

用 Red介导的同源重组结合酶切改构质粒 DNA

于梅¹, 李山虎¹, 陈伟², 周建光^{1*}

(1. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850; 2. 厦门大学, 厦门 361005)

[摘要] 目的:用 Red介导的单链寡核苷酸体内同源重组结合限制酶切方法对 pBR322-Red质粒中的 DNA序列进行精确的缺失突变。方法:用合成的单链寡核苷酸打靶分子电击转化 W3110 (pBR322-Red)宿主菌,利用 Red提供的同源重组功能敲除从 *kiI*基因至 *N*基因长约 2 100 bp的 DNA序列,并用 *kiI-N*序列中含有的单一酶切位点 *Xho*对混合质粒进行酶切,取酶切产物转化 W3110感受态细胞,菌落 PCR方法筛选重组阳性克隆。结果:在没有任何筛选标记的情况下,用菌落 PCR方法从 10个菌落中成功挑选出 1个重组阳性克隆。结论:该方法操作简单、精确,能够避免引入新突变,为 DNA序列的缺失突变提供了一种新方法。

[关键词] 同源重组;缺失突变;DNA,单链;寡核苷酸类

[中图分类号] Q78 **[文献标识码]** A

[文章编号] 1000-5501(2005)03-0241-03

Reconstruction of plasmid DNA with Red mediated homologous recombination combined with restriction digestion

YU Mei¹, LI Shan-Hu¹, CHEN Wei², ZHOU Jian-Guang^{1*}

(1. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2. Xiamen University, Xiamen 361005, China)

[Abstract] **Objective:** To precisely delete a 2 100 bp DNA sequence in pBR322-Red plasmid using Red mediated single-stranded oligonucleotides *in vivo* homologous recombination combined with restriction digestion strategy **Methods:** A single-stranded oligonucleotides DNA target cassette was introduced into W3110 (pBR322-Red) host strain by electroporation, a 2 100 bp DNA fragment from *kiI* to *N* gene that contains a unique *Xho*I site in pBR322-Red plasmid was deleted by Red mediated *in vivo* homologous recombination. The recombinant plasmid DNA was screened from the plasmid DNA mixture with *Xho* restriction endonuclease digestion, and retransformed into W3110 competent cells. The positive clones were further identified by colony PCR assay. **Results:** One positive clone out of ten clones was successfully identified without any selectable marker. **Conclusion:** This new method of DNA sequence deletion mutation is simple and accurate. It could avoid new mutation in PCR process of traditional DNA manipulation method.

[Key words] homologous recombination; deletion mutation; DNA, single-stranded; oligonucleotides

用传统的遗传工程方法对重组质粒中含有的 DNA片段进行缺失突变时,往往需要设计重叠引物,经过 3次 PCR扩增,再运用限制酶和体外连接技术,才能将外源 DNA片段插入到载体中。不仅操作过程繁琐,而且有可能在 PCR过程中产生新的突变。

重组工程 (recombineering)是一种基于噬菌体重组酶的新型遗传工程技术,它的基本原理是通过噬菌体重组酶介导的大肠杆菌体内同源重组对 DNA序列进行修饰^[1,2]。pBR322-Red重组质粒是实验室构建的一种可在不同菌株中转移的新型重组工程系统^[3],该质粒携带了一段 6.7 kb长的

噬菌体左向操纵子序列,包括:噬菌 Red重组酶基因 *exa*, *bet*, *gam*和一系列的调控元件。前期工作中我们应用该系统提供的同源重组功能,完成了大肠杆菌 W3110染色体上的多种基因的敲除、替换和单碱基突变等 DNA修饰。

为了能够方便地对特定的 DNA序列进行精确的缺失突变,以便于探索基因的生物功能或者研究基因的表达调控,本课题运用重组工程技术之一,即单链寡核苷酸介导的 DNA重组^[4,5]结合限制酶切,精确地敲除了 pBR322-Red重组质粒中从 *kiI*基因至 *N*基因之间长约 2 100 bp的 DNA序列,在没有任何筛选标记的情况下,成功挑选出重组阳性克隆,建立了一种新的基于 Red体内同源重组的质粒改构方法。

[收稿日期] 2004-11-12

[基金项目] 军队“十五”医药卫生科学基金 (01MA089)

[作者简介] 于梅 (1978-),女,山东省烟台市人,在读硕士生, E-mail: yymeiook@hotmail.com.

*通讯联系人, Tel: 010-66931807

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 W3110菌株由美国国立卫生研究院癌症研究所 CourtDL博士惠赠;质粒 pBR322-Red为本室构建。

1.2 工具酶与化学试剂

Taq DNA聚合酶购自上海申能博彩生物科技有限公司;Ap(氨苄青霉素)为Sigma公司产品;氨苄青霉素抗性培养基(Cm^R)的工作浓度为30 μg/ml;限制性内切酶购自TaKaRa公司和BioLabs公司。质粒小量提取试剂盒为Promega公司产品。

1.3 引物合成

单链寡核苷酸引物 P1 序列为 5'-CTGCCACACACCAC-CAAA GCTAACTGACA GGAGAA TCCA GA TGG A TATAA TACT GAAACTGAGA TCAA GCAAAA GCA TTCAC-3', 用于敲除 pBR322-Red质粒中从 *kil*基因到 *N*基因的 DNA 序列;引物 P2 序列为 5'-TAGCAATTCA GATCTCTCACC-3', 引物 P3 序列为 5'-CCA GTTCTGCCTCTTCTC-3', 二者是在待敲除基因两侧设计的 PCR 鉴定引物。上述引物都由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.4 E. coli W 3110(pBR322-Red)感受态细胞的制备

挑取已转化有 pBR322-Red的大肠杆菌 W3110单菌落接种于 5 ml 液体 LB 培养基, 30 摇床过夜培养, 取过夜培养物稀释 50 倍后接种于 100 ml 液体 LB, 30 震荡培养至

$D_{600} = 0.4 \sim 0.6$, 取 15 ml 培养物置于 150 ml 锥形瓶中, 42 水浴震荡培养 (200 r/min) 7.5 min, 立刻冰浴 30 min, 将上述培养物转移至到高压灭菌处理的聚丙烯离心管中, 4 条件下, 7 500 r/min 离心 8 min, 弃去上清。再加入 30 ml 冰冷的无菌水重悬菌体以清洗除盐, 7 500 r/min 离心 8 min, 小心弃去上清, 重复水洗 1 次后再用 1 ml 冰冷的无菌去离子水重悬于 1.5 ml 离心管中。最后在 4 高速离心 30 s, 小心弃去上清, 重悬于 200 μl 冰冷的无菌水中。这样一次制备的感受态细胞的量够 4 次标准的电穿孔转化。

1.5 电击转化

30 ng 的单链寡核苷酸 P1 与上述细菌感受态细胞混合至终体积 50 μl, 加入预冷的 0.1 cm 电击杯中; Bio-Rad 电转仪设置 1.8 kV, 25 μF, 电阻 200 Ω, 电击后迅速加入 1 ml LB 将细菌洗出, 30 孵育 2 h。

1.6 其他

质粒转化、菌落 PCR 方法参见《分子克隆实验指南》; 质粒提取方法依据质粒提取试剂盒说明书进行。

2 结果

2.1 单链寡核苷酸重组引物的设计

单链引物 5 端 40 bp 和 3 端 43 bp 分别与 *N* 基因和 *kil* 基因两侧的序列同源, *N* 基因上游 35 400 ~ 35 361 bp 序列连接 *kil* 基因下游 33 232 ~ 33 190 bp, 共 83 bp。保留了 *N* 基因的 SD 序列和 *gam* 基因的起始密码子 ATG (图 1)。

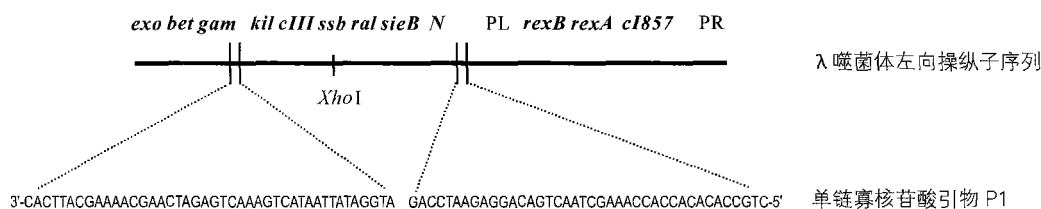


图 1 噬菌体左向操纵子序列及单链引物

2.2 pBR322-Red质粒酶切位点分析

用软件分析 pBR322-Red质粒的限制酶切位点, 分析在待敲除的 *kil-N* 基因之间存在、而在质粒其他序列中不存在的酶切位点, 选择其中比较常用的 *Xho* 限制性内切酶对重组后的混合质粒进行酶切。

2.3 pBR322-RedQ重组质粒的构建

按照材料与方法中提供的步骤, 将单链寡核苷酸电穿孔转化感受态细胞。在 Red 重组酶作用下, 理论上为 1% ~ 6% 的细菌发生体内同源重组, 结果将产生单链寡核苷酸 P1 替换 pBR322-Red 质粒中从 *kil* 基因至 *N* 基因之间长约 2 100 bp 的 DNA 序列的重组子 (图 2)。为了从上述细菌混合物中筛选出发生体内同源重组的克隆, 先将培养 2 h 后的细菌全部转入氨苄青霉素终浓度 30 μg/ml 的 5 ml LB 液体培养基中, 30 继续培养 3 h, 细胞复制 5 ~ 6 代。提取质粒 DNA, *Xho* 酶切过夜。未发生同源重组的质粒被线性化, 无法转化大肠杆菌。取约 5 μl 酶切产物转化 W3110 感受态细胞, 最后

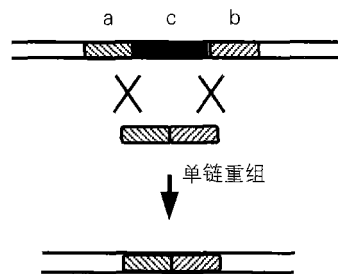


图 2 单链重组示意图

a, b. 代表同源臂; c. 代表在质粒中要敲除的基因
 单链寡核苷酸引物

通过菌落 PCR 筛选出 *kil-N* 基因被缺失的质粒, 新构建的质粒命名为 pBR322-RedQ (图 3)。预计原始 pBR322-Red 质粒的 PCR 片段约 2 700 bp, 成功产生缺失突变的 pBR322-RedQ

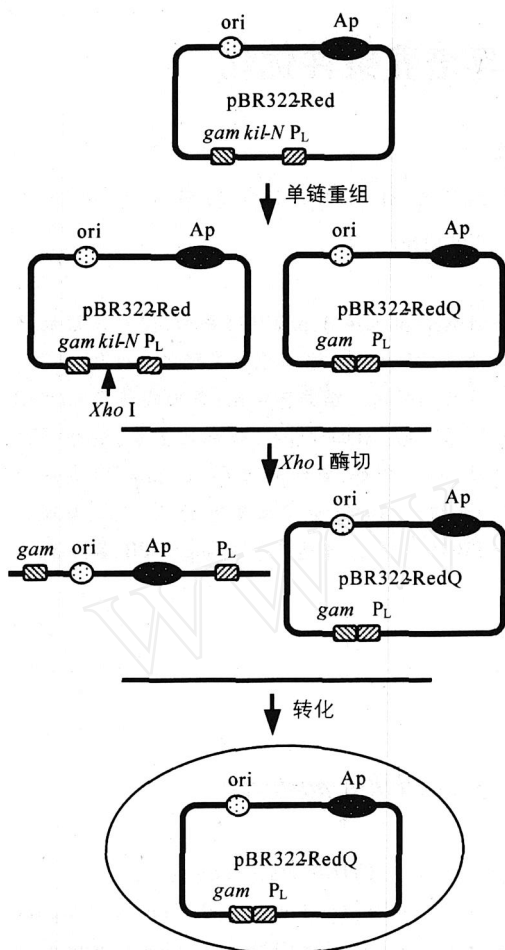


图 3 pBR322-RedQ 质粒的构建示意图

▨▨ 代表单链寡核苷酸引物中分别与 *N* 基因和 *kil* 基因两侧同源的序列

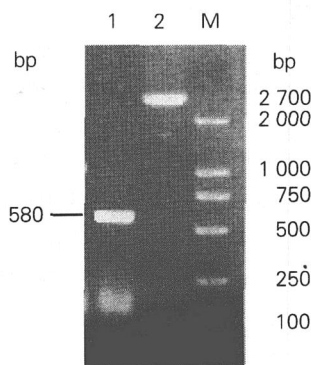


图 4 pBR322-RedQ 质粒的 PCR 鉴定图

M. 相对分子质量标准 DL2000; 1. pBR322-RedQ 质粒;
2. pBR322-Red 质粒

质粒的 PCR 片段约长 580 bp (图 4), 结果证明我们获得了预期的阳性克隆。

3 讨论

重组工程是一种基于噬菌体重组酶 Red/RecET 和同源重组反应的新型遗传工程技术^[6]。在进行同源重组时为方便重组阳性克隆的筛选,一般在打靶分子中加入抗性基因等可选择标记,但这些抗性基因的存在可能会影响基因的功能。用单链寡核苷酸作为打靶分子对基因进行修饰的重组效率很高,为 1%~6%。在没有任何选择标记的情况下,只需 PCR 就能鉴定出重组阳性克隆,但往往上百个克隆才能挑选出一个重组阳性克隆^[5]。传统的 DNA 序列缺失突变的方法很容易在 PCR 过程中诱发新的突变而影响基因的功能。本研究将单链寡核苷酸重组与酶切方法相结合,提高了重组克隆的阳性率,简化了单链寡核苷酸重组方法的筛选过程,每 10 个菌株中就能筛选到 1 个阳性克隆。用该方法可对质粒进行多碱基或长基因片段敲除,在实验过程中不会引入任何新的突变。同源臂的位置就限定了待缺失 DNA 序列的界限,因而定位精确,能够准确到一个碱基,是一种对质粒进行部分基因精确缺失的新方法。

[参考文献]

- [1] Copeland NG, Jenkins NA, Court DL. Recombining: a powerful new tool for mouse functional genomics[J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(10): 769 - 779.
- [2] Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. Genetic engineering using homologous recombination[J]. Annu Rev Genet, 2002, 36: 361 - 388.
- [3] 李山虎,洪鑫,于梅,等. Gap-Repair 方式建立一种基于 pBR322-Red 的新型重组工程系统 [J], 遗传学报, 2005, 已接受.
- [4] Ellis HM, Yu D, DiTizio T, et al. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98 (12): 6742 - 6746.
- [5] Swaninathan S, Ellis HM, Waters LS, et al. Rapid engineering of bacterial artificial chromosomes using oligonucleotides[J]. Genesis, 2001, 29 (1): 14 - 21.
- [6] 周建光,洪鑫,黄翠芬. 重组工程及其应用 [J], 遗传学报, 2003, 30 (10): 983 - 988.

(本文编辑 孙承媛)