

# 重组质粒的连接、转化及筛选

## 概述

质粒具有稳定可靠和操作简便的优点。如果要克隆较小的 DNA 片段(< 10kb)且结构简单,质粒要比其它任何载体都要好。在质粒载体上进行克隆,从原理上说是很简单的,先用限制性内切酶切割质粒 DNA 和目的 DNA 片段,然后体外使两者相连接,再用所得到重组质粒转化细菌,即可完成。但在实际工作中,如何区分插入有外源 DNA 的重组质粒和无插入而自身环化的载体分子是较为困难的。通过调整连接反应中外源 DNA 片段和载体 DNA 的浓度比例,可以将载体的自身环化限制在一定程度之下,也可以进一步采取一些特殊的克隆策略,如载体去磷酸化等来最大限度的降低载体的自身环化,还可以利用遗传学手段如  $\alpha$  互补现象等来鉴别重组子和非重组子。

外源 DNA 片段和质粒载体的连接反应策略有以下几种:

1、带有非互补突出端的片段 用两种不同的限制性内切酶进行消化可以产生带有非互补的粘性末端,这也是最容易克隆的 DNA 片段,一般情况下,常用质粒载体均带有多个不同限制酶的识别序列组成的多克隆位点,因而几乎总能找到与外源 DNA 片段末端匹配的限制酶切位点的载体,从而将外源片段定向地克隆到载体上。也可在 PCR 扩增时,在 DNA 片段两端人为加上不同酶切位点以便与载体相连。

2、带有相同的粘性末端 用相同的酶或同尾酶处理可得到这样的末端。由于质粒载体也必须用同一种酶消化,亦得到同样的两个相同粘性末端,因此在连接反应中外源片段和质粒载体 DNA 均可能发生自身环化或几个分子串连形成寡聚物,而且正反两种连接方向都可能。所以,必须仔细调整连接反应中两种 DNA 的浓度,以便使正确的连接产物的数量达到最高水平。还可将载体 DNA 的 5'磷酸基团用碱性磷酸酯酶去掉,最大限度地抑制质粒

DNA 的自身环化。带 5'端磷酸的外源 DNA 片段可以有效地与去磷酸化的载体相连, 产生一个带有两个缺口的开环分子,在转入 E. coli 受体菌后的扩增过程中缺口可自动修复。

3、带有平末端 是由产生平末端的限制酶或核酸外切酶消化产生, 或由 DNA 聚合酶补平所致。由于平端的连接效率比粘性末端要低得多, 故在其连接反应中, T4 DNA 连接酶的浓度和外源 DNA 及载体 DNA 浓度均要高得多。通常还需加入低浓度的聚乙二醇(PEG 8000)以促进 DNA 分子凝聚成聚集体的物质以提高转化效率。

特殊情况下, 外源 DNA 分子的末端与所用的载体末端无法相互匹配,则可以在线状质粒载体末端或外源 DNA 片段末端接上合适的接头(linker)或衔接头(adapter)使其匹配, 也可以有控制的使用 E. coli DNA 聚合酶 I 的 klenow 大片段部分填平 3'凹端,使不相匹配的末端转变为互补末端或转为平末端后再进行连接。

本实验所使用的载体质粒 DNA 为 pBS,转化受体菌为 E. coli DH5 $\alpha$  菌株。由于 pBS 上带有 Amp<sup>r</sup> 和 lacZ 基因,故重组子的筛选采用 Amp 抗性筛选与  $\alpha$ -互补现象筛选相结合的方法。

因 pBS 带有 Amp<sup>r</sup> 基因而外源片段上不带该基因,故转化受体菌后只有带有 pBS DNA 的转化子才能在含有 Amp 的 LB 平板上存活下来;而只带有自身环化的外源片段的转化子则不能存活。此为初步的抗性筛选。

pBS 上带有  $\beta$ -半乳糖苷酶基因(lacZ)的调控序列和  $\beta$ -半乳糖苷酶 N 端 146 个氨基酸的编码序列。这个编码区中插入了一个多克隆位点,但并没有破坏 lacZ 的阅读框架,不影响其正常功能。E. coli DH5 $\alpha$  菌株带有  $\beta$ -半乳糖苷酶 C 端部分序列的编码信息。在各自独立的情况下,pBS 和 DH5 $\alpha$  编码的  $\beta$ -半乳糖苷酶的片段都没有酶活性。但在 pBS 和 DH5 $\alpha$  融为一体时可形成具有酶活性的蛋白质。这种 lacZ 基因上缺失近操纵基因区段的突变体与带有完整的近操纵基因区段的  $\beta$ -半乳糖苷酶阴性突变体之间实现互补的现象叫  $\alpha$ -互补。由  $\alpha$ -互补

产生的 Lac<sup>+</sup> 细菌较易识别, 它在生色底物 X-gal(5-溴-4 氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷)下存在下被 IPTG(异丙基硫代-β-D-半乳糖苷)诱导形成蓝色菌落。当外源片段插入到 pBS 质粒的多克隆位点上后会导致读码框架改变, 表达蛋白失活, 产生的氨基酸片段失去 α-互补能力, 因此在同样条件下含重组质粒的转化子在生色诱导培养基上只能形成白色菌落。在麦康凯培养基上, α-互补产生的 Lac<sup>+</sup>细菌由于含 β-半乳糖苷酶, 能分解麦康凯培养基中的乳糖, 产生乳酸, 使 pH 下降, 因而产生红色菌落, 而当外源片段插入后, 失去 α-互补能力, 因而不产生 β-半乳糖苷酶, 无法分解培养基中的乳糖, 菌落呈白色。由此可将重组质粒与自身环化的载体 DNA 分开。此为 α-互补现象筛选。

## 材料、设备及试剂

### 一、 材料

外源 DNA 片段: 自行制备的带限制性末端的 DNA 溶液,浓度已知; 载体 DNA: pBS 质粒(Amp<sup>r</sup>, lacZ),自行提取纯化,浓度已知; 宿主菌: E. coli DH5α,或 JM 系列等具有 α-互补能力的菌株。

### 二、 设备

恒温摇床, 台式高速离心机, 恒温水浴锅, 琼脂糖凝胶电泳装置, 电热恒温培养箱, 电泳仪无菌, 工作台, 微量移液枪, eppendorf 管。

### 三、 试剂

1、连接反应缓冲液(10×): 0.5mol/L Tris-Cl (pH7.6), 100mol/L MgCl<sub>2</sub>, 100mol/L 二硫苏糖醇(DTT)(过滤灭菌), 500μg/ml 牛血清清蛋白(组分 V.Sigma 产品) (可用可不用), 10mol/L ATP (过滤灭菌)。

2、T4 DNA 连接酶(T4 DNA ligase); 购买成品。

3、X-gal 储液(20mg/ml): 用二甲基甲酰胺溶解 X-gal 配制成 20mg/ml 的储液, 包以铝箔或黑纸以防止受光照被破坏, 储存于-20℃。

4、IPTG 储液(200mg/ml): 在 800μl 蒸馏水中溶解 200mg IPTG 后,用蒸馏水定容至 1ml,用 0.22μm 滤膜过滤除菌, 分装于 eppendorf 管并储于-20℃。

5、麦康凯选择性培养基(Macconkey Agar): 取 52g 麦康凯琼脂加蒸馏水 1000ml, 微火煮沸至完全溶解, 高压灭菌, 待冷至 60℃左右加入 Amp 储存液使终浓度为 50mg/ml, 然后摇匀后涂板。

6、含 X-gal 和 IPTG 的筛选培养基: 在事先制备好的含 50μg/ml Amp 的 LB 平板表面加 40ml X-gal 储液和 4μl IPTG 储液,用无菌玻棒将溶液涂匀,置于 37℃下放置 3-4 小时, 使培养基表面的液体完全被吸收。

7、[感受态细胞](#)制备试剂

8、煮沸法快速分离质粒试剂

9、质粒酶及电泳试剂

## 操作步骤

### 一、 连接反应

1、取新的经灭菌处理的 0.5ml eppendorf 管, 编号。

2、将 0.1μg 载体 DNA 转移到无菌[离心管](#)中, 加等摩尔量(可稍多)的外源 DNA 片段。

3、加蒸馏水至体积为 8μl,于 45℃保温 5 分钟,以使重新退火的粘端解链。将混和物冷却至 0℃。

4、加入 10×T4 DNA ligase buffer 1μl, T4 DNA ligase 0.5μl, 混匀后用微量离心机将液体全部甩到管底,于 16℃保温 8-24 小时。

同时做二组对照反应，其中对照组一只有质粒载体无外源 DNA；对照组二只有外源 DNA 片段没有质粒载体。

## 二、 E. coli DH5 $\alpha$ 感受态细胞的制备及转化

每组连接反应混和物各取 2 $\mu$ l 转化 E. coli DH5 $\alpha$  感受态细胞。具体方法见第三章。

## 三、 重组质粒的筛选

1、 每组连接反应转化原液取 100 $\mu$ l 用无菌玻棒均匀涂布于筛选培养基上,37 $^{\circ}$ C下培养半小时以上,直至液体被完全吸收。

2、 倒置平板于 37 $^{\circ}$ C继续培养 12-16 小时,待出现明显而又未相互重叠的单菌落时拿出平板。

3、 放于 4 $^{\circ}$ C数小时,使显色完全（此步麦康凯培养基不做）。

不带有 pBS 质粒 DNA 的细胞,由于无 Amp 抗性,不能在含有 Amp 的筛选培养基上成活。带有 pBS 载体的转化子由于具有  $\beta$ -半乳糖苷酶活性,在麦康凯筛选培养基上呈现为红色菌落。在 X-gal 和 IPTG 培养基上为蓝色菌落。带有重组质粒转化子由于丧失了  $\beta$ -半乳糖苷酶活性,在麦康凯选择性培养基和 x-gal 和 IPTG 培养基上均为白色菌落。

## 四、 酶切鉴定重组质粒

用无菌牙签挑取白色单菌落接种于含 Amp 50 $\mu$ g/ml 的 5ml LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C下振荡培养 12 小时。使用煮沸法快速分离质粒 DNA 直接电泳，同时以煮沸法抽提的 pBS 质粒做对照，有插入片段的重组质粒电泳时迁移率较 pBS 慢。再用与连接末端相对应的限制性内切酶进一步进行酶切检验。还可用杂交法筛选重组质粒。

[注意]

1、 DNA 连接酶用量与 DNA 片段的性质有关，连接平齐末端，必须加大酶量，一般使用连接粘性末端酶量的 10-100 倍。

2、在连接带有粘性末端的 DNA 片段时，DNA 浓度一般为 2-10mg/ml，在连接平齐末端时，需加入 DNA 浓度至 100-200mg/ml。

3、连接反应后，反应液在 0℃储存数天，-80℃储存 2 个月，但是在-20℃冰冻保存将会降低转化效率。

4、粘性末端形成的氢键在低温下更加稳定，所以尽管 T4 DNA 连接酶的最适反应温度为 37℃，在连接粘性末端时，反应温度以 10-16℃为好，平齐末端则以 15-20℃为好。

5、在连接反应中，如不对载体分子进行去 5'磷酸基处理，使用过量的外源 DNA 片段 (2-5 倍)，这将有助于减少载体的自身环化，增加外源 DNA 和载体连接的机会。

6、麦康凯选择性琼脂组成的平板，在含有适当抗生素时，携有载体 DNA 的转化子为淡红色菌落，而携有带插入片段的重组质粒转化子为白色菌落。该产品筛选效果同蓝白斑筛选，且价格低廉。但需及时挑取白色菌落，当培养时间延长，白色菌落会逐渐变成微红色，影响挑选。

7、X-gal 是 5-溴-4-氯-3-吲哚-b-D-半乳糖 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside)以半乳糖苷酶 (b-galactosidase)水解后生成的吲哚衍生物显蓝色。IPTG 是异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropylthiogalactoside)，为非生理性的诱导物，它可以诱导 lacZ 的表达。

8、在含有 X-gal 和 IPTG 的筛选培养基上，携带载体 DNA 的转化子为蓝色菌落，而携带插入片段的重组质粒转化子为白色菌落，平板如在 37℃培养后放于冰箱 3-4 小时可使显色反应充分，蓝色菌落明显。