DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.05.059
第23卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 5
608 2001年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2001

技术方法

文章编号:1000-5404(2001)05-0608-03

利用人工合成 *Xcm* Ⅰ 接头盒构建 T-载体

Construction of T-vector by using synthesized linker containing *Xcm* Ⅰ restriction site

胡晓梅,胡福泉,饶贤才,张光明,张克斌,金晓琳,刘启富 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 采用人工法合成 *Xcm* Ⅰ 接头盒,进而构建T-载体。方法 用人工方法合成含 *Xcm* Ⅰ 酶切位点的寡核苷酸接头,将其插入 pBluescript SK Ⅱ(+)质粒的 *EcoR* Ⅴ位点,以 *Xcm* Ⅰ 消化含接头的质粒即构建成T-载体。利用PCR反应扩增PEA全长结构基因,直接克隆入T-载体以验证所构建T-载体的可用性。结果 限制性酶切分析、DNA序列测定及PEA基因的克隆等均证实T-载体的构建成功。结论 所构建的T-载体可有效用于直接克隆PCR产物。

T-载体是近年发展起来的一种用于直接克隆PCR产物的新载体,其分子末端有一个悬挂的脱氧胸苷(dT),可与PCR产物末端的dA配对,从而可方便地将PCR产物直接克隆到载体上去。目前国内使用的T-载体多为进口试剂盒,尚未见国产化商品,且目前市售T-载体分子多采用酶学方法在载体分子末端加上悬垂dT,从制备方法上讲,不能确保每个分子末端都加上dT,且仅加1个dT。本实验采用人工合成 *Xcm* Ⅰ 接头盒法制备T-载体,更能保证所制备T-载体分子的均质性及高质量。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

绿脓杆菌PA103株为国际标准产毒株,质粒载体pSK Ⅱ(+)和宿主菌JM109、DH10B为本室保存;质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、T_4DNA连接酶等购自BM公司;双链DNA测序试剂盒购自Gibco公司;限制性内切酶 *Xcm* Ⅰ 购自Amersham公司,*Bgl* Ⅱ购自Promega公司,*EcoR* Ⅴ购自BM公司,*BamH* Ⅰ 购自MBI公司;鲑鱼精DNA购自华美公司。

1.2 *Xcm* Ⅰ 接头盒的设计与合成

设计合成两条内含 *Xcm* Ⅰ 及 *Bgl* Ⅱ酶切位点的脱氧寡核苷酸链(PAGE纯化),其序列为:Ⅰ:5'-CCC CCA GGC GTA CCA TGG AGA TCT CCA CGG TAA CCC TGG GGG-3';Ⅱ:5'-CCC CCA GGG TTA CCG TGG AGA TCT CCA TGG TAC GCC TGG GGG-3'。由上海生工生物工程公司合成。

1.3 T-载体的构建

参照文献[1]进行。

1.3.1 复性生成接头盒 将两条寡核苷酸链分别溶于灭菌去离子水中,各取1 μg于100 ℃煮沸5 min,缓慢冷却至室温,复性成为双链DNA。生成的接头盒见图1。

1.3.2 接头盒与pSK Ⅱ(+)的连接 将pSK Ⅱ(+)质粒DNA用 *EcoR* Ⅴ酶切,与接头盒进行平端连接,转化入 *E. coli* JM109后经氨苄青霉素筛选。随机挑选具氨苄青抗性的菌落制备质粒DNA,用 *Bgl* Ⅱ酶切鉴定,得到含有接头盒的重组质粒,定名为pES。DNA序列利用双链DNA循环测序试剂盒进行分析。

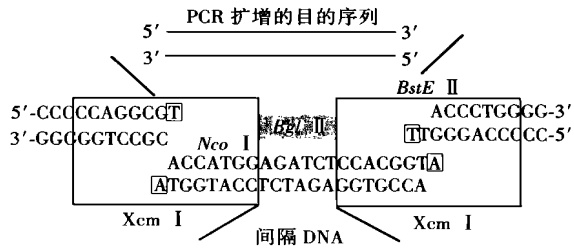


图1 用于构建T-载体的寡核苷酸接头盒的分子设计

1.3.3 在接头盒中插入间隔DNA 将鲑鱼精DNA用 *Bgl* Ⅱ及 *Xcm* Ⅰ 分别消化、纯化,与经 *Bgl* Ⅱ酶切的pES DNA进行连接,转化入 *E. coli* DH10B后经氨苄青霉素及α-互补筛选,随机挑取具氨苄青抗性的白色菌落制备质粒DNA,选择一个插入的间隔DNA约为2 000 bp的质粒备用。

1.3.4 线性化T-载体DNA的制备 将步骤1.3.3中筛选到的含重组质粒的细菌扩大培养,制备质粒DNA。用 *Xcm* Ⅰ 消化质粒DNA,于1%琼脂糖凝胶上电泳分离,用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒纯化两个 *Xcm* Ⅰ 位点都被切开的载体DNA即为线性化T-载体。

1.4 PA103菌株染色体DNA的制备

绿脓杆菌染色体DNA的提取按常规方法进行。

1.5 PCR扩增

参照Gray等[2]公布的序列设计1对分别位于PEA结构基因两侧的引物,上游引物:5'-GAT CAG CCT CAT CCT TCA C-3';下游引物:5'-GGT CGC GGC AGT TAC TT-3'。由上海生工生物工程公司合成。拟扩增目的基因全长为1 966 bp。PCR扩增反应体系中需加入甘油和二甲基亚砜。PCR扩增程序为:94 ℃ 4 min预变性;94 ℃ 1 min,58 ℃ 1 min,72 ℃ 3 min,30个循环;72 ℃延伸30 min。PCR产物在1%琼脂糖凝胶中电泳观察结果。扩增片段用 *BamH* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ分别酶切鉴定。

作者简介:胡晓梅(1970-),女,四川省岳池县人,硕士,讲师,主要从事细菌致病机制及分子生物学方面的研究。电话:(023)68752239

收稿日期:2000-07-17;修回日期:2000-11-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.6　连接与转化

纯化的 PCR 扩增产物与自行构建的 T-载体(摩尔比3∶1)于 16 ℃连接 16 h, 转化入 *E. coli* DH10B。同时将纯化的 PCR 扩增产物与生工公司生产的 T-载体以相同条件进行连接与转化作为对照。

1.7　阳性克隆的鉴定

经氨苄青霉素及α-互补筛选, 挑取具有氨苄青抗性的白色菌落制备质粒 DNA, 选择大小约 5 000 bp 的质粒分别用 *BamH* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ进行酶切鉴定。并通过自动测序仪对重组质粒进行序列分析。

2　结果

2.1　接头盒与 pSK Ⅱ(+)连接的结果

随机挑选 8 株具氨苄青抗性的菌落, 制备质粒 DNA, 用 *Bgl* Ⅱ酶切鉴定, 获得 4 个含有接头盒的重组质粒。取其中一个重组质粒, 以 pSK Ⅱ(+)质粒的反向引物(Reverse primer)作为测序引物进行序列分析证实接头盒已连入 pSK 质粒, 定名为 pES。

2.2　间隔 DNA 的插入

将鲑鱼精 DNA 与 pES 质粒连接后, 筛选到一个插入 DNA 约为2 000 bp 的质粒, 定名为 pSKT。经 *Xcm* Ⅰ 及 *Bgl* Ⅱ分别酶切后, 可见 2 kb 的间隔 DNA 和 3 kb 的质粒, 见图 2, 表明两个 *Xcm* Ⅰ 位点都被切开, 即双链载体分子的两个 3′ 端都有悬垂 T 存在。

2.3　T-载体的制备

有间隔 DNA 插入的质粒经 *Xcm* Ⅰ 酶切后, 从凝胶中回收 3 kb 的 DNA 条带即为 T-载体。

2.4　PA103 染色体 DNA 的制备及 PEA 结构基因的获得

提取到 PA103 染色体 DNA。PCR 扩增获得 1 966 bp 的单一片段。用 *BamH* Ⅰ 酶切 PCR 扩增片段后得到 58 bp, 378 bp 和 1 530 bp 3 个片段, *Bgl* Ⅱ酶切后得到 782 bp 和 1 184 bp 片段, 符合已知的 PEA 结构基因的限制性酶切图谱, 初步证明扩增得到的 1 966 bp 的片段是 PEA 的结构基因, 见图 3。

2.5　用所构建 T-载体克隆 PEA 结构基因

扩增的 PEA 结构基因与构建的 T-载体连接后, 筛选到 2 个分子量约为 5 000 bp 的质粒, 用 *BamH* Ⅰ 酶切鉴定, 可切出 1 530 bp 的片段(图 4 第 2 泳道), 用 *Bgl* Ⅱ酶切可线性化(图 4 第 3 泳道), 说明 PEA 结构基因已克隆于 T-载体中, 将重组质粒定名为 pSKT/ PEA。取重组质粒, 以 PCR 引物作为测序引物进行自动测序分析, 得到了克隆片段前 710 bp 的 DNA 序列, 与 Gray 等[2] 发表的序列一致。

2.6　克隆效果的比较

在利用构建T-载体进行 AT 克隆的转化平板中, 有 8 个白色菌落生长, 经提取质粒鉴定后, 获得 2 个阳性克隆, 阳性率为 25%。在生工公司生产的 T-载体进行 AT 克隆的转化平板中, 有 10 个白色菌落生长, 经提取质粒鉴定后, 获得 2 个阳性克隆, 阳性率为 20%。显示自行构建的 T-载体与市售T-载体克隆效果相当, 可用于 PCR 产物的直接克隆。

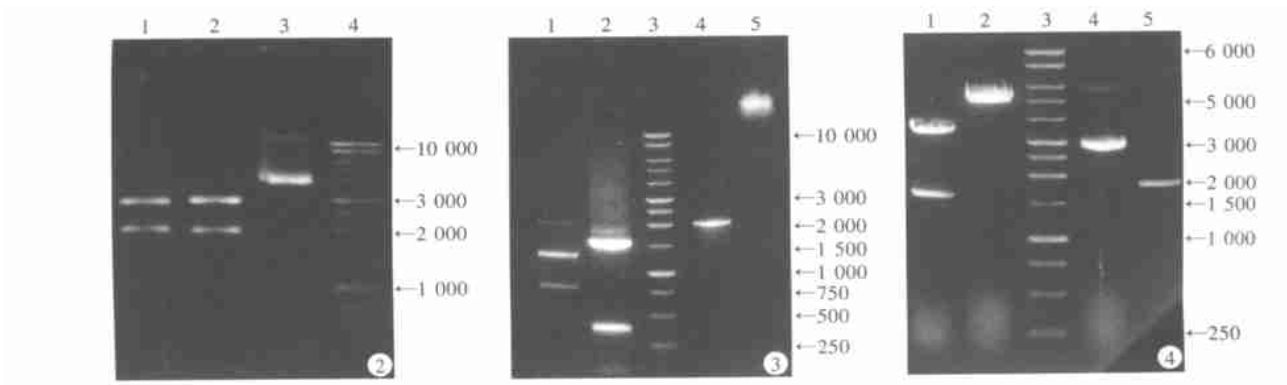


图 **2**　重组质粒 **pSKT** 的酶切图谱

1: pSKT 经 *Bgl* Ⅱ酶切; 2: pSKT 经 *Xcm* Ⅰ 酶切; 3: 重组质粒 pSKT; 4: 1 kb DNA Marker

图 **3**　**PCR** 产物及其酶切图谱

1: PCR 产物经 *Bgl* Ⅱ酶切; 2: PCR 产物经 *BamH* Ⅰ 酶切; 3: 1 kb DNA Marker; 4: PCR 产物; 5: PA 103 染色体 DNA

图 **4**　重组质粒 **pSKT/ PEA** 的酶切图谱

1: pSKT/ PEA 经 *BamH* Ⅰ 酶切; 2: pSKT/ PEA 经 *Bgl* Ⅱ酶切; 3: 1 kb DNA Marker; 4: 重组质粒 pSKT/ PEA; 5: 阴性克隆

3　讨论

PCR 是分子生物学研究中用于扩增目的基因的一种常用技术, PCR 中最常用的酶是 Taq DNA 聚合酶。由于 Taq DNA 聚合酶的固有特性, 它所催化合成的产物的 3′ 末端常带有一个非模板依赖的脱氧腺苷(dA), 从而使得 PCR 产物不能直接克隆到载体上去。克隆 PCR 产物常采用平端连接或粘端连接的方法将 PCR 产物连接到克隆载体上, 但前者连接效率极低, 易形成串联拷贝; 后者需合成含酶切位点的引物, 费时, 费事, 且增加了费用。采用 T-载体则可直接克隆 PCR 产物, 不仅克服了常规克隆方法的缺点, 而且操作简便、方法快捷、连接效率高, 在国内外的应用日益广泛, 但目前市售 T-载体多为进口试剂盒。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

常用制备 T-载体的方法有两种:(1)将载体用平端内切酶切出平端,在缺乏 dATP 及存在过量 dTTP 的情况下,用 Taq DNA 聚合酶催化,在 3' 末端加上 dT[3]。(2)用脱氧核苷酸末端转移酶(TDT)在线性化载体的 3' 末端加上双脱氧胸腺嘧啶核苷酸(ddTTP)[4]。这两种方法存在明显缺点:一是不能保证 100%的载体分子末端都能加上 dT,二是难以控制加上去的正好是 1 个 dT。本研究根据文献报道采用 *Xcm* Ⅰ 接头盒构建 T-载体,有以下明显的优越性:(1)通过构建重组质粒,转化宿主菌,纯化质粒,*Xcm* Ⅰ 酶切获得 T-载体分子,制备十分快捷、成本低、且可大量获得、易于商品化。(2)"间隔 DNA"的插入作为制备 T-载体分子的质量控制指标:只需电泳显示间隔 DNA 片段已切出来,即表明载体分子两端都具有悬垂 dT,而且只有 1 个 dT,这保证了所制备 T-载体分子的质量。(3)pSK Ⅱ(+)载体是一个功能性很强的载体,它的多克隆位点上含有较多的限制性酶切位点,而且它在大肠杆菌中具有很高的拷贝数,易于分离制备,故而本研究选用 pSK Ⅱ(+)作为构建 T-载体的基础载体。所构建 T-载体保留了原载体的一切功能:①可用于直接克隆 PCR 扩增产物。同时,由于接头盒插在 pSK 多克隆位点的 *EcoR* Ⅴ位置,其插入使得原多克隆位点仅仅丢失了 *EcoR* Ⅴ酶切位点,因此可以方便地利用接头盒两侧的酶切位点对插入片段进行亚克隆。②插入的接头盒含 42 个碱基,为 3 的整数倍,从而保留了原载体的兰/白菌落筛选功能。③利用 T3 或 T7 启动子可通过试管内转录(*In vitro* transcription)制备 RNA,利用丝状噬菌体复制原点可以制备供测序用的单链 DNA。④有学者采用不同的 PCR 产物来检测其可用性,数据显示其连接效率为常规方法的 3~5 倍,并能成功地用于长度为数百至数千 bp 的 PCR 产物的直接克隆[1,5,6]。

关键词:T-载体;构建;*Xcm* Ⅰ;PCR
中图法分类号:R394-33 文献标识码:B

参考文献:

[1] Testori A, Listowsky I, Sollitti P. Direct cloning of unmodified PCR products by exploiting an engineered restriction site[J]. Gene, 1994, 143(1): 151—152.
[2] Gray G L, Smith D H, Baldridge J S, *et al*. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the exotoxin A structural gene of *pseudomonas aeruginosa*[J]. Proc Natl Acad Sci, 1984, 81(9): 2 645—2 649.
[3] Marchuk D. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 19(5): 1 154—1 155.
[4] Holton T A, Graham M W. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 19(5): 1 156.
[5] Ichihara Y, Kurosawa Y. Construction of new T-vectors for direct cloning of PCR products[J]. Gene, 1993, 130(1): 153—154.
[6] Cha J, Bishai W, Chandrasegaran S. New vectors for direct cloning of PCR products[J]. Gene, 1993, 136(S1-2): 369—370.

(编辑 潘式文)

技术方法

文章编号:1000-5404(2001)05-0610-02

建立大白鼠视皮层脑片膜片钳全细胞记录技术

Establishment of patch-clamp whole-cell recording technique in rat visual cortex

涂娅莉[1],闵正勤[1],刘应兵[2] ([1] 第三军医大学附属西南医院眼科,重庆 400038;[2] 华西医科大学生理学教研室,成都 610041)

提 要:目的 建立大白鼠视皮层脑片膜片钳全细胞记录技术。方法 利用盲法获得膜片记录,即根据电极进入溶液中到获得全细胞膜片的过程中,测试方波脉冲的变化来寻找细胞。结果 能成功地进行视皮层全细胞记录。结论 本法操作简便,所需仪器简单,易于推广应用。

由于中枢神经系统的网络特性,并由此产生的极为复杂的调控功能,脑片膜片钳法逐渐由对单个分离细胞的研究转为在具有简单网络系统的脑片(Brain slice)上进行。目前,视皮层脑片膜片钳全细胞记录技术已成为当今国际上视觉系统电生理研究的主要技术之一,但在我国尚未广泛开展,仅为极少数实验室所采用。由于视皮层细胞对缺氧更为敏感,神经元较小,分布较稀疏,进行全细胞记录的难度比海马回等皮层下结构大。为此,我们结合国内研究实际情况和在实验工作中的体会,建立了视皮层脑片膜片钳技术,并使其易于推广应用。

作者简介:涂娅莉(1972—),女,重庆市人,硕士,医师。电话:(023)68754000-73097
收稿日期:2000-12-20;修回日期:2001-03-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net