

文章编号:1674-7054(2010)03-0206-04

利用限制性内切酶 *Xcm* I 构建 T 载体

夏志辉,董军美,罗越华
(海南大学 农学院,海南 海口,570228)

摘 要: 采用 5'端引入 1 个限制性内切酶 *Xcm* I 酶切位点的 1 对引物,以水稻品种日本晴基因组 DNA 作为模板,扩增得到一段 627 bp 的 PCR 片段,并将其连接到 pGEM⁺-T Easy 载体上得到名为 T-xia 的重组载体。利用限制性内切酶 *Xcm* I 酶切 T-xia 载体产生的自制 T 载体与其他 PCR 片段连接,检测结果表明,有 80% 的重组菌能扩增出目的片段。

关键词: T 载体;PCR;*Xcm* I

中图分类号: Q 782 **文献标志码:** A

PCR 作为分子生物学的一项基本技术,被广泛用于体外扩增 DNA 片段,而 PCR 产物的克隆是对其进行鉴定、扩增以及实现 PCR 产物多种用途的必经之路。由于 Taq 聚合酶具有优先添加单个腺嘌呤残基(A)到双链 DNA 分子的 3'末端的活性,因此由 Taq 聚合酶 PCR 扩增而来的分子在 3'端有一个悬挂的 A^[1]。T 载体的 3'末端连接有一个胸腺嘧啶(T)残基,能够用于 PCR 产物的快速克隆且易于操作而受到广泛欢迎。但目前市售的 T 载体存在价格高、连接效率不稳定等问题。笔者利用 *Xcm* I 酶制备了一个简单通用的 T 载体。该载体的制备方法简单,使用方便,阳性率较高,特别适合经费不足或者购买不方便的实验室使用。

1 材料与方法

- 1.1 细菌菌株、质粒、酶以及化学试剂** 用于克隆的大肠杆菌菌株:*Escherichia coli* DH5a。载体为 pGEM⁺-T Easy(通过酶切位点分析,pGEM⁺-T Easy 载体不含有 *Xcm* I 的酶切位点),本实验涉及的酶及试剂分别为:Taq DNA 聚合酶、脱氧核苷三磷酸(dNTPs)、T4 DNA 连接酶、DNA 凝胶回收试剂盒。
- 1.2 水稻基因组 DNA 微量提取(SDS)** 1)取新鲜叶片,在液氮中研磨,将研磨所得粉末移到 1.5 mL 离心管中(约半管),加入 65 ℃预热的 600 μL 提取缓冲液(缓冲液各成分终浓度:NaCl 500 μmol·L⁻¹;ρ(SDS)=12.5 g·L⁻¹;Na⁺·EDTA 50 μmol·L⁻¹;Tris 100 μmol·L⁻¹),混匀后于 65 ℃水浴锅中保温 40 min(其间每 10 min 摇晃 1 次);
- 2)加入 200 μL 5 mol·L⁻¹ KAc,摇动混匀,摇匀后冰上放置 20 min。
- 3)加入 450 μL 的氯仿(-20 ℃预冷),摇匀,静置 5 min。
- 4)12 000 r·min⁻¹离心 10 min。
- 5)取 600 μL 上清液,加入到 1.5 mL 干净的离心管中,然后加入 500 μL 异丙醇(-20 ℃预冷),静置 5 min 后,轻轻摇动,12 000 r·min⁻¹,离心 10 min。
- 6)弃去上清,用 φ=70% 的乙醇冲洗沉淀 2 次,最后用无水乙醇洗 1 次。倒置离心管干燥 1 h。
- 7)加入 600 μL ddH₂O 溶解 DNA,取 2 μL 用于 PCR 模板。
- 1.3 PCR 片段的获得** 为了尽量减少引物的长度,本研究通过对水稻品种日本晴基因组序列的分析,设计了一对与日本晴基因组序列有 1~2 个碱基不匹配但都包含 *Xcm* I 酶切位点的引物 F(5'-CGACCAT-

收稿日期:2010-07-13
基金项目:教育部重点项目(210173),海南大学科研启动项目(KYQD1001)资助。
作者简介:夏志辉(1978-),男,湖南宁远人,海南大学农学院,助理研究员,博士。E-mail:zhxia-111@163.com

GCGTGAATGGAG-3'),引物 R(5'-CTGCCAAATATTTGCTGGTT-3')(下划线标注的为 *Xcm* I 酶切位点,酶切后形成3'悬挂的单碱基 T 用粗体标出)。水稻品种日本晴基因组 DNA 为模板,用此引物对 PCR 进行扩增,PCR 扩增按如下方法进行。反应体系如下:

10 × PCR Buffer	2 μL
20 × dNTP Mixture	1 μL
Primer F (5 μmol · L ⁻¹)	1 μL
Primer R (5 μmol · L ⁻¹)	1 μL
Taq 酶(3 g · L ⁻¹)	0.3 μL
Template DNA	2 μL
ddH ₂ O	12.7 μL
总体积	20 μL

扩增程序为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 40 s,56 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环;72 ℃延伸 10 min。扩增后利用 $w=1.0\%$ 的琼脂糖凝胶电泳在 100 V 的电压下电泳 25 min,分离,检测 PCR 扩增产物。然后将特异性扩增条带经 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化。

1.4 T-载体的制备及其应用 取回收纯化过的 PCR 产物 7 μL,T4 DNA 连接酶 1 μL,pGEM[®]-T Easy 载体 1 μL,10 × buffer 1 μL,混匀后 16 ℃连接过夜;取 5 μL 连接产物置于 50 μL 热激感受态中,轻轻混匀后冰上放置 30 min。42 ℃,90 s 热激;冰上放置 2 min,加入 400 μL 无抗生素的 LB 液体培养基,置于摇床复苏培养 1 h。取 100 μL 菌液涂布于含氨苄青霉素(终质量浓度 100 μg · L⁻¹)的 LB 平板上,37 ℃培养过夜。从平板上挑取菌落置于含氨苄抗生素的 LB 液体培养基中进行培养,37 ℃振荡培养 8 h,超净台中取 2 μL 菌液做模板进行 PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 T-载体的鉴定及测序 由于生物公司合成的引物不能保证完全的正确,而在引物中间或 5'端有个别碱基的错配一般不会影响 PCR 的扩增,因此对 PCR 鉴定为阳性的菌株,还需要送往测序公司进行测序。测序结果表明(见图 1):含 *Xcm* I 酶切位点的 F 引物在 42 ~ 62 bp 之间,含有 *Xcm* I 的下游 R 引物在 650 ~ 669 bp 之间,引物的扩增片段为 627 bp,与预计的完全一致。通过对序列的进一步比对分析,测序出来的 *Xcm* I 酶切位点的序列与设计的序列完全一致,因此,该载体通过 *Xcm* I 酶切,可以制备 T 载体。

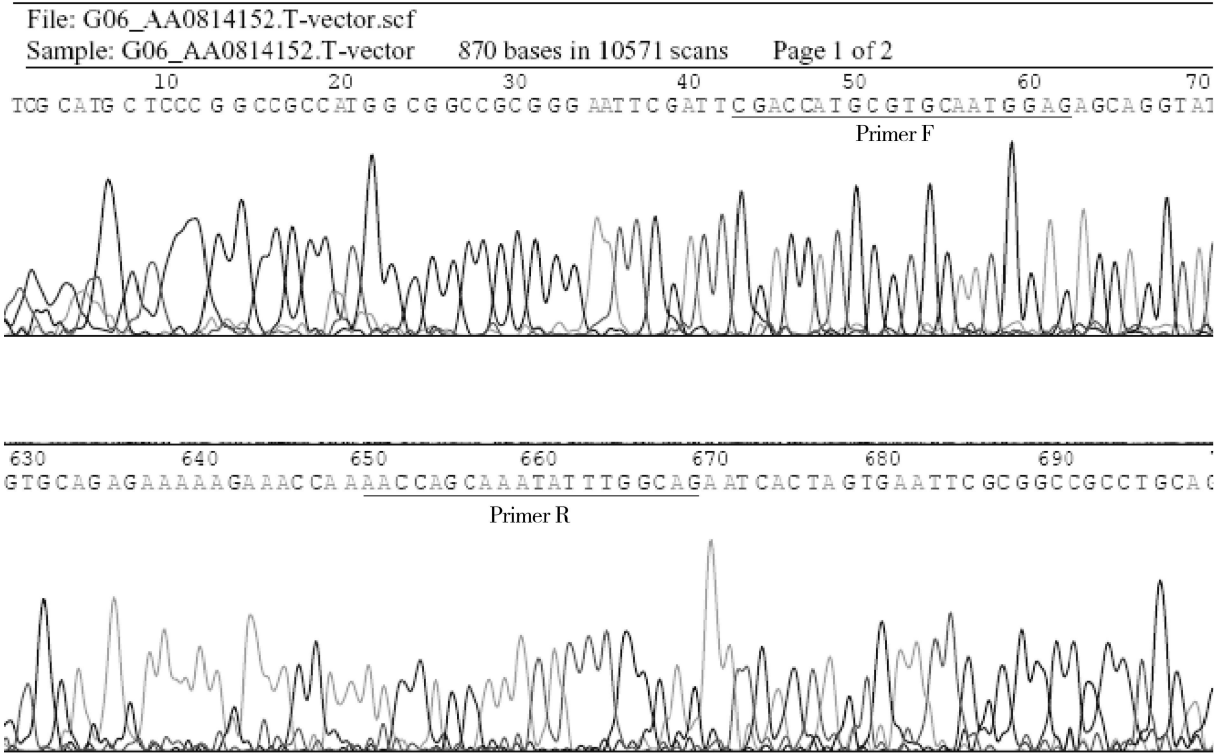


图 1 T 载体测序结果(引物位置用下划线标出)

2.2 T 载体的制备及克隆效果的检测 将上述测序正确的菌株扩繁后,提取质粒用 *Xcm* I 酶切(见图 2),回收大于 2 000 bp 的 T-载体片段,然后与 1 个长为 2 000 bp 的 PCR 片段连接,转化大肠杆菌,评估自制 T-载体的效率。通过对转化菌落的菌液 PCR 检测(见图 3),结果表明:检测了 10 个用自制 T 载体连接 PCR 产物的菌落,一共有 8 个菌落能扩增 2 000 bp 的目的片段,阳性率为 80%。

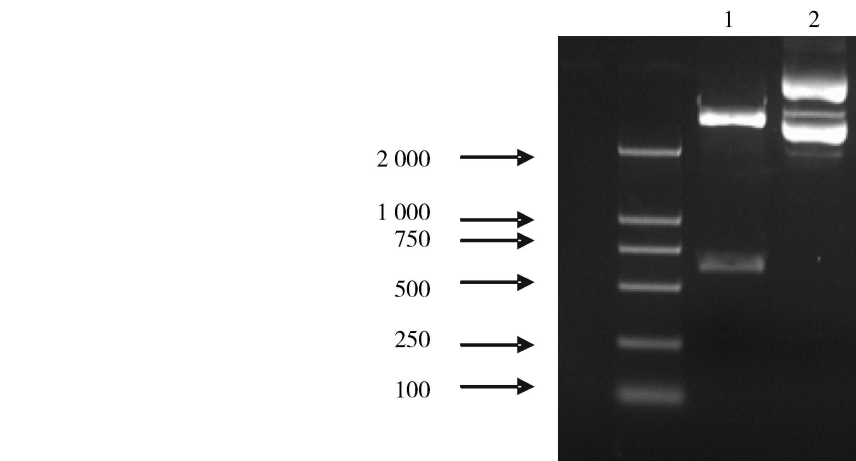


图 2 载体 T-Xia 酶切图
1: *Xcm* I 酶切, 2: 未酶切

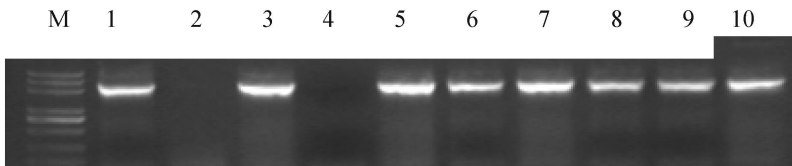


图 3 目的片段的 PCR 检测
M: DL 2 000 分子标记, 1 ~ 10: 重组菌落

3 讨 论

目前制备 T 载体的主要方法有:采用 *Eco* RV 等平末端内切酶消化载体,再用末端脱氧核苷转移酶或 *Taq* 酶加上一个悬挂的 T^[2]。徐锋等应用 *Pst* I 酶切,然后通过 T4 DNA 聚合酶处理构建了 T 载体^[3]。应用 *Taq* 酶或末端脱氧核苷转移酶加 T,由于很难保证所有末端都加上 T,因此很难避免载体自连。通过 *Pst* I 酶切,然后采用 T4 DNA 聚合酶处理的制备方法,尽管成本比较低,但应根据载体的量来精确控制 T4 DNA 聚合酶处理时的浓度和时间,这不仅增加了操作上的难度,而且可能会导致不同批次制备的 T 载体效率不一。利用 *Xcm* I 酶切制备 T 载体,前人已经取得较多的成功例子^[4-9]。用 *Xcm* I 酶切直接制备 T 载体的方法则比较容易操作,且较稳定,即使用过量的酶长时间处理,对 T-载体的最终质量也没有多大影响。笔者认为,提高 *Xcm* I 酶切法制备 T-载体的效率,需要考虑的因素是:2 个 *Xcm* I 酶切位点的间隔片段的长度,如果间隔片段太短,则无法区分单酶与双酶切的片段,如果片段太长,甚至达到与 T 载体相当长度,则无法将间隔片段与酶切开的 T 载体分开。在本研究中,*Xcm* I 酶切位点之间的间隔片段为 627 bp,由图 2 可以看出,酶切产物经电泳后,获得的 T-载体条带在环形质粒与超螺旋质粒之间,因此,在回收 T 载体时,可以避免回收未酶切或只有单酶切的质粒,提高了自制 T-载体的效率。

参考文献:

[1] MARCHUK D, DRUMM M, SAULINO A, et al. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products[J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19 (5):1154.
[2] KOVALIC D, KWAK J H, WEISBLUM B. General method for direct cloning of DNA fragments generated by the polymerase chain reaction[J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19 (16):4560.

[3] 徐锋, 武晓丽. 简易快速高效制备 T 载体[J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (2):460 – 461.

[4] HARRISON J, MOLLOY P L, CLARK S J. Direct cloning of polymerase chain reaction products in an *Xcm* I T-vector[J]. Anal Biochem, 1994, 216 (1):235 – 236.

[5] SCHUTTE B C, RANADE K, PRUESSNER J, et al. Optimized conditions for cloning PCR products into an *Xcm* I T-vector [J]. Biotechniques, 1997, 22 (1):40 – 42, 44.

[6] ARASHI-HEESE N, MIWA M, SHIBATA H. *Xcm* I site-containing vector for direct cloning and in vitro transcription of PCR product[J]. Mol Biotechnol, 1999, 12 (3):281 – 283.

[7] ARANISHI F, OKIMOTO T. Engineered *Xcm* I cassette-containing vector for PCR-based phylogenetic analyses[J]. J Genet, 2004, 83 (1):33 – 34.

[8] PARK H K, ZENG C. Construction of an *Xcm* I -generated T vector bearing green fluorescent protein marker for direct cloning of PCR products[J]. Anal Biochem, 2007, 360 (1):144 – 145.

[9] 冯辉, 赵斌, 何正国. 一个通用策略用于构建新型 T 载体及其应用[J]. 湖北农业科学, 2007, 46 (5):671 – 673.

Construction of T Vector Using Restriction Endonuclease *Xcm* I

XIA Zhi-hui, DONG Jun-mei, LUO Yue-hua
(College of Agriculture, Hainan University, Haikou, 570228, China)

Abstract: In our report, rice variety Nipponbare genome were used as template, a pair of primers which were added a *Xcm* I site at each 5’ end were used to amplify, and a 627bp fragments were obtained, which was ligated into pGEM-T Easy to develop a recombinant vector, T-xia. Self-made T vector was obtained when T-xia was digested by *Xcm* I , and the results of the ligation with other PCR products indicated that 80% recombination clones contained target fragments.

Key words: T vector; PCR; *Xcm* I

(上接第 205 页)

A Protocol for Total RNA Extraction from the Roots of Banana

WANG Jia-shui^{1,2}, Jia Cai-Hong¹, LIU Ju-hua¹, Zhang Jian-bing¹, JIN Zhi-qiang¹
(1. Key Laboratory of Topical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture ,Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, China;
2. Department of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The method of improved CTAB, SDS and QIAGEN RNeasy Plant Mini kit were used to isolate total RNA from juvenile and senescence banana roots respectively, and the quality, quantity and purity of total RNA were compared. The results showed that the quality, quantity and purity of total RNA isolated by improved SDS were superior to that by other methods.

Key words: banana roots; improved SDS method; total RNA; extraction