

王亚男,黄培华,樊宝良.一种高通量快速鉴定重组子方法的建立[J].江苏农业科学,2014,42(5):65-66.

一种高通量快速鉴定重组子方法的建立

王亚男¹,黄培华³,樊宝良^{1,2}

(1.河北农业大学动物科技学院,河北保定 071000; 2.河北工程大学农学院,河北邯郸 056038;

3.河北工程大学教育技术中心,河北邯郸 056038)

摘要:利用添加了 RNaseA 的 1X cracking buffer 直接裂解细菌增强观测效果,排除 RNA 干扰,通过琼脂糖凝胶电泳与空载体质粒进行比较,建立一种高通量快速鉴定重组子的方法。该方法方便易行,大大提高了工作效率。

关键词:cracking buffer;直接裂解;RNaseA;重组子鉴定;克隆鉴定;优化方法

中图分类号: Q784 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0065-02

在分子生物学研究中,筛选阳性重组质粒 DNA 是非常重要的步骤之一,由于受连接效率、转化效率等多种因素的制约,筛选阳性重组子成为一项十分繁琐复杂的工作。蓝白斑筛选(Lac Z 的 a 互补)通过颜色反应区分阴阳性克隆,出现假阳性概率较高;PCR 法鉴定重组克隆^[1]需事先设计相应引物,限制性内切酶酶切鉴定法^[2]需提取质粒 DNA,反应所需材料成本较高,需要时间长。近几年人们建立了一些快速鉴定重组质粒的方法,但有的需要使用苯酚/氯仿/异戊醇(体积比25:24:1)^[3]等毒性较高的材料,有的裂解缓冲液成分复杂^[4-5],有的需要昂贵的试剂盒^[6],而利用 1% SDS 一步裂解法^[7]获取质粒 DNA 的方法则需要较长的摇菌或培养转化平板的时间。笔者在科研实践中不断地总结了很多筛选方

法,从传统的碱裂解质粒 DNA 的原理出发,逐步建立了一种更为简捷快速且成本低廉的重组子鉴定方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒和菌株 大肠埃希菌 JM109 和 T-simple 载体以及转化平板由笔者所在实验室保存提供。克隆片段为 560 bp 的猪 2 型圆环病毒核衣壳蛋白基因部分片段,由笔者所在实验室扩增得到。

1.1.2 试剂 1X cracking buffer(1.0 mol/L NaOH,0.5 mol/L EDTA,1% SDS)为自行配置,RNaseA(10 mg/mL),氨苄青霉素(100 mg/mL)。Tris 碱、EDTA 和冰乙酸等试剂购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.1.3 培养基 LB 液体培养基:10 g 胰蛋白胨,5 g 酵母提取物,10 g NaCl,1 000 mL 蒸馏水,高压灭菌。LB 固体培养基:15 g 琼脂糖,1 000 mL LB 液体培养基,高压灭菌(配制培养基所用试剂购自上海生工生物工程技术有限公司)。

收稿日期:2013-09-18

基金项目:国家转基因重大专项(编号:2013ZX08006-005)。

作者简介:王亚男(1987—),女,河北承德人,硕士研究生,主要从事动物遗传育种与繁殖方面的研究。E-mail:sxdc1987@sina.cn。

通信作者:樊宝良。E-mail:fanbl119@sina.vip.com。

yellow disease and their relationship with potex- and carlaviruses [J]. Journal of General Virology,1994,75(7):1535-1542.

[2] Kundu J K. The application of RT-PCR assay for the detection of apple stem pitting virus and apple stem grooving virus in four apple cultivars[J]. Plant Protection Science,2002,38(1):13-17.

[3] 刘福昌,王焕玉. 苹果潜隐病毒(Latent virus)研究 II. 苹果品种和矮生砧木潜隐病毒鉴定[J]. 植物病理学报,1989,19(4):193-197.

[4] 侯义龙. 果树主要病毒 RT-PCR 检测体系的建立、优化及病毒特异 DNA 片段克隆测序研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2000:5-60.

[5] Nemchinov L, Hadidi A, Faggioli F. PCR-detection of apple stem pitting virus from pome fruit hosts and sequence variability among viral isolates [C]//17th International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops. Bethesda: International Society Horticultural Science Louvain,1997:67-74.

[6] 张开春,侯义龙,胡文玉,等. 采用 RT-PCR 技术检测苹果病毒[J]. 果树学报,2001,18(6):370-371.

[7] Hull R. 马修斯植物病毒学[M]. 范在丰,李怀方,韩成贵,等译. 北京:科学出版社,2000:5-60.

[8] 杨洪一. 草莓病毒分子检测及其部分基因组序列分析[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2005.

[9] Kaden-Kreuziger D, Lamprecht S, Martin R R, et al. Immunocapture polymerase chain reaction assay and ELISA for the detection of strawberry mild yellow edge associated potexvirus [J]. Acta Hort, 1998(385):33-40.

[10] 王国平,洪 霓,张尊平,等. 我国北方梨产区主栽品种病毒种类的鉴定研究[J]. 中国果树,1994(2):1-4.

[11] 侯雨萱,洪 霓,邓晓云,等. 砂梨上苹果茎痘病毒的调查分析及 RT-PCR 与 TC-RT-PCR 检测研究[J]. 果树学报,2005,22(4):343-346.

[12] 牛建新,朱 军,马兵钢,等. 库尔勒香梨的苹果茎痘病毒 cDNA 探针检测技术研究[J]. 中国农业科学,2004,37(1):99-105.

[13] Dhir S, Tomar M, Thakur P D, et al. Molecular evidence for apple stem pitting virus infection in India[J]. Plant Pathology,2010,59(2):393.

[14] Mathioudakis M M, Maliogka V I, Dovas C I, et al. First record of the apple stem pitting virus (ASPV) in quince in Greece[J]. Journal of Plant Pathology,2006,88(2):225.

1.1.4 仪器 电泳仪,离心机,涡旋振荡仪,凝胶成像仪。

1.2 方法

将连接产物转化进大肠埃希菌 JM109 感受态细胞后,涂在氨苄青霉素抗性的固体培养基平板上,37℃过夜培养 12~16 h,于超净台中准备 12 个 1.5 mL 无菌 EP 管,向其中加入 750 μ L 氨苄抗性的 LB 液体培养基(含氨苄青霉素 100 μ g/mL),在转化平板上用无菌接种牙签任意挑选 4 个单菌落,每个单菌落分别接入 3 个管中,分 3 组在 37℃摇床中振荡培养 5 h。

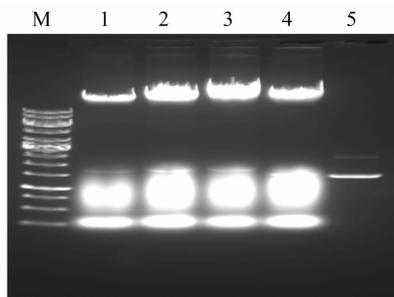
cracking 鉴定:取其中 2 组 14 000 r/min 离心 1 min,弃上清后短暂离心,用 200 μ L 移液枪吸干残余上清。其中一组加 20 μ L 1 \times cracking buffer(不加 RNaseA),另一组加入 20 μ L 1 \times cracking buffer(事先按 1:100 加入了 RNaseA),涡旋振荡 30 s 混匀,14 000 r/min 离心 10 min,取 8~10 μ L 电泳检测以筛选重组质粒。

为进一步鉴定通过上述方法得到的重组质粒的准确性,可通过 PCR 扩增或酶切鉴定的方法对得到的克隆进行进一步验证。由于本试验使用的外源片段为 PCR 产物,因此可采用 PCR 方法对上一步获得的阳性克隆进行进一步验证,即在超净工作台中取 1 μ L 第 3 组培养物作为 PCR 模板进行 PCR 反应,然后取 5 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。

2 结果与分析

从转化平板上直接接菌,摇菌 5~6 h,每个克隆接菌 3 管,其中 2 管用于 cracking 鉴定(加或不加 RNaseA),另一管可小量提取质粒 DNA 酶切鉴定或 PCR 鉴定(酶切和 PCR 鉴定并不是必要的)。一般早上接菌,7 h 即可完成鉴定,然后就可进入下一步工作,如送交公司进行序列测定,或接菌待第 2 天进行质粒 DNA 大量提取。

由图 1 可见,未加 RNaseA 的凝胶电泳后,RNA 干扰严重,目的条带不明显,本试验采用载体 puc19-T,连入的外源基因为 560 bp,与载体对照区分不是很明显,若外源基因更小,则 RNA 干扰程度更大。由图 2 可见,只添加 1% RNaseA 即可将 RNA 干扰现象排除,使目的条带清晰可见,便于区分更小的外源基因连入,效果明显。



1~4为挑选的4个克隆,5为自连空载体质粒;图2同
图1 未添加RNaseA菌体裂解的电泳结果

当连入的外源片段是 PCR 产物时,有现成的引物可用,就可以直接以菌液做模板进行 PCR 鉴定。如图 3 即通过 PCR 方法验证了 cracking 鉴定结果的可靠性。当然如果连入的是酶切产物,可以将 cracking 鉴定疑似正确的克隆,根据需要挑选几个克隆小量提取质粒,进行小量酶切鉴定,省时省力。

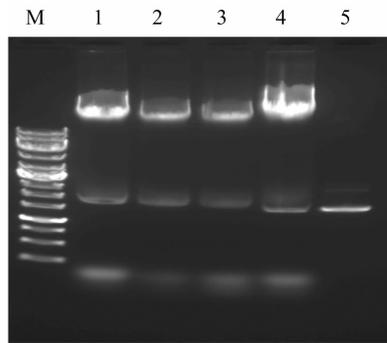
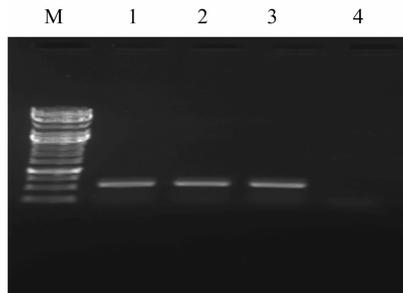


图2 添加RNaseA菌体裂解的电泳结果



1~4为挑选的4个克隆
图3 质粒PCR电泳结果

3 结论与讨论

这种以菌液为材料裂解质粒的方法,省去了以菌落或划线菌为模板所需的长时间培养。首先,以菌落为模板需要将菌落培养 2~3 mm,这个时期多数情况下会有饲养菌落长出,这将影响接菌准确性及后期鉴定,而且直接以菌落裂解物为模板进行 PCR 分析会因为固体培养基平板上残存的连接产物而导致产生假阳性;其次,以划线菌为模板进行试验需要额外花费十几个小时,而本试验建立的方法只需 5~6 h,省去了一半的时间。本方法最重要的创新在于 RNaseA 的加入,从对比图中可见明显优势。总之,该方法成本低廉,操作简便,可大量快速鉴定重组质粒,适用于各种实验室进行高通量的重组克隆鉴定。

参考文献:

- [1] 田丽春,黄光瑞,陈亮,等.一种快捷可靠的大肠杆菌重组质粒筛选方法[J].湖北大学学报:自然科学版,2008,30(2):202-204,216.
- [2] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W.分子克隆实验指南[M].3版.黄培堂,译.北京:科学出版社,2003:26-32.
- [3] 罗文永,陈建伟,刘彦卓,等.快速鉴定阳性重组质粒方法的改进试验[J].广东农业科学,2004(2):9-10.
- [4] 张桂敏,刘振,李春华,等.一种简便快速筛选重组子方法[J].湖北大学学报:自然科学版,2005,27(3):280-281.
- [5] 崔锦,李林珂,马向东.一种简便快速筛选重组子方法[J].生物技术,2005,15(6):46-47.
- [6] Kadokami Y, Colgin M A, Yesgar P W, et al. Screen max plasmid mini-prep: super rapid plasmid DNA extraction method[J]. Biotechniques, 1994, 17(3):580-584.
- [7] 董冰雪,李玉英,叶壮清,等.一种快速简便高通量筛选重组克隆的方法[J].江苏农业科学,2012,40(6):41-42.