

文章编号: 1674-7054(2016)02-0232-05

利用毒素蛋白基因 *ccdB* 构建高效低背景 T-载体

耿晓姝¹, 刘 秦¹, 党会杰², 武军政², 罗丽娟¹

(1. 海南大学 农学院, 海口 570228; 2. 海南大学 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地, 海口 570228)

摘 要: 高效低背景 T-载体的构建可显著提高克隆 PCR 产物的效率。笔者介绍 1 种在实验室常规条件下简单快捷制备高效低背景 T-载体的方法。将含有限制酶 *Xcm* I 酶切位点的 *ccdB* 致死基因作为插入 DNA 片段连接到 pMD19-T Simple Vector 骨架上得到重组质粒, 通过菌落 PCR、酶切分析及测序验证正确的重组质粒经限制酶 *Xcm* I 酶切即得到 T-载体。该 T-载体含有的 *ccdB* 致死基因可以降低载体自连的背景干扰, 提高了 T-A 克隆效率, 具有较高的阳性克隆率, 继承了 pMD19-T Simple Vector 的优点, 与普通 T-载体相比, 还具有高效、低背景的优越性。整个操作过程简易可行, 具备一定的应用前景。

关键词: 高效; 低背景; *ccdB* 基因; pMD19-T Simple Vector; T-载体

中图分类号: Q 782

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2016.02.016

分子克隆技术作为研究分子生物学的一种常规技术手段, 应用范围广泛。通过体外 PCR 扩增, 获得目的片段, 然后克隆至高拷贝载体上, 通过特定的筛选标记, 获取包含插入目的片段载体的宿主细胞, 扩大培养后, 提取质粒, 最终获得大量拷贝的目的片段。无论宿主细胞还是连接了外源基因的质粒, 都可以长久保存, 为下游的各种实验研究提供了便利条件。T-A 克隆利用 *Taq* DNA 聚合酶对 DNA 模板 3' 端的非依赖添加 1 个 dA(脱氧腺苷)的特性^[1], 使得 PCR 产物可以直接连到 3c 末端突出 1 个 dT(脱氧胸苷)的 T-载体上。T-载体的商业化使得分子克隆变得快捷、方便, 但也存在价格昂贵, 产品质量不一, 无法循环使用等不足。目前, 制备 T-载体的方法主要有 PCR 法和内切酶法。前者利用耐热 *Taq* DNA 聚合酶催化, 以 dTTP 为底物, 在 2 个 3c 末端加上 1 个胸腺嘧啶残基(dT), 纯化后获得 T-载体^[2], 但由于在反应中, 无法保证每个 3c 末端都能加上 dT, 所以克隆过程中出现假阳性的概率较大, 增大了筛选阳性克隆的工作量。后者利用 *Xcm* I^[3], *Hph* I^[4], *Bfu* I, *Ahd* I 等限制性内切酶酶切载体, 使其酶切后在 3c 末端各有 1 个 dT 突出碱基。*Xcm* I 酶识别序列 CCA(N5/N4)TGG, 当第 8 位碱基为 T 时, 通过同时酶切 2 个方向相反的 *Xcm* I 位点, 即可获得线性 T-载体, 但当载体酶切不完全时载体较容易产生自连。商业化的 T-载体大多采用 β -半乳糖苷酶显色反应选择法进行阳性克隆的筛选, 插入外源基因的载体在宿主细胞中无法合成 β -半乳糖核苷酶, 进而无法分解色素底物 X-gal, 最终形成白色菌斑, 而转入空载的宿主细胞则形成蓝色菌斑。当插入片段不足以破坏 β -半乳糖核苷酶的开放阅读框时, 同样会出现假阳性。大肠杆菌的 F 质粒上存在的毒素-抗毒素系统 *ccd*(control of cell division or death system), 该系统编码毒素蛋白 *ccdB* 和抗毒素蛋白 *ccdA*^[5]。*ccdB* 和 *ccdA* 基因位于同一个操纵子上并相邻排列^[6], *ccdB* 蛋白通过与 DNA-促旋酶形成复合体干扰 DNA 的合成, 在没有解毒剂存在的条件下, 对宿主细胞具有致死作用^[7]。对于 DB 3.1 大肠杆菌菌株, 其促旋酶第 462 位的精氨酸 Arg 突变为半胱氨酸 Cys, *ccdB* 毒性蛋白无法产生干扰作用, 也就是说

收稿日期: 2016-01-15

基金项目: 国家自然科学基金(31360575); 海南大学优秀研究生学位论文培育计划(M8K3124001003002); “木薯和橡胶糖代谢、耐贫瘠和抗病抗理”项目(ZXBJH-XK001)

作者简介: 耿晓姝(1988-), 女, 海南大学农学院 2013 级在读硕士研究生。E-mail: 1005871997@qq.com

通信作者: 罗丽娟(1964-), 女, 教授。研究方向: 植物学。E-mail: Luoljd@126.com

DB3.1 菌株对 *ccdB* 毒性蛋白耐受^[8]。以上特性,使得 *ccdB* 作为 1 种筛选标记,降低了筛选背景,简化了阳性克隆的筛选工作。笔者以 pMD[®] 19-T Simple Vector 为骨架载体,结合 *Xcm* I 的酶切特性和 *ccdB* 致死基因的阳性筛选机制,最终构建出一种高效、低背景,且容易大量制备、长久保存的新型 T-载体。

1 材料与方法

1.1 载体、菌株与试剂 *ccdB* 基因扩增模板 Gateway rf A cassette(Invitrogen),T-载体骨架 pMD[®] 19-T Simple Vector(Takara),LA taq 酶(Takara),T4 连接酶购于 Fermentas 公司,限制酶 *Xcm* I 购于 NEB 公司,其他内切酶均购于 Thermo Fisher Scientific 公司,大肠杆菌 DH 5 α 和 DB 3.1 由本实验室保存。引物合成及基因测序由上海英骏生物技术公司完成。

1.2 *ccdB* 基因的扩增 使用表 1 中的引物 XT-F 和 XT-R,以 Gateway rf A cassette 为模板,使用 LA taq 酶。按照以下程序进行 PCR 扩增:预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,退火 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,32 个循环,终末延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。1.2 % 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并回收。

表 1 *ccdB* 基因扩增引物及序列

Tab. 1 Primers and sequences

Primer	Primer sequence/(5'-3')	Product size/bp
XT-F	CCAATACTTGATGGggtactactaaag	705
XT-R	CCAATACTTGATGGgtcgacctgcag	
M13-F	TGTAACACGACGGCCAGT	817
M13-R	CAGGAAACAGCTATGACC	

1.3 新型 T 载体 pXCT 的构建 将含有 *ccdB* 基因的片段,参照试剂盒 pMD[®] 19-T Simple Vector 说明书,连接到载体上,转入 DB3.1 感受态细胞,涂布在含有氨苄的 LB 平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,次日挑取单菌落。使用 XT-F,XT-R 进行阳性克隆鉴定。当 *ccdB* 基因片段位于骨架载体的启动子 lac 下游时才能顺利表达。为确定其在载体上的连接方向,使用引物 XT-F,M13-R 对阳性克隆进行方向确定,挑取有阳性条带的单菌落,摇菌,提质粒,送样测序,将验证正确的重组质粒命名为 pXCT。

1.4 pXCT 的致死检测及外源片段连接验证 为验证 pXCT 的致死能力,取 50 ng 的 pXCT 质粒将其转入 100 μL DH5 α 感受态中,各取 50 μL 涂布含 IPTG 和不含 IPTG 的 LB 平板,过夜培养,次日观察菌落生长情况。

使用 NEB 的 *Xcm* I 2 μL ,NEBuffer 2.1 5 μL ,pXCT 质粒 10 μg ,补水到 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜酶切,电泳后,胶回收大片段,该片段为线性 T-载体,将其命名为 pXCT-X。为了验证其连接能力,将试剂盒 pMD[®] 19-T Simple Vector 提供的对照 DNA (500 bp) 和本实验室由木薯中克隆出的 1 段单糖转运蛋白全长基因(约 1 500 bp)作为插入片段分别与 pXCT-X 连接,PCR 检测阳性菌落并送样测序,确定其克隆效率。连接体系:线性 T-载体 pXCT-X 20 ng,对照 DNA/目的基因 20 ng,T4 buffer 2 μL ,T4 连接酶 0.4 μL ,22 $^{\circ}\text{C}$ 连接 30 min。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pXCT 的鉴定与分析 T-载体 pXCT 的构建示意图见图 1。为鉴定阳性克隆以及验证 *ccdB* 基因片段的插入方向,分别使用不同的引物进行菌落 PCR 检测,结果如图 2 所示。由图 2(a)可见,随机挑选的 10 个单菌落中,均为阳性菌落。为验证片段插入方向,使用表 1 中的引物 XT-F 和 M13-R 对已验证的 10 个阳性菌落再次进行 PCR 检测,结果如图 2(b),10 个阳性克隆中,有至少 4 个(泳道 1,3,6,10)单菌落中 *ccdB* 基因片段的插入方向是正向的。

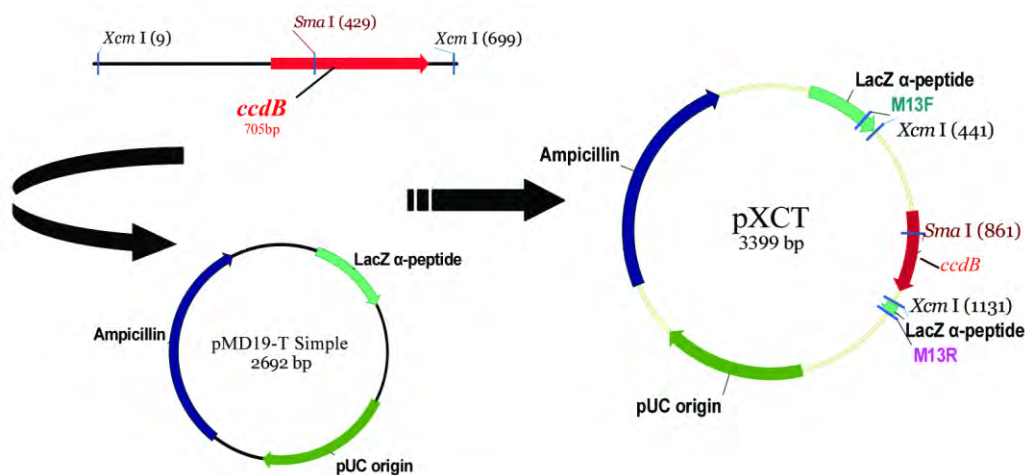


图1 pXCT 的构建示意图

Fig. 1 Construction of vector pXCT

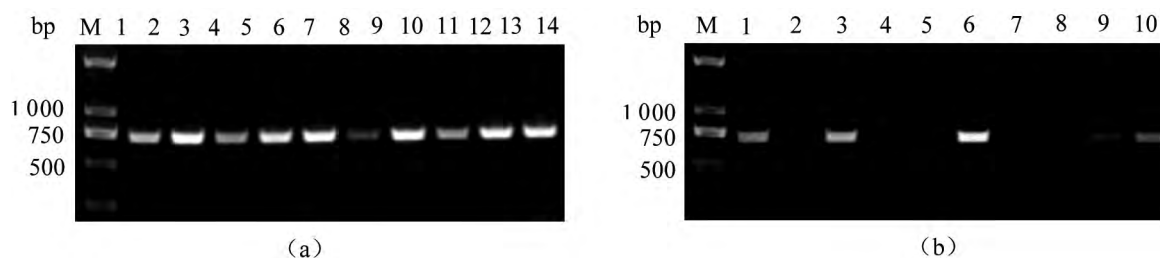


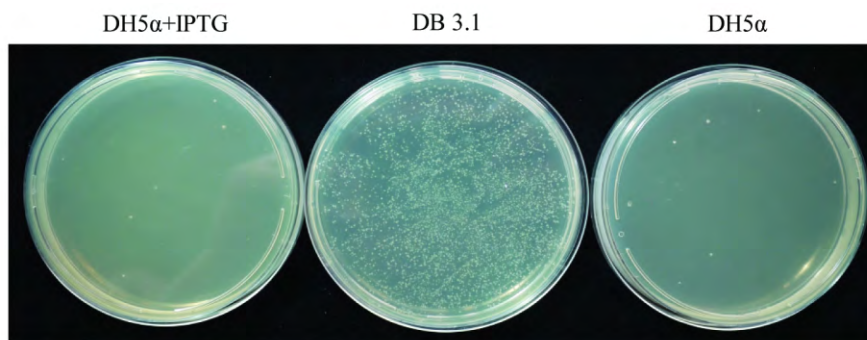
图2 重组质粒 pXCT 阳性克隆筛选

(a) 1 ~ 14: 菌落 PCR 筛选阳性克隆; (b) 1 ~ 10: 菌落 PCR 筛选 *ccdB* 基因正向菌落

Fig. 2 Positive clone screening of recombinant plasmid pXCT

(a) 1-14: Clones for PCR identification; (b) 1-10: Clones for PCR direction identification; M: DNA Marker

为确定 pXCT 在大肠杆菌菌株 DH5 α 上的致死能力, 将其分别转入 DB3.1 和 DH5 α 中做对比试验。为验证 *ccdB* 在 pXCT 中的表达是否需要 IPTG 的诱导, 又分别将转入 pXCT 的 DH5 α 涂布在含有 IPTG 和不含有 IPTG 的 LB 培养基上, 其生长结果如图 3 所示。涂布 DB3.1 菌株的 LB 平板布满大量单菌落, 而涂布 DH5 α 菌株的 LB 平板上只生长出极少数的几个单菌落。说明 pXCT 质粒对不耐受 *ccdB* 毒性蛋白的 DH5 α 菌株致死效果明显, 并且其致死能力不依赖于 IPTG 的诱导表达。

图3 pXCT 质粒在 DB3.1 和 DH5 α 的致死性比较Fig. 3 Comparison of lethal effect of pXCT plasmid in the DB3.1 and DH5 α strains

2.2 T 载体 pXCT-X 的构建及连接外源片段验证 pXCT 经 *Xcm* I 酶切后电泳结果如图 4-a。由图可以看出 pXCT 经酶切得到 2 个片段, 其中小片段为被切掉的含有 *ccdB* 的片段, 大小约为 700 bp, 大片段为 3c

末端突出 1 个 T 的片段,该片段即为 pXCT-X。将其连接对照 DNA 和目的基因后,各随机挑取 14 个单菌落,用 M13-F, M13-R 引物进行 PCR 检测。两者挑取的单菌落中,各有 13 个显示为阳性克隆,如图 4-b (泳道 2 ~14)、图 4-c (泳道 1 ~10,12 ~14) 所示。从其中各随机选择 5 个阳性菌落进行摇菌后测序,测序结果与已知基因序列一致,说明该载体阳性选择率较高。

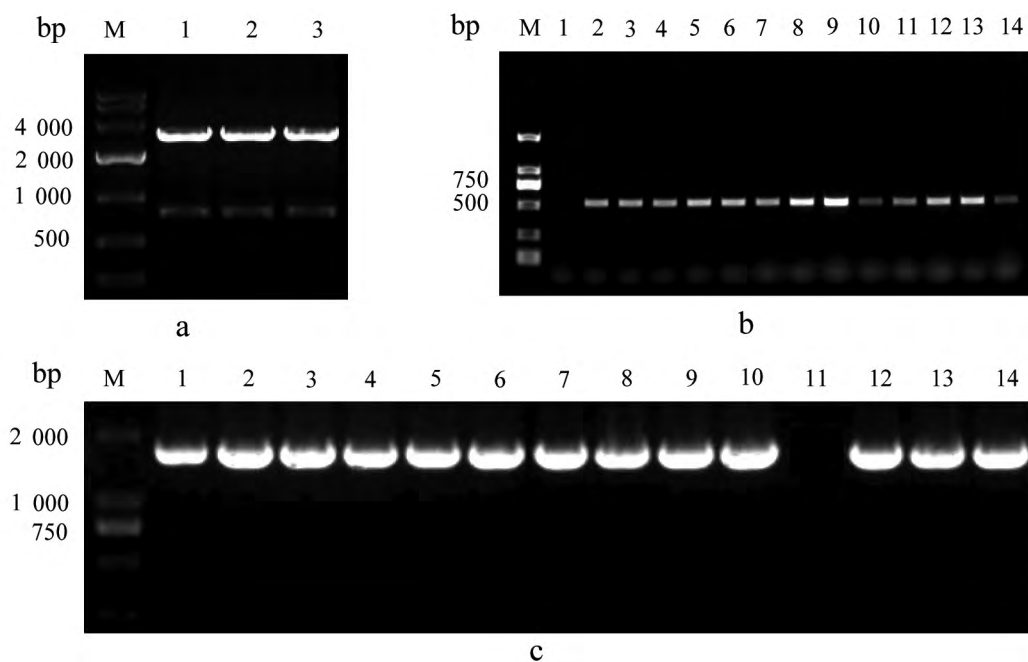


图 4 pXCT 的酶切鉴定以及克隆效率验证

(a) 1~3: pXCT 经 *Xcm* I 酶切验证 Marker: DL10000; (b) 1~14: 重组质粒 pXCT 连对照基因阳性克隆检测 Marker: DL1000; (c) 1~14: 重组质粒 pXCT 连目的基因阳性克隆检测 Marker: DL2000

Fig. 4 Enzyme digestion (a) and the cloning test (b) (c) of pXCT

(a) 1-3: Enzyme digestion of pXCT, Marker: DL10000; (b) 1-14: Cloning test of pXCT with control DNA, Marker: DL1000; (c) 1-14: Cloning test of pXCT with target DNA, Marker: DL2000

3 讨论

T-A 克隆因其操作简单、连接高效等特点被广泛应用于实验室分子克隆中。然而, T-A 克隆中用到的商业 T-载体存在着价格昂贵, 产品质量不一且只能一次性使用等弊端^[9]。需要进行大批量分子克隆时, 如果实验室能够在有限的条件下, 制备出成本低廉, 高效克隆且可永久保存的 T-载体, 将会是一种极大的便利。

ccdB 基因最早由 Philippe^[8] 等人引入载体中, 通过 *ccdB* 和 PUC18/PUC19 多克隆位点的融合, 构建出 pKIL18/19 重组质粒。外源片段的插入会破坏 *ccdB* 的正常表达, 不耐受 *ccdB* 毒蛋白的细菌得以正常生长, 反之则无法生长。HuLL^[10] 利用 *ccdB* 本身含有的 *Sma* I 位点, 对其进行非翻译突变, 在 *ccdB* 基因中引入 1 个 *EcoR* V 位点, 载体被其中任何 1 个限制性内切酶切开都会得到一个平末端的载体, 该载体可直接用于连接平末端的 PCR 产物。在分子克隆中, 平末端片段的连接比黏性末端片段连接在操作上更繁琐, 连接效率更低, 而 T 载体因其独特的连接方式, 克服了这些不足。

为了降低载体自连, 提高阳性克隆筛选效率, 笔者利用 *Xcm* I 独特的碱基识别内切特性, 结合 *ccdB* 毒性蛋白的致死能力, 制备出新型 T-载体 pXCT (图 1)。该载体在插入 *ccdB* 基因后, 在 DH5 α 和 DB3.1 两种菌株的致死差异明显 (图 3), 进一步实验证明 *ccdB* 的表达并不直接需要 IPTG 的诱导, 其在菌株中, 仅仅是本底表达, 致死效果已十分明显 (图 3), 此方法将简化克隆过程中的部分步骤。经过 *Xcm* I 酶切后制备出来的线性 T-载体 pXCT-X 在连接能力上表现优越, 阳性克隆比例高 (图 4), 并不逊色于商业 T 载体。

pMD[®] 19-T Simple Vector 具有在宿主细胞中高拷贝复制的能力,且其本身不含任何酶切位点,当克隆含有限制酶酶切位点的基因片段时,后期的酶切验证简单、可靠,为下游的亚克隆等实验提供了便利。pXCT 在整合以上所有优点的基础上,又增加了 *ccdB* 毒性蛋白的筛选标记,并且保留了原有载体上的测序序列,为克隆片段的测序提供了方便。因此, pXCT 是 1 种新型的高效低背景 T-载体,并且在载体构建过程中使用的都是常规药品,技术简单、成本低廉,后期效果显著,具备推广意义。

参考文献:

- [1] Ichihara Y, Kurosa Wa Y. Construction of new T vectors for direct cloning of PCR products[J]. *Gene*, 1993, 130 (1): 153 – 154.
- [2] Holton T, Graham M. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors[J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(5): 1156.
- [3] Aranishi F, Okimoto T. Engineered *Xcm*I cassette-containing vector for PCR-based phylogenetic analyses[J]. *Journal of Genetics*, 2004, 83(1): 33 – 34.
- [4] Mead D A, Pey N K, HERMSTADT C, et al. A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid[J]. *Nature Biotechnology*, 1991, 9(7): 657 – 663.
- [5] Mruk I, Kobayashi I. To be or not to be: regulation of restriction – modification systems and other toxin – antitoxin systems[J]. *Nucleic acids research*, 2013, 42(1): 70 – 86.
- [6] Ogura T, Hiraga S. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1983, 80(15): 4784 – 4788.
- [7] Bernard P, Couturier M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA – topoisomerase II complexes[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1992, 226(3): 735 – 745.
- [8] Bernard P, Gabarit P, Bahassie M, et al. Positive-selection vectors using the F plasmid *ccdB* killer gene[J]. *Gene*, 1994, 148(1): 71 – 74.
- [9] Zhou M Y, Celso G S. Universal TA cloning[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2000, 2(1): 1 – 7.
- [10] Hu L L, Zhang S S, Li X X, et al. The use of the *ccdB* lethal gene for constructing a zero background vector in order to clone blunt-end PCR Products[J]. *Molecular Biology*, 2010, 44(1): 161 – 164.

Construction of T-Vector with High Efficiency and Low Background based on the *ccdB* Killer Gene

GENG Xiaoshan¹, LIU Qin¹, DANG Huijie², WU Junzheng², LUO Lijuan¹

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;

2. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: A simple and effective method for construction of the T-vector with high efficiency and low background was developed under the universal conditions in laboratory for improving the efficiency of PCR products cloning. The *ccdB* gene fragment containing restriction enzyme cleavage site was inserted as a medium DNA to the vector backbone pMD19-T Simple. The recombinant plasmid was confirmed by PCR identification, digestion pattern and sequencing, and the recombinant plasmid can then produce a liner T-vector by *Xcm* I restriction enzyme digestion. This T-vector reduced the background interference of vector self-ligation, and improved the efficiency of T-A cloning with high positive cloning rate. The vector had not only high efficiency and low background but also many advantages of pMD19-T Simple vector, and its preparation was quite simple and convenient for molecular cloning.

Keywords: high efficiency; low background; *ccdB* gene; pMD19-T Simple Vector; T-vector