

使用与 Gateway 技术兼容的 T 载体获得入门克隆*

陈其军^{1,2)} 安 瑞¹⁾ 周海梦²⁾ 陈 珈¹⁾ 王学臣¹⁾**

(¹⁾ 中国农业大学生物学院, 植物生理学与生物化学国家重点实验室, 北京 100094;

²⁾ 清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘要 与 Gateway 技术兼容的农杆菌双元载体系统已开始应用于植物功能基因组的研究, 但应用这些载体系统的一个瓶颈问题, 是如何简单、经济和高效地将 PCR 产物或其他来源的目的 DNA 片段构建到入门载体上获得入门克隆. 为此, 将传统的 TA 克隆技术与 Gateway 重组克隆技术进行整合, 构建了与 Gateway 技术兼容的两种 TA 克隆载体, 用于在克隆 PCR 产物或其他来源的目的 DNA 片段的同时获得入门克隆. 利用兼容 Gateway 技术的 TA 克隆载体有效地解决了上述瓶颈问题.

关键词 Gateway 克隆技术, TA 克隆技术, 入门载体, T 载体, 入门克隆

学科分类号 Q78

λ 噬菌体依靠一套位点特异性重组系统整合到细菌染色体中, 并完成溶菌周期和溶源周期之间的转换^[1,2]. Invitrogen 公司根据 λ 噬菌体的这种位点特异性重组系统, 开发了一套用于 DNA 体外重组的技术, 称为 Gateway 克隆技术. Gateway 技术是一种通用性的克隆方法, 利用该技术可以快速和高效地将目的 DNA 序列同时构建到多种与 Gateway 技术兼容的载体系统, 用于功能分析和蛋白质表达^[3]. 其基本过程可以表示为: $attL \times attR \rightarrow attB + attP$. 为了利用 Gateway 克隆技术, 首先需要将目的 DNA 序列按正确的方向和合适的读码框克隆到入门载体 (entry vector) 的两个 attL 重组位点之间, 获得入门克隆 (entry clone). 入门克隆与含有两个 attR 位点的目的载体 (destination vector) 在 LR Clonase enzyme mix 的作用下进行位点特异性重组, 使得目的 DNA 序列按确定的方向和读码框整合到目的载体上, 获得目的克隆 (destination clone). 目的克隆可用于下一步的功能分析及蛋白质表达. LR Clonase enzyme mix 由整合酶 (integrase, Int), 宿主整合因子 (integration host factor, IHF) 和切除酶 (excisionase, Xis) 组成^[3]. 与传统的克隆方法相比, Gateway 克隆技术的优点是: 可以不必考虑目的 DNA 是否有合适的酶切位点, 也不必进行繁琐而费时费力的酶切和连接反应, 一旦获得入门克隆, 就可以按确定的方向和读码框快速而准确地将目的 DNA 克隆到各种与 Gateway 技术兼容的目的载体上.

Invitrogen 公司开发了系列目的载体, 包括适用于原核、酵母、昆虫和哺乳动物等不同宿主的表达载体, 大大提高了 Gateway 技术的适用性和兼容性. 此外, Invitrogen 公司还提供 Gateway 载体转换系统 (Gateway vector conversion system), 可以很方便地将现有的载体系统改建为与 Gateway 技术兼容的目的载体. Karimi 等^[4] 以及 Curtis 和 Grossniklaus^[5] 利用 Gateway 载体转换系统分别构建了一套与 Gateway 兼容的植物双元表达载体. 这些与 Gateway 兼容的农杆菌双元载体系统为高通量分析植物基因的功能提供了有力的工具. 我们已经获得 Curtis 和 Grossniklaus^[5] 赠送的全套共 20 种植物表达载体.

为了利用上述与 Gateway 兼容的农杆菌双元载体系统, 首先需要将目的 DNA 构建到入门载体上获得入门克隆. 但如何简单、经济而高效地获得入门克隆是应用这些载体系统的一个瓶颈问题. 为此我们构建了与 Gateway 技术兼容的 TA 克隆载体 (入门载体). 所谓 TA 克隆, 就是将 3' 端具有单个 A 突出末端的 PCR 产物克隆到 3' 端具有单个 T 突出末端的线性化的载体, 即 TA 克隆载体或 T 载体. TA 克隆的理论依据是: 在 PCR 扩增过程中,

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G1999011700) 和国家自然科学基金资助项目 (30300025).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62892706, E-mail: xcwang@cau.edu.cn

收稿日期: 2004-05-13, 接受日期: 2004-07-30

由于 Taq 聚合酶具有不依赖于模板的末端转移酶活性,而在 PCR 产物的 3'末端添加单个脱氧核苷酸,并且偏好添加 4 种脱氧核苷酸中的脱氧腺苷酸(A)^[6]. T 载体的制备方法有 3 种. 第一种方法是利用产生平末端的内切酶切割环状质粒,然后利用末端转移酶将单个双脱氧胸腺核苷酸(ddTTP)添加到平末端线状载体的 3'端^[7]. 第二种方法是利用 Taq 酶将单个脱氧胸腺核苷酸(dTTP)添加到平末端线状载体的 3'端^[8]. 第三种方法是在质粒载体的多克隆位点中引入特定的序列,用相应的内切酶酶切产生 3'端具有单个 T 突出的线性 T 载体^[9,10]. 与前两种方法相比,第三种方法更快捷、更高效、更稳定,特别适合研究人员自己制备 T 载体. 在本研究中,我们通过在质粒载体的两个 attL 位点之间引入两个 *Ahd I* 酶切位点,分别构建了具有 Kan 抗性的 pGWKAN01 载体和具有 Amp 抗性的 pGWAMP01 载体. 利用 *Ahd I* 单酶切即可制备与 Gateway 兼容的 T 载体: pGWKAN01-T 和 pGWAMP01-T. 制备的 T 载体可用于克隆 PCR 产物等,进而获得入门克隆.

1 材料与方法

1.1 *Ahd I* 盒的构建

以含 *EGFP* 基因的 pEZT-NL 质粒(中国农业大学巩志忠教授提供)为模板,用 Pfu 聚合酶进行 PCR 扩增. 经琼脂糖凝胶电泳后切胶回收 PCR 扩增产物,以 *Xba I* 单酶切后回收纯化. 引物序列如下: *AhdF* 为 5' GACTTTAGGTC GATGGTGAGCA-AGGGCGAGGAGC 3', *AhdR* 为 5' ACC TCTAGA GACTTTAGGTC TTACTTGTACAGCTCGTC 3'.

其中阴影中的序列为 *Ahd I* 酶切位点,框中的序列为 *Xba I* 酶切位点,其他序列为 *EGFP* 基因序列. *Ahd I* 盒中的 *EGFP* 序列是作为间隔 DNA (Spacer DNA) 而引入的. 目的是为了通过琼脂糖凝胶电泳将完全酶切的质粒与部分酶切的质粒分开,避免由于部分酶切的质粒重新连接而造成非重组转化子背景过高^[11].

1.2 pGWKAN01 及 pGWKAN01-T 的构建

将 pENTR1A (购自 Invitrogen 公司) 质粒用 *Dra I* 和 *Xba I* 双酶切,经琼脂糖凝胶电泳后切胶回收大片段,与上述经酶切的 PCR 产物建立连接反应体系,随后转化大肠杆菌(DH10B). 阳性质粒用 *Ahd I* 进行酶切鉴定,并经琼脂糖凝胶电泳后切胶回收大片段. 切胶回收的大片段即为线性化的 T 载体.

1.3 Amp 抗性基因中的 *Ahd I* 酶切位点

在 PCR 引物中引入突变的碱基,以 pBluescript - II SK (+) 载体为模板,用 Pfu DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收 PCR 扩增产物,建立连接反应体系,使 PCR 扩增产物(线性载体)环化. 转化大肠杆菌(DH10B)后,随机挑取 6 个克隆,逐一测序,直至获得 *Ahd I* 酶切位点被破坏的载体,命名为 pSKΔ*Ahd*. 引物序列如下: AmpF 为 5' CTACGATACGGGAGGGCTT-ACCATCTGG 3', AmpR 为 5' TTATCTACAC-CACGGGGAGTCAGGCAAC 3', Amp18 为 5' AAT-AGACTGGATGGAGGC 3'.

其中,加框的 C 为引入的突变位点(在原始序列中为 G),阴影部分为突变破坏后的 *Ahd I* 酶切位点. Amp18 为测序引物.

1.4 pGWAMP01 及 pGWAMP01-T 的构建

以 pSKΔ*Ahd* 为模板,用 Pfu DNA 聚合酶及以下引物扩增 Amp 抗性基因及 pUC origin 序列. PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后切胶回收,以 *Nco I* 和 *Nhe I* 双酶切后回收纯化. 以 *Nhe I* 和 *BspH I* 双酶切 pGWKAN01,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收纯化小片段. 利用连接酶将两个片段连接,转化大肠杆菌(DH10B)筛选 Amp 抗性的阳性克隆. 阳性质粒用 *Ahd I* 进行酶切鉴定,并经琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收大片段. 切胶回收的大片段即为线性化的 T 载体. 引物序列如下: AmporiF 为 5' AAC CCATGG AGGTGGCACTTTT-CGGGGAAATGTGCG 3', AmporiR 为 5' AAC GCTAGC TCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCG 3'.

其框中的序列分别为引入的 *Nco I* 和 *Nhe I* 酶切位点.

1.5 TA 克隆分析

分别以构建于 T 载体上的 *DREB1A* 和 *AtNCED3* 基因为模板,使用 Taq 聚合酶扩增 680 bp 和 1 800 bp 的 DNA 片段,经琼脂糖凝胶电泳后切胶回收,与上述制备的 T 载体建立连接反应体系. 转化大肠杆菌后,随机挑取 30 个菌落进行菌落 PCR 鉴定,并计算阳性克隆所占的比例.

1.6 插入方向分析

在 attL2 重组位点的下游设计反向引物 RP1,利用 RP1 及插入片段的正向引物进行菌落 PCR 鉴定. 引物序列如下: RP1 为 5' GAGATTTT-GAGACACGGGCCAGAGC 3'.

2 结 果

质粒 pENTR1A 本身是一个入门载体, 其多克隆位点的两侧含有 attL 重组位点. 将 *Ahd* I 盒引入 pENTR1A 的多克隆位点, 构建成的载体命名为 pGWKAN01. 用 *Ahd* I 酶切 pGWKAN01 产生的线性载体即为 3' 端带有单个 T 突出末端的 T 载体

(pGWKAN01-T) (图 1a 和图 1b). 将 pGWKAN01 中的 Kan 抗性基因替换成 Amp 抗性基因构建成的载体命名为 pGWAMP01. 同样, 用 *Ahd* I 酶切 pGWAMP01 也可产生 T 载体 (pGWAMP01-T) (图 1a 和图 1c). 这两种 T 载体的 TA 克隆位点的两侧含有 attL 重组位点, 因此可以与 Gateway 技术兼容.

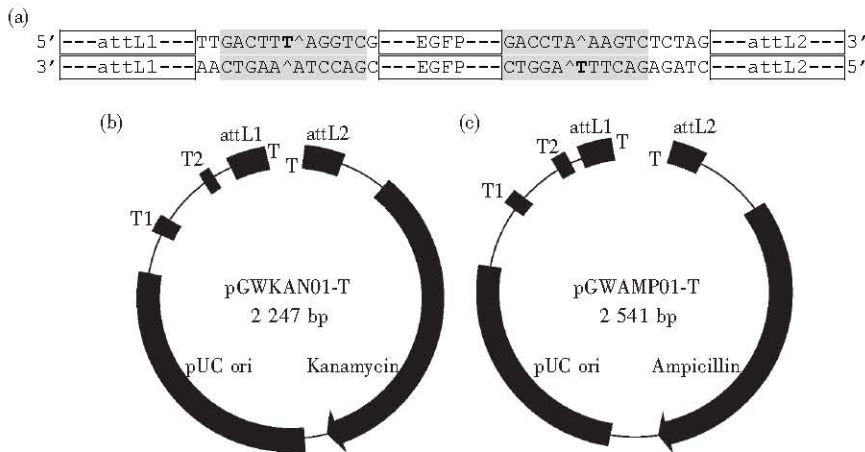


Fig. 1 The maps of the pGWKAN01-T and the pGWAMP01-T vectors

(a) *Ahd* I box in the pGWKAN01 and the pGWAMP01 vectors from which the pGWKAN01-T and the pGWAMP01-T are produced by digesting with *Ahd* I restriction enzyme. The shaded parts represent the *Ahd* I sites, the box in the middle represents the EGFP spacer DNA, the boxes on the both sides represent the sites of attL1 and attL2. (b) and (c) show the maps of the pGWKAN01-T and the pGWAMP01-T vectors, respectively. T1 and T2 represent the *rrnB* T1 and *rrnB* T2 transcription termination sequences, respectively.

为了检验 TA 克隆效率, 利用上述 T 载体分别克隆 680 bp 和 1 800 bp 的 PCR 产物, 对随机挑选的 30 个克隆进行菌斑 PCR 分析. 结果显示, 当分别利用 pGWKAN01-T 和 pGWAMP01-T 克隆 680 bp 的 PCR 产物时, 阳性克隆分别为 93% (28/30) 和 90% (27/30); 当克隆 1 800 bp 的 PCR 产物时, 阳性克隆分别为 80% (24/30) 和 83% (25/30). 这些结果表明, 我们自己制备的 T 载体具有较高的 TA 克隆效率.

尽管 PCR 扩增产物可以从正反两个方向插入 T 载体, 但利用位于插入片段上的引物和位于 T 载体上的引物进行菌落 PCR 鉴定, 可以很方便地确定 PCR 产物的插入方向. 利用位于 PCR 产物上的正向引物和位于 T 载体上的反向引物 RP1 进行菌落 PCR 扩增, 根据扩增结果分析插入方向, 结果表明, 正或反向插入的 PCR 产物各占 50% 左右. 如果 TA 克隆的效率以 80% 计算, 正向或反向插入的概率以 50% 计算, 则正向或反向克隆的效率为 40%, 相当于每 5 个克隆中平均有 2 个正向插入和

2 个反向插入的阳性克隆. 这个克隆效率完全可以满足常规克隆 PCR 产物的需要.

3 讨 论

基于位点特异性重组的 Gateway 技术得到越来越多的研究人员的青睐^[3]. 最近开发的两套与 Gateway 技术兼容的农杆菌双元载体系统, 必将大大促进 Gateway 技术在植物功能基因组研究上的应用^[4,5]. 为了有效利用这些与 Gateway 技术兼容的表达载体, 首先需要将目的 DNA 构建到入门载体上获得入门克隆. 为了解决这一瓶颈问题, 我们将传统的 TA 克隆技术与 Gateway 技术进行整合, 构建了与 Gateway 技术兼容的两种 TA 克隆载体. 这两种载体可以有效地克隆 PCR 产物, 获得入门克隆.

尽管可以利用商品化的试剂盒获得入门克隆, 但目前相关产品的市场售价要远远高出 TA 克隆载体. 并且, 这些产品并非总能适合各个领域的需要. 例如, Invitrogen 公司开发的 pENTR 定向 TOPO 克隆设计盒 (pENTR Directional TOPO

Cloning Kits), 虽然是定向克隆 PCR 产物进而获得入门克隆的最快捷方式, 但入门克隆都是 Kan 抗性的, 当 Kan 抗性的入门克隆与 Kan 抗性的目的载体 (例如上述植物表达载体) 进行重组反应时, 会大大增加非重组转化子造成的背景克隆. 利用我们构建的具有 Amp 抗性的 T 载体, 获得入门克隆则可克服这一缺点. 此外, pENTR 定向 TOPO 克隆设计盒并不适用于克隆其他来源的 DNA 片段, 例如从其他载体上酶切下来的 DNA 片段. 但此类目的 DNA 可以利用 T4 DNA 聚合酶等, 将粘末端修饰成平末端后再利用 Taq 聚合酶进行加尾, 然后克隆到 T 载体上获得入门克隆.

具有校正功能的 DNA 多聚酶 (例如 Pfu) 具有 3'→5' 核酸外切酶活性, 因此使用此类聚合酶扩增得到的 PCR 产物为平末端, 但此类 PCR 产物可以利用 Taq 酶进行简单的加尾反应后克隆到 T 载体上. 此外, 在多数情况下我们需要的是正向插入的克隆, 因此比起定向的 TOPO 克隆方式, T 载体的非定向克隆方式是一个缺点, 但这个缺点也不难克服, 因为利用 PCR 的方法可以很容易确定插入方向. 另一方面, 当我们的目标是同时获得正义和反义表达载体时, PCR 产物的非定向克隆方式反而会成为优点.

总之, 我们构建的 pGWKAN01 和 pGWAMP01 载体可用于简单、经济、高效地制备与 Gateway 技术兼容的 TA 克隆载体. 制备的 T 载体可用于克隆

PCR 产物或其他来源的目的 DNA, 进而获得入门克隆, 解决了应用 Gateway 克隆技术的一个瓶颈问题. 此外, 制备的 T 载体也可用于 PCR 产物的常规克隆.

参 考 文 献

- 1 Bushman W, Thompson J F, Vargas L, *et al.* Control of directionality in lambda site specific recombination. *Science*, 1985, **230** (4278): 906 ~ 911
- 2 Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Ann Rev Biochem*, 1989, **58**: 913 ~ 949
- 3 Hardley J L, Temple G F, Brash M A. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Research*, 2000, **10** (11): 1788 ~ 1795
- 4 Karimi M, Inze' D, Depicker A. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci*, 2002, **7** (5): 193 ~ 195
- 5 Curtis M D, Grossniklaus U. A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol*, 2003, **133** (2): 462 ~ 469
- 6 Clark J M. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed prokaryotic and eucaryotic DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, 1988, **16** (20): 9677 ~ 9686
- 7 Holton T A, Graham M W. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19** (5): 1156
- 8 Marchuk D, Drumm M, Saulino A, *et al.* Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19** (5): 1154
- 9 Kovalic D, Kwak J H, Weisblum B. General method for direct cloning of DNA fragments generated by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19** (16): 4560
- 10 Mead D A, Pey N K, Herrstadt C, *et al.* A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *Bio/Technology*, 1991, **9** (7): 657 ~ 663
- 11 Testori A, Sollitti P. Cloning unmodified PCR products using engineered *Xcm* I restriction sites in a portable cassette. *Methods Mol Biol*, 1997, **67** (1): 89 ~ 100

Making Entry Clones Using T Vectors Compatible With The Gateway Cloning*

CHEN Qi-Jun^{1,2)}, AN Rui¹⁾, ZHOU Hai-Meng²⁾, CHEN Jia¹⁾, WANG Xue-Chen¹⁾**

⁽¹⁾ State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

⁽²⁾ Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract A Gateway-compatible *Agrobacterium* sp. binary vector system for high-throughput functional analysis of genes in plants has been produced, but a bottleneck problem using this system for fast and reliable DNA cloning is how to obtain entry clones for the PCR products or other DNA fragments simply, economically and efficiently. To address this problem, the traditional TA cloning and the Gateway recombinant cloning techniques are integrated, and two kinds of TA cloning vectors compatible with the Gateway cloning are constructed. The vectors can be used for cloning PCR products or other DNA fragments and at the same time making entry clones in a simple, economical and efficient way.

Key words Gateway cloning, TA cloning, entry vectors, T vectors, entry clones

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research Program of China (G1999011700) and The National Natural Sciences Foundation of China (30300025).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62892706, E-mail: xcwang@cau.edu.cn

Received: May 13, 2004 Accepted: July 30, 2004