

利用高保真酶扩增特性调整基因读码框的方法

张国广 陈亮 吴亦亮 曾雅明

(厦门大学生命科学学院 细胞生物学和肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要: 在基因工程研究中,经常要涉及到对目的基因读码框进行调整的研究。本文报道了利用高保真 DNA 聚合酶扩增 DNA 后产生平末端的特性,及限制性内切酶对一重组的原核表达载体 pET28a-HA 进行读码框调整的研究,测序结果显示读码框按照预期设计正确调整,表明高保真 DNA 聚合酶可以用于 DNA 3' 凹陷端的补平,在 DNA 3' 凹陷端平滑化时多了一个有效的选择。

关键词: 高保真 DNA 聚合酶 DNA 粘端补平 基因读码框调整

A Convenient Method for Condon Adjustment by Using High-fidelity DNA Polymerase Amplification Property

Zhang Guoguang Chen Liang Wu Yiliang Zeng Yaming

(The key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The reading frame adjustment of target genes was often occurred in the study of gene engineering. The results of pET28-HA gene reading frame exactly adjustment showed high-fidelity DNA polymerase can be used generate blunt end from a DNA 5'-protruding end. The convenient method can be selected in the blunt of DNA 5'-protruding end.

Key words: High-fidelity DNA polymerase Blunt of DNA 5'-protruding end Code adjustment

在基因工程研究中,经常要把目的基因克隆入原核表达载体中以诱导表达目的蛋白,而目前所使用的原核表达载体(如 Novagen 公司的 pET 系列)大多设计有自己的翻译起始位点,外源基因插入原核表达载体时通常要考虑读码框与载体的一致性,以避免插入的外源基因出现移码突变。但有时测序后发现重组后的表达载体中插入的外源基因读码框与载体不一致,仍然出现了移码突变。应用酶切、补平后连接是读码框调整常用的方法之一。限制性内切酶切割 DNA 后产生的粘性末端的补平通常采用 Klenow Fragment 酶或 T4 DNA 聚合酶^[1] 或者一些公司推出的 DNA Blunting Kit 来完成。本文报道了利用高保真 DNA 聚合酶扩增 DNA 的产物在 3' 端是平末端的特点,对双酶切后产生的 3' 凹陷末端进行平滑化,然后平末端连接,从而实现了读码框正确调整的研究,为 DNA 3' 凹陷末端平滑化提供了一个有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株及载体: 大肠杆菌 DH5⁺, 装有 H5N1 亚型禽流感病毒 HA 基因但有移码突变的 pET28a-HA 为本实验室保存。

工具酶及主要试剂: 高保真 DNA 聚合酶(选用 Takara 公司 Pyrobest DNA 聚合酶),限制性内切酶、连接酶等工具酶(购于 Takara 公司),DNA 凝胶回收试剂盒(购于上海华舜生物工程有限公司),其它所用试剂均为分析纯试剂, LB 培养基及卡那霉素抗性培养基等均按常规方法配制。

收稿日期: 2005-12-19

作者简介: 张国广(1973-),男,在读博士, E-mail: zhanggg709@126.com

通讯作者: 陈亮,教授,研究方向: 细胞分子生物学,电话: 0592-21866050, Email: chen1304@263.net

1.2 方法

本研究室保存的 pET28a-HA 经上海英骏生物技术公司测序后,发现 HA 基因读码框与载体 pET28a 不匹配,出现移码突变。对序列分析后,发现用 Nde、Hind 双酶切后,补平粘性末端,平端连接后的将会使 HA 基因读码框正确调整(图 1)。

步骤: a 双酶切 在为质粒 30 μ l、Nde 和 Hind 酶各 0.8 μ l、10* K buffer 5 μ l、灭菌 ddH₂O 26.8 μ l, 总体积为 50 μ l 的体系内,对 pET28a-HA 质粒进行双酶切,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,酶切后的产物加入等体积 Tris 饱和苯酚-氯仿(1:1)抽提一次,上层水相转入新离心管中,加入 1/10 上层水相体积的 3 M (pH5.8) 醋酸钠,然后再加入 2 体积的无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C 放置 30 min,12 000 r/min 离心沉淀 DNA,70%乙醇洗沉淀 2 次,晾干备用。

b 用高保真 DNA 聚合酶对双酶切产生的 3' 凹陷末端 DNA 补平 在含有晾干的双酶切产物的离心管中加入灭菌 ddH₂O 17.6 μ l,10 \times PCR buffer 2 μ l,dNTP 0.5 μ l,Pyrobest DNA 聚合酶 0.2 μ l,总体积为 20 μ l。72 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 补平。

c 连接与转化 补平后的产物经琼脂糖凝胶电泳后,紫外灯下切出含目的片段的凝胶块,用试剂盒回收,回收产物用 T4 DNA 连接酶在 16 $^{\circ}$ C 的条件下连接 8 h,然后热激转化大肠杆菌 DN5 感受态细胞,转化细胞涂布卡那霉素抗性 LB 固体平板。

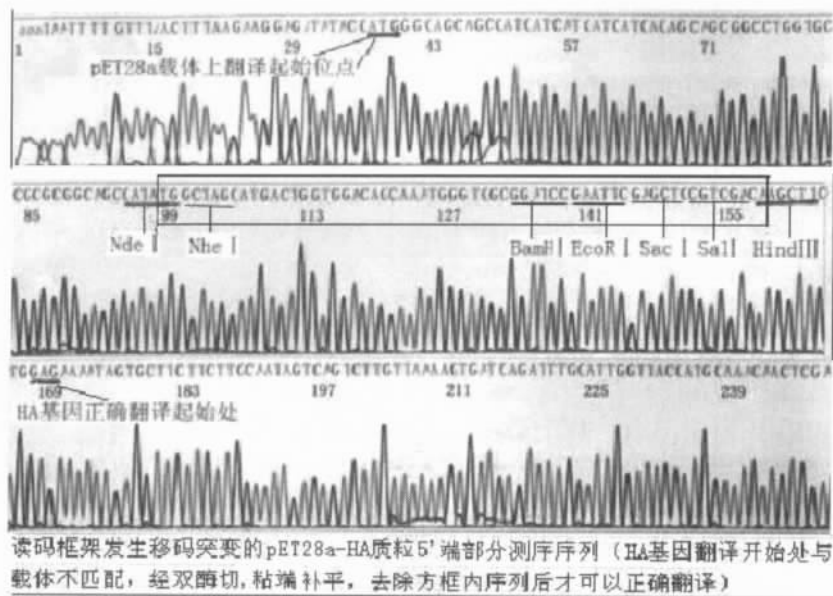


图 1 原 pET28a-HA 测序图(HA 基因读码框与载体不符合)

d 阳性克隆菌落 PCR 及酶切鉴定 对抗性平板上长出的经菌落 PCR 鉴定为阳性的白色克隆抽提质粒进行酶切鉴定。鉴于 Nde 和 Hind 双酶切后,两个位点之间的酶切位点已被去除,因此选用 BamH₁,Hind 和 Xho 三个内切酶进行组合酶切鉴定。根据预期设计,BamH₁位点已被去除,Hind 和 Xho 各有一个位点,其中 Hind 是平端连接后被修复的。所以采用三个酶各自单酶切和 BamH₁、Hind 分别和 Xho 组合双酶切,符合预期酶切要求的重组质粒送上海英骏生物技术公司测序。

2 结果与分析

密码子调整后的重组 pET28a-HA 工程菌株菌落 PCR 及酶切鉴定结果如下:

利用扩增 H5N1 亚型 HA 基因的一对特异引物,Forward primer: 5' GCGAAGCTTCTGGAGAAAATAGTGCTTC 3'; Reverse primer: 5' GCGCTCGAGTTAAATGCAAAATTCTGCATTG 3'。对从卡那霉素抗性平板上随机挑出的 5 个白色克隆进行菌落 PCR 鉴定,结果五个克隆均扩增出目的大小的片段(图 2(a))。从 5 个阳性克隆中随机

挑出三个, 扩大培养后碱裂解法抽提质粒, 以读码框未调整的原质粒作对照, 进行酶切鉴定(图 2(b)), 样 1 具有 Xho 位点, BamH 和 Hind 位点同时缺失, 说明 Nde 和 Hind 位点中间的序列被切除, 但连接时 Hind 位点没有得到修复, 读码框可能不对。样 2 具有 Xho 位点, BamH 位点缺失, 说明 Nde 和 Hind 位点中间的序列被成功切除, Hind 和 Xho 双酶切切出与目的片段大小相符合的片段, 说明平端连接时 Hind 位点得到修复, 读码框得以按预期设计进行了调整。样 3 具有 BamH 位点, 说明 Nde 和 Hind 双酶切时没有将中间位点切除掉, 与预期设计不符合。将重组样 2 菌株送上海英骏生物公司测序, 测序结果见图 3, 可见重组 pET28a-HA 表达载体的读码框得到成功调整, HA 读码框已与载体匹配, HA 蛋白可以被正确翻译。

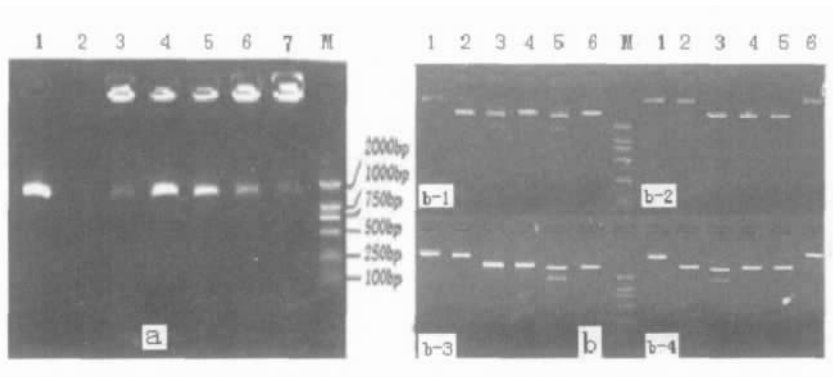


图 2 重组 pET28a-HA 基因的菌落 PCR 鉴定 (a) 和 PCR 阳性克隆质粒及对照酶切图 (b)

图 2(a) 1 阳性对照的 PCR 产物; 2 阴性对照; 3-7 5 个阳性菌落的 PCR 产物; M 宝生物公司 DL2000 DNA Marker;

图 2(b) b-1 原质粒酶切图, b-2 样 1 酶切图, b-3 样 2 酶切图, b-4 样 3 酶切图

(1) 未酶切质粒; (2) BamH 单酶切质粒; (3) BamH 和 Xho 双酶切质粒; (4) Xho 单酶切质粒; (5) Hind 和 Xho 双酶切质粒; (6) Hind 单酶切质粒; M 宝生物公司 DL2000 DNA Marker

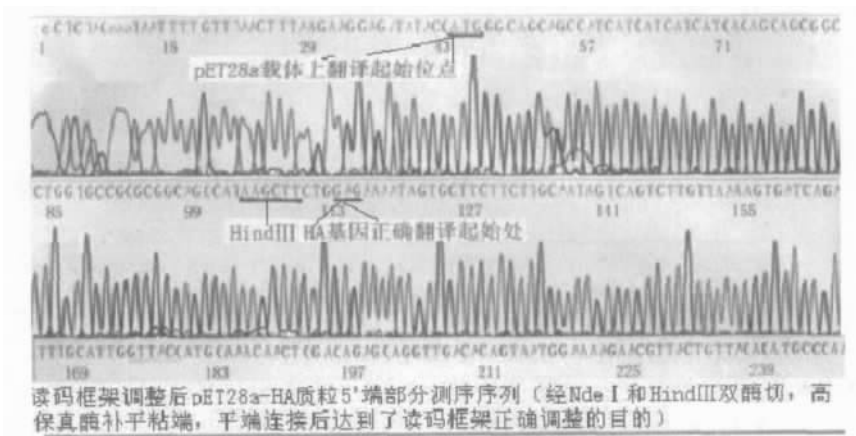


图 3 密码子调整后 pET28a-HA 重组质粒的测序图

3 讨论

在基因工程研究中, 尤其是在一些原核表达的研究中, 有时重组表达质粒经过测序后发现插入表达载体的外源基因读码框与载体不一致, 出现了移码突变, 这时要么将目的基因切下插入与其读码框匹配的载体(如 Novagen 公司开发的 pET28 系列中包含有 pET28a、pET28b 和 pET28c 三个载体, 它们的区别是在多克隆位点 BamH 前依次减少 1 个和 2 个核苷酸, 研究者可以根据所研究目的基因的读码框选用不同的表达载体); 要么重新设计带合适酶切位点的引物, 重新扩增后连接; 要么利用原载体, 找到合适的酶切位点, 通过酶切、补平、连接来调整读码框。前者很方便快捷, 但商业开发的载体较昂贵, 并不是每个实验室都能购买

所有配套的载体,而重新合成引物则需要等待引物合成的时间,以及随后的扩增和连接过程。而对载体进行序列分析后,运用实验室常备的工具酶进行酶切、补平操作来调整读码框的方法则非常方便快捷。对经过限制性内切酶切割 DNA 后产生的粘性末端的补平,通常采用 Klenow Fragment 酶或 T4 DNA 聚合酶^[1]或者一些公司推出的 DNA Blunting Kit,但从未见过有使用此外高保真 DNA 聚合酶补平 3'凹陷端的报道。高保真 DNA 聚合酶(如 Pfu DNA 聚合酶;Pyrobest DNA 聚合酶等)具有 3'-5'的外切活性,其 PCR 扩增产物的 3'端是平滑末端,与普通 Taq 酶的 PCR 扩增产物 3'末端通常附有一个碱基 A 不同。限制性内切酶切割 DNA 后在 3'端产生带有-OH 末端,高保真 DNA 聚合酶在正常反应体系中会将与另一条 DNA 链互补的碱基聚合上去,直至 DNA 粘性末端被补平。但由于高保真酶发生聚合反应的方向为 5'-3',因此不能应用于 3'突出末端的 DNA 补平。

本研究利用高保真 DNA 聚合酶成功地将 Nde 和 Hind 双酶切后产生的 3'凹陷端平滑化,通过平端连接得到了读码框正确的重组表达质粒 pET28a-HA,该重组质粒正被转入 BL21(DE3)中,用于原核表达及禽流感病毒基因工程疫苗制备的研究。本文报道的研究结果将会使研究人员在对 DNA 3'凹陷端平滑化、然后进行读码框调整时多了一个选择。

参 考 文 献

- 1 萨姆布鲁克丁 J,弗里奇 EF,曼尼阿蒂斯 T.分子克隆试验指南[M](第二版).金冬雁,黎孟枫,等译.北京:科学出版社,1999,267~271.

·信息交流·

中国地方猪 ESR 基因 Pvu 多态性及其与产仔数的关系

四川农业大学李明洲等 4 位研究人员试验采用 PCR-RFLPs 方法,研究了中国成华猪、内江猪和太湖猪 3 个地方品种 ESR 基因的多态性及其与产仔数间的关系。结果表明:成华猪、内江猪、太湖猪的 B 等位基因频率分别为 0.6389、0.6613、0.6855。在这 3 个猪品种中,除成华猪检测时只有 AB、BB 两种基因外,在内江和太湖猪中都检测到了 AA、AB、BB 3 种基因型。对 3 个品种不同基因型个体间产仔数的比较研究表明:不同 ESR 基因型的个体其产仔数存在一定差异,各品种无论头胎还是经产,总体表现为 BB 基因型的产仔数高于 AB 型和 AA 型个体,而 AB 型又高于 AA 型个体。其中太湖猪 BB 型个体头胎产活仔数(NBA) 11.13 头,显著高于产 9.42 头的 AB 型个体(P<0.05)。这证明了基因是对提高产仔数有利的基因,同时还分析了 ESR 基因 Pvu -RFLP 的应用前景及其存在问题。

据报道:中国地方猪二花脸猪,香猪 B 等位基因频率为 0.7321,外来品种则大约克猪、长白猪、“双臀肌”约克夏 B 等位基因频率为 0.3455,大白猪 B 等位基因频率分别为 0.55~0.75、0.4706。本次试验中 B 等位基因频率以太湖猪最高为 68.55%,内江猪次之为 66.13%,成华猪最低为 63.89%。这证明中国地方猪 B 等位基因频率普遍高于国外商业品种猪,验证我国地方猪种产仔数高的优良遗传性。

所测 ESR 基因的 Pvu 酶切片长度多态性与成华猪、内江猪和太湖猪的产仔数间存在一定的相关性。总体表现为 BB 基因个体的产仔数>AB 型个体的产仔数>AA 型个体的产仔数。这说明 B 基因有助于提高产仔性能。据报导 ESR-B 基因控制的 0.44~1.15 头产活仔数/胎。这对育种有一定参考价值。虽然 ESR 基因为控制猪高产仔数的主效基因或与主效基因紧密连锁,但与不同的商业猪种对产仔数的影响存在显著品种间和场间差异。另外,ESR 基因型对产仔数的影响在胎次间有差异,通常是对头胎产仔数的影响高于经产。

(下转第 72 页)