

- Methods in Enzymology, 1989, 172: 85~ 95
- 3 Ward J M, Sze H. Proton transport activity of the purified vacuolar H⁺-ATPase from oats. *Plant Physiol*, 1992, 99 (3): 925~ 931
 - 4 Chi Meng, Lu Hui, Rong Long. Inhibition of tonoplast ATPase from etiolated mung bean seedlings by 5'-isothiocyanate. *Biochem J*, 1992, 285 (3): 737~ 743
 - 5 Muler M L, Irkens-Kiesecker U, Rubinstein B, *et al.* On the mechanism of hyperacidification in Lemon. *J Biol Chem*, 1996, 271 (4): 1916~ 1924
 - 6 Ward J M, Reinders A, Sze H. Dissociation and reassembly of the vacuolar H⁺-ATPase complex from oats roots. *Plant Physiol*, 1992, 99 (1): 161~ 169
 - 7 Lowry O H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 226 (1): 193~ 265
 - 8 Michael G P. An H⁺-ATPase assay: proton pumping and ATPase activity determined simultaneously in the same sample. *Plant Physiol*, 1990, 94 (3): 882~ 886
 - 9 Good N E, Winget G D, Winter W, *et al.* Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*, 1966, 5 (2): 467~ 477

Fluorescence Measurement of Proton Pumping of Tonoplast H⁺-ATPase. WANG Huan, ZHU Xiong-Wei, WANG Yan-Zhi (*School of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China*).

Abstract Fluorescence quenching method was to measure the proton pumping activity of tonoplast H⁺-ATPase from higher plants. The sensitivity of two common fluorescent dyes was compared. Acridine orange is better than quinacrine with the initial slope and maximum quenching. The optimum for the fluorescence measurement of acridine orange dye were: 5 μmol/L acridine orange, 200 ~ 250 μg protein, Hepes-Tris or Hepes-BTP (pH 7.0). Initiating with ATP or Mg²⁺ was both valid.

Key words tonoplast membrane, H⁺-ATPase, pump activity, fluorescence quenching method

一种 PCR 产物克隆的新方法 —— T-A 克隆法

李新波 赵小松 田德志 朱依纯 姚 泰

(上海医科大学生理学教研室, 上海 200032)

摘要 介绍一种 PCR 产物克隆的新方法——T-A 克隆法。用改良碱裂解法抽提 pBluescript SK (+) 质粒, 用 *EcoR* V 将 pBluescript SK (+) 质粒切成平端, 利用 Taq DNA 聚合酶及 dTTP 制备 pBluescript SK (+) T-A 载体。将 β-actin cDNA 片段克隆入自制的 pBluescript SK (+) T-A 载体, 经 *EcoR* I 及 *Hind* III 双酶切得到与设定长度一致的 β-actin cDNA 片段。

关键词 T-A 克隆载体, PCR 产物, β-actin

学科分类号 Q782

对 PCR 产物进行克隆是分子生物学领域以及基因工程领域里常用的方法。以前对 PCR 产物进行克隆实验, 采用的方案有以下几种: 一是将 PCR 产物切成两端平齐的双链 DNA, 然后克隆到切成平端的质粒载体上, 或在 PCR 产物的两端加上人工接头 (linker), 经限制性内切酶处理后, 克隆到质粒载体的相应位点上; 二是在设计 PCR 引物时, 使 PCR 引物的 5' 端含有可切成粘性末端的限制性内切酶酶切位点的识别序列, 在 PCR 反应结束时, 将 PCR 产物再用相应的限制性内切酶进行处理, 以便于克隆到含相应限制性内切酶酶切位点的质粒载体上。这两种方法虽然有效, 但均较繁琐。

本实验的目的在于利用 pBluescript SK (+) 质粒、Taq DNA 聚合酶及 dTTP 自制 T-A 克隆载

体, 对从 RT-PCR 中得到的 β-actin cDNA 片段进行克隆。

1 材料与方 法

1.1 试剂

Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*EcoR* V、*EcoR* I、*Hind* III 等限制性内切酶及 X-gal、异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG)、PCR 扩增 β-actin 片段所用试剂等来自 Promega 公司, 质粒载体用 pBluescript SK (+), 来源于中国科学院细胞生物学研究所, 琼脂糖由 Sigma 公司进口分装, 柱离心式胶回收试剂盒来源于 Qiagen 公司, 扩增 β-actin

cDNA 片段长度为 870 bp.

1.2 DH5α 感受态大肠杆菌的制备

按 Cohen 提出的方法^[1], 用 0.1 mol/L CaCl₂ 制备感受态细菌.

1.3 自制 T-A 克隆载体的方法

将 20 ng pBS 质粒转化于自制的 DH5α 感受态菌, 用改良的碱裂法抽提 pBS 质粒. 取 5 μg pBS 质粒, 用限制性内切酶 *EcoR* V 切成平端后, 再用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切是否完全 (图 1), 用柱离心式回收试剂进行回收. 在 40 μl 反应体系中, 加入 1 μg 切成平端的 pBS 质粒, 2U Taq DNA 聚合酶, 10 × PCR 反应缓冲液 4 μl, 10 mmol/L dTTP 4 μl, 75 °C 水浴 2 h, 即成为 3' 端含单个胸腺嘧啶核苷酸 (T) 尾的开环 T-A 克隆载体.

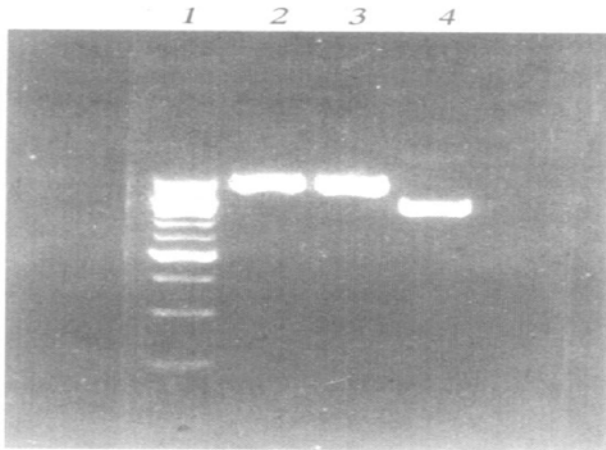


图 1 pBS 质粒用 *EcoR* V 酶切后的琼脂糖凝胶电泳结果
1: DNA 分子质量标准 X VI (250 bp ladder, 0.25 ~ 3.0 kb); 2, 3: 用 *EcoR* V 酶切的 pBS 质粒; 4: 没有酶切的 pBS 质粒.

1.4 β-actin cDNA 片段的 T-A 克隆

取自制的 T-A 克隆载体 20 ng, 按插入 DNA 片段与载体摩尔数之比 (3:1) 的比例, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 在 10~14 °C 连接 48 h, 然后转化于自制的 DH5α 感受态菌, 在含 X-gal/IPTG 的 LB 固体培养基上进行蓝白斑筛选并对抽提质粒后进行酶切鉴定.

2 结果和讨论

对 β-actin cDNA 片段, 从用 T-A 克隆载体进行克隆得到的蓝白斑中挑选 1 个蓝斑 6 个白斑, 进行质粒提取及酶切鉴定. 结果显示, 从 6 个白斑中提取的质粒用限制性内切酶酶切后得到了与设定长度

一致的 β-actin cDNA 片段 (图 2).

从含 X-gal/IPTG 的 LB 固体培养基上的蓝白斑筛选结果可以看到, 用自制 T-A 克隆载体进行克隆时, 蓝斑较少而白斑较多 (图 3), 且从 6 个白斑中提取的质粒用限制性内切酶酶切后都含有插入片段, 故对 β-actin cDNA 片段进行 T-A 克隆是一简便, 而效率高的方法.

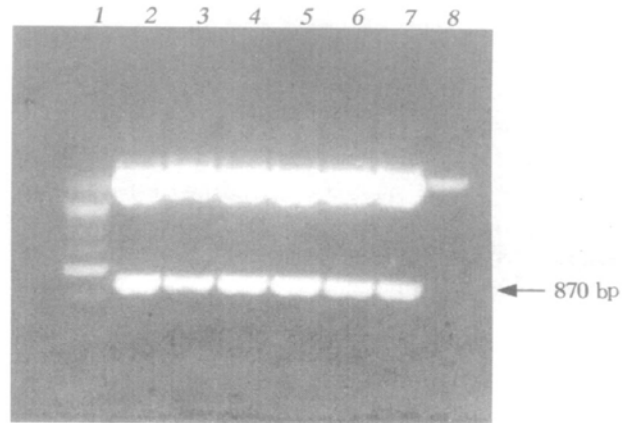


图 2 β-actin cDNA 片段克隆入载体后的酶切结果
1: DNA X VI (250 bp ladder, 0.25 ~ 3.0 kb); 2~7: 从自制的 T-A 克隆白斑中抽提的质粒用 *EcoR* I 及 *Hind* III 进行酶切后的结果; 8: 从克隆的蓝斑中抽提的质粒经 *EcoR* I 及 *Hind* III 酶切后的结果.

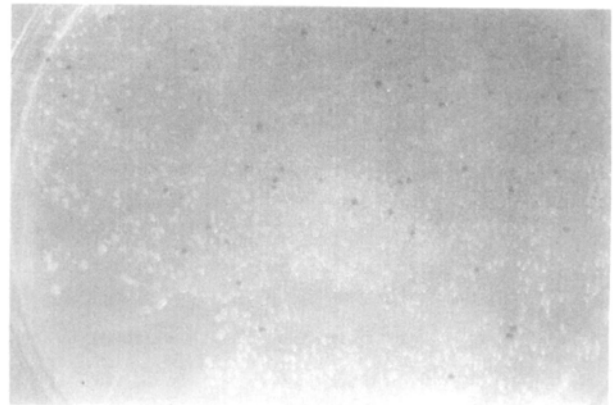


图 3 用 T-A 克隆得到的含 X-gal/IPTG 的 LB 固体培养基

T-A 克隆的原理是基于 Taq DNA 聚合酶具有非模板依赖性的活性, 可将 PCR 双链产物的每一条链的 3' 端加入单 A 核苷酸尾, 在 70~75 °C 时, Taq DNA 聚合酶的这种活性尤为显著, 而常规的 PCR 反应程序最后的步骤均为 72 °C 延伸 7~10 min, 故可满足 PCR 产物 3' 端为突出的单 A 核苷酸尾; 另一方面, 在仅有适量的 dTTP 存在的情况下, Taq DNA 聚合酶也可将切成平端的质粒的 3' 端加入单 T 核苷酸尾, 故用 Taq DNA 聚合酶也

造成了切成平端的 pBS 质粒 3' 端产生了突出的单 T 核苷酸。PCR 产物的 3' 末端单 A 核苷酸尾与切成平端的 pBS 质粒的 3' 末端突出的单 T 核苷酸实现了 T-A 互补, 称为 T-A 克隆, 它实际上是一种粘性末端连接, 因而具有较高的连接效率。

从一些生物工程公司 (如美国的 Invitrogen 公司或 Promega 公司) 可以购到已制备好的 T-A 克隆载体, 其制备原理与自制 T-A 克隆载体方法相似^[2,3], 但这类载体价格昂贵, 不利于广泛推广, 而且这种载体反复冻溶后连接效率也会降低; 另一方面 Invitrogen 公司等提供的这类载体量较少, 进行大量的 PCR 产物克隆需用大量的 T-A 克隆载体, 不能满足大量克隆的需要, 而我们自制的 T-A 克隆载体, 不但应用 pBS 质粒可行, 应用其他质粒也同样有效, 且操作简便, 可大量制备, 连接效率足以满足进行克隆操作的需要, 故值得推广应用。

另外, 我们也将 RT-PCR 扩增得到的含有 369 个 bp 的 β -LH cDNA 片段克隆入自制 T-A 载体, 经自动测序证实, 插入片段为 370 bp (PCR 产物 3' 端加入了一个 A), 序列全长与设计的 PCR 产物序列及大小完全一致。

在本实验中, 我们对用 RT-PCR 扩增的 β -actin cDNA 片段进行了 T-A 克隆, 对一般的 PCR 产物应用此方法也同样可行。

参 考 文 献

1 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著. 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, 49~ 56 (Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)

- 2 Andres D A, Seabra M C, Brown M S, *et al.* cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell*, 1993, **73** (6): 1091~1099
- 3 Bates M D, Olsen C L, Backer B N, *et al.* Elevation of cAMP is required for down regulation, but not agonist-induced desensitization, of endogenous dopamine D1 receptors in opossum kidney cells. *J Biol Chem*, 1993, **268** (20): 14757~ 14763

A New Method for PCR Products Cloning——T-A Clone Technique. LI Xir-Bo, ZHAO Xiao-Song, TIAN De-Zhi, ZHU Yi-Chun, YAO Tai (*Department of Physiology, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China*).

Abstract A new method for PCR products cloning——T-A cloning technique is introduced. pBluescript SK (+) plasmid was extracted by modified alkali lysis method. A blunt ends was generated using restriction enzyme *EcoR* V, then T-A cloning vector was prepared in the presence of Taq DNA polymerase and dTTP. β -actin cDNA fragment was cloned into the above T-A cloning vector. After the recombinant plasmids were digested by *EcoR* I and *Hind* III, an expected size of β -actin cDNA fragment was obtained.

Key words T-A cloning vector, PCR products, β -actin