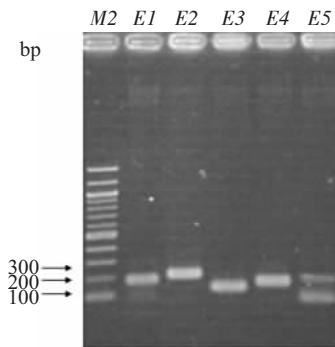


Fig. 2 PCR products of EK_L exons

M2: 100 bp ladder marker; E1: Exon1; E2: Exon2; E3: Exon3; E4: Exon4; E5: Exon5.

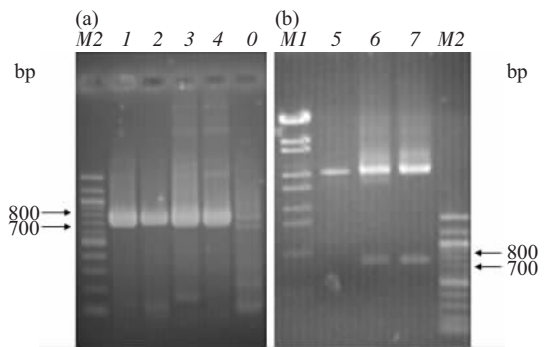


Fig. 3 Digestion (b) and PCR (a) analysis of pBV-EK_L recombinants

M1: λ -*Eco*T14 I digest marker; M2: 100 bp ladder marker; 1,2,3,4: PCR products of pBV-EK_L recombinant 1,2,3,4; 0: PCR of pBV220 vector; 5: Double digestion of pBV220; 6,7: Double digestion of pBV-EK_L recombinant 1,2.

3 讨 论

根据已知的人肠激酶轻链各外显子序列, 用同序异尾限制性内切酶一步克隆法设计各引物序列见图 4, 为作图方便, 图中各引物的序列没有全部列

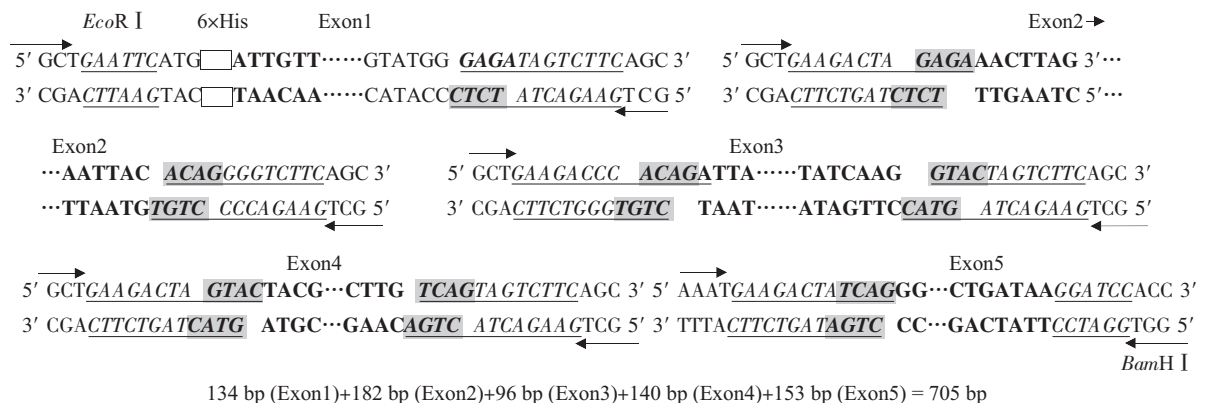


Fig. 4 All the adhesive ends of EK_L 5 exons

→: The direction of primers; GAAGAC: *Bbs* I recognition sequence; : Adhesive ends of different exons. All the exons were obtained by PCR method and could be ligated through different adhesive ends after being cleaved by *Bbs* I.

出, 只列出接头处及邻近序列, 序列两端箭头方向为引物方向。外显子接头处, 都在引物 5' 端设计同一个酶 (*Bbs* I) 的识别序列 GAAGAC, 然后在后面加任意两个碱基 (如在 Exon1 和 Exon2 的接头引物中我们用的是 TA), 后面跟外显子序列, 具体引物序列结构见图 5 (以 Exon2 的上游引物 E2u 为例, 方框内是酶切出的粘性末端)。

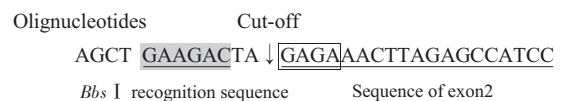


Fig. 5 Up primer of EK_L exon2

DNA Sequence may be cleaved at ↓ by *Bbs* I, emerging adhesive end GAGA.

各基因片段的 PCR 产物经 *Bbs* I 酶切可以切出 2 或 1 个具有 4 个碱基的粘性末端，以 Exon1 和 2 的连接为例，Exon1 经酶切后切出粘性末端 3'CTCT，CTCT 为 Exon1 的组成序列，同时在 Exon2 的上游引物中加入 GAGA，酶切后会生成粘性末端 3'AGAG，正好与 Exon1 被切出的粘性末端互补，可以相互连接. 而 Exon2 的另一个粘性末端是 3' TGTC，不能与 Exon1 的粘性末端 3' GACA 结合，只能与 Exon3 的上游粘性末端结合. 依次类推，5 个片段经酶切后可以按顺序首尾连接. Exon1 最后 4 个碱基 ACTA 和 Exon2 前 4 个碱基 GAGA，加起来有 8 个碱基 (ACTAGAGA) 可以用来设计接头. 取其中任意连续 4 个碱基可以作为接头，比如 Exon1 和 Exon2 的接头序列可以设计成 ACTA、GAGA (本实验中用)、CTAG、TAGA、AGAG. 但是要保证各片段之间的粘性末端相互不一样，否则后面的连接会出现错连. 按这个方法设计的所有接头见图 4 (序列中空格为酶切切开处，阴影部分是切出的粘性末端).

从 PCR 扩增外显子开始，用了不到一个星期的时间就得到含有目的基因的阳性克隆，经测序证实序列完全正确. 本实验室还成功应用该方法构建了针对单纯疱疹病毒 -2 (HSV-2) 的多效价复合 DNA 疫苗. 在前面方法的基础上可以对该方法做进一步的改进，把目的基因连到载体上的两个克隆位点也换成同一个酶的酶切识别序列，使切出的粘性末端正好与载体经相关酶切出的粘性末端互补结合. 这样在待连接片段较少的情况下(如 2~3 个)，PCR 产物只经过 IHRE 酶切并回收后就可以直接与载体(相关酶酶切后)一起连接并进行转化. 该方法具有另外两个优点：目的片段经过一次酶切可以直接和载体连接；可以避免目的片段上含有载体上要克隆的位点而不能用该克隆位点. 上面这些成功的例子说明，该方法具有通用性，可用于很多的多片段基因拼接和克隆.

同序异尾限制性内切酶一步克隆法克服了常规方法的很多缺点，如操作繁琐、耗用很多时间和试剂、成功率较低、会引入非目的基因序列等等. 同序异尾限制性内切酶一步克隆法主要有以下优点：
a. 方便快捷，节省时间，一个实验克隆方案构思好之后可以很快得到阳性克隆；
b. 节省试剂和科研经费，常规方法中要用到多个限制性内切酶进行多次酶切、回收和连接才能完成，本方法中只用一个限

制性内切酶经过一次酶切、回收就可以进行连接转化；
c. 不会引入酶切识别序列或粘性接头等非目的基因序列，可以得到完整的目的基因，因而不会影响后续实验研究.

除了上面的 *Bbs* I、*Eco*31 I 外，还有很多其他的限制性内切酶可以在同序异尾限制性内切酶一步克隆法中应用，见表 1 (New England Biolabs® Inc. Catalog & Technical Reference, 2005)，通过这些酶及改变中间的接头序列，绝大部分连接克隆都可以一步到位，这是一个十分巧妙的克隆方法设计，可为实验室节约许多宝贵的科研时间和科研经费.

Table 1 Isoschizomer-heterotail restriction endonuclease

Endonuclease	Recognition sequence
<i>Bbs</i> I *	5' ... G A A G A C (N) ₂ ↓ ... 3' 3' ... C T T C T G (N) ₆ ↓ ... 5'
<i>Eco</i> 31 I *	5' ... GGTCTC (N) ₁ ↓ ... 3' 3' ... CCAGAG (N) ₅ ↓ ... 5'
<i>Ear</i> I *	5' ... C T C T T C (N) ₁ ↓ ... 3' 3' ... G A G A A G (N) ₄ ↓ ... 5'
<i>Bfu</i> A I	5' ... A C C T G C (N) ₄ ↓ ... 3' 3' ... T G G A C G (N) ₈ ↓ ... 5'
<i>Bsp</i> M I	5' ... A C C T G C (N) ₄ ↓ ... 3' 3' ... T G G A C G (N) ₈ ↓ ... 5'
<i>Sap</i> I	5' ... G C T C T T C (N) ₁ ↓ ... 3' 3' ... C G A G A A G (N) ₄ ↓ ... 5'
<i>Bsm</i> A I	5' ... G T C T C (N) ₁ ↓ ... 3' 3' ... C A G A G (N) ₅ ↓ ... 5'
<i>Bsm</i> F I	5' ... G G G A C (N) ₁₀ ↓ ... 3' 3' ... C C C T G (N) ₁₄ ↓ ... 5'
<i>Sfa</i> N I	5' ... G C A T C (N) ₅ ↓ ... 3' 3' ... C G T A G (N) ₉ ↓ ... 5'
<i>Bsm</i> B I	5' ... C G T C T C (N) ₁ ↓ ... 3' 3' ... G C A G A G (N) ₅ ↓ ... 5'
<i>Fok</i> I	5' ... G G A T G (N) ₉ ↓ ... 3' 3' ... C C T A C (N) ₁₃ ↓ ... 5'
<i>Hga</i> I	5' ... G A C G C (N) ₅ ↓ ... 3' 3' ... C T G C G (N) ₁₀ ↓ ... 5'
<i>Bbv</i> I	5' ... G C A G C (N) ₈ ↓ ... 3' 3' ... C G T C G (N) ₁₂ ↓ ... 5'

*Have been used in our laboratory.

参 考 文 献

- 1 Horton R M, Cai Z L, Ho S N, *et al.* Gene splicing by overlap extension: Tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques*, 1990, **8** (5): 528~535
- 2 Collinsracie L A, Mccolgan J M, Grant K L, *et al.* Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA. *Biotechnology*, 1995, **13** (9): 982~987

A Novel Method for Quickly Cloning Genes With Multiple DNA Fragments Using Isoschizomer-heterotail Restriction Endonuclease (IHRE)

DU Guang-Ying, ZHU Nai-Shuo*

(Laboratory of Molecular Immunology & Virology, School of Life Sciences, Fudan University,
Fudan Jinying Biomedical Research Centre, Shanghai 200433, China)

Abstract A novel method for quickly cloning genes with multiple DNA fragments—one step cloning technique using isoschizomer-heterotail restriction endonuclease (IHRE) is described. Up to six DNA segments are ligated by using only one restriction endonuclease in this method. Comparing with routine method, it is simple, fast, economical and generates products with higher purity and achievement. Light chain of human enterokinase, DNA multi-epitope vaccine to HSV2 have been designed and successfully constructed *via* this method.

Key words molecular biology, isoschizomer-heterotail restriction endonuclease (IHRE), cloning, gene with multiple DNA fragments

*Corresponding author . Tel: 86-21-65642813, Fax: 86-21-65641215, E-mail: nzhu@fudan.edu.cn

Received: December 26, 2005 Accepted: February 16, 2006