

周路, 李建华, 王丹, 等. 有限稀释 PCR 法筛选噬菌体 cDNA 文库目标克隆[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(12): 26–29.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.007

有限稀释 PCR 法筛选噬菌体 cDNA 文库目标克隆

周路, 李建华, 王丹, 高剑峰

(新疆石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 832003)

摘要:通过已知基因 EST 序列设计 1 对特异性引物, 经过 2 轮有限稀释法稀释 cDNA 文库; 利用特异性引物作为探针, 从 cDNA 文库中筛选出目的克隆, 最终获得目的基因的全长序列。在此基础上, 建立一种以 PCR 为基础, 利用有限稀释法快速、有效筛选噬菌体 cDNA 文库、分离全长目的基因的技术体系。

关键词:有限稀释法; 噬菌体; cDNA 文库; PCR

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0026-03

基因克隆是基因工程和分子生物学研究的基础, 随着 21 世纪生物技术的快速发展, 基因克隆技术越来越多被广泛应用^[1-2]。1976 年, Hofstetter 等通过杂交质粒的方法第一个成功构建 cDNA 文库^[3]以来, cDNA 文库构建和筛选日益成熟并普及, 并成为基因克隆及功能基因组研究的基本技术^[4-5], 是最普遍、最经典的克隆全长基因序列的基本方法之一。传统的筛库方法以标记核酸探针技术为基础, 其优点在于准确性和灵敏度高, 缺点是放射性标记探针容易造成污染且同位素半衰期短不稳定, 非放射性标记探针以生物素和地高辛为基础, 成本高且所需工作量大。以 PCR 为基础筛选 cDNA 文库的方法具有快捷、灵敏等特点, 备受广大科研工作者青睐, 如杨晓明等以 PCR 介导的 cDNA 文库矩阵排列法进行混合基因组文库筛选、瞿文全等建立 SSS(subsection screening)筛选 cDNA 文库的方法、王志成等基于 96 孔板 PCR 法筛选 cDNA 文库^[6-8], 等等。本研究尝试构建一种以 PCR 为基础, 结合有限稀释法筛选 cDNA 文库的方法, 在能够快速有效分离出目的基因的基础上, 减少筛选 cDNA 文库的工作量。

1 材料与方法

1.1 材料

λ 噬菌体 cDNA 文库筛选使用由新疆石河子大学生命科学学院构建并保存的中国美利奴羊混合组织 cDNA 文库, 宿主菌株为 XL1-Blue MRF, Phagemid Excision 所用菌株为 XL0LR, 均含四环素抗性。cDNA 文库构建及宿主菌株来自 ZAP Express cDNA Synthesis Kit 试剂盒, 购自 Stratagene 公司。

1.2 试剂

LB 液体和固体培养基、LB broth with supplement、NZY Agar, NZY Top Agar, 5 × NZY Broth、SM 溶液、卡那霉素、四环素, 均购自索莱宝公司; IPTG 和 X-Gal, 购自科百奥公司; 琼

脂粉、琼脂糖、低熔点琼脂糖、MgSO₄, 均购自 Amresco 公司; 其余分子生物学试剂均为国产。

1.3 引物

利用 GenBank 中公布的绵羊 *TORIAPI* 预测基因 EST 序列, 用 SeqMan 软件对 EST 序列拼接去载体, 获得目的序列。将确定好的 *TORIAPI* 基因序列, 利用比较基因组学方法, 比对寻找 3' 和 5' - UTR 区域内的高度保守序列, 使用 Premier Primer 5.0 软件和 NCBI 上 Primer-Blast 工具设计特异性引物, 并提交北京华大基因生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 PCR 反应条件

采用天根 2 × Taq PCR Master Mix 试剂盒, PCR 反应体系为: 10 × PCR buffer, 2.5 μL; 25 mmol/L MgCl₂, 2.0 μL; 10 mmol/L dNTPMix, 0.5 μL; 10 μmol/L 正、反向引物, 各 1 μL; 模板, 2 μL; Taq 酶, 1 U; ddH₂O, 补至 25 μL。反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 次循环; 72 °C 延伸 8 min。PCR 反应结束, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外凝胶成像仪观察并照相保存。

1.5 λ 噬菌体 cDNA 文库筛选

λ 噬菌体 cDNA 文库筛选流程见图 1。

1.5.1 宿主菌的制备 用接种环蘸取 XL1-Blue MRF' 菌液在含有四环素终浓度为 12 μg/mL 的 LB 平板上划线, 37 °C 过夜培养; 用接种针在平板上挑取 1 个单菌落, 于 20 mL LB broth with supplement 中 30 °C、220 r/min 振荡过夜培养; 培养菌液 1 000 g 离心 5 min, 弃上清, 加入 10 mmol/L MgSO₄ 溶液将菌株细胞重悬稀释调至 *D*_{600 nm} 值为 0.6 ~ 1.0, 4 °C 保存备用。XL0LR 菌制备过程与 XL1-Blue MRF' 相同。

1.5.2 λ 噬菌体 cDNA 目的基因确定 取 λ 噬菌体 cDNA 扩增文库菌液 2 μL 进行 PCR 检测。

1.5.3 λ 噬菌体 cDNA 扩增文库的第 1 轮有限稀释筛选 根据 PCR 检测结果能够获得特异性条带, 将此扩增文库菌液 EP 管编号 0; 另取 10 只 1.5 mL EP 管并编号 1 ~ 10 号管, 加入 100 μL LB broth with supplement 培养基, 依次从各管中取 100 μL 培养菌液, 反复吸打充分混匀, 进行有限稀释; 取有限稀释的各管菌液 4 μL 进行 PCR 检测, 如 1 ~ 10 号管 PCR 检测中 1 ~ 9 号管有特异性条带, 而 10 号管无, 则选取 9 号管为最大稀释倍数的阳性管。

收稿日期: 2014-03-13

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(编号: 2010CB530200)。

作者简介: 周路(1989—), 男, 硕士研究生, 从事动物功能基因组和分子免疫学研究。E-mail: zll-english@163.com。

通信作者: 高剑峰, 博士, 教授, 从事动物功能基因组学与分子免疫学研究。Tel: (0993) 2031130; E-mail: jianfengg@shzu.edu.cn。

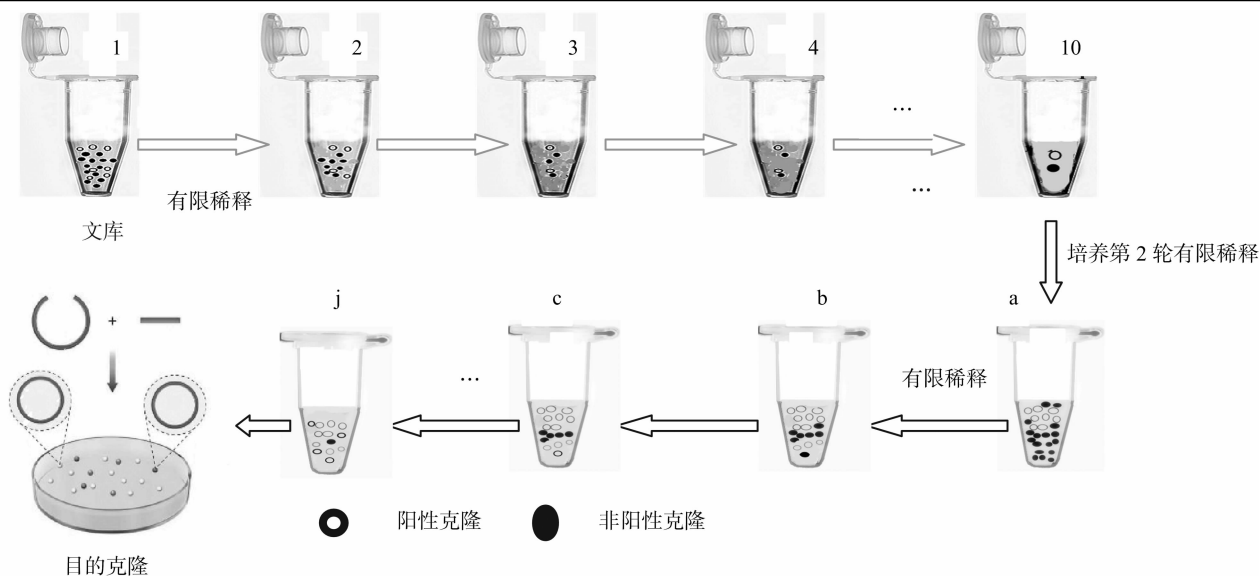


图1 有限稀释PCR法筛选文库过程示意图

1.5.4 最大稀释倍数阳性管的培养 吸取最大稀释倍数的阳性管噬菌体 cDNA 扩增文库溶液 4 μL 与 400 μL XL1 - Blue MRF' 宿主菌混合均匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min; 加入 600 μL LB broth with supplement 培养基混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 10 h; 取培养菌液 2 μL 进行 PCR 检测。

1.5.5 文库第 2 轮有限稀释筛选 经 PCR 检测有特异性条带, 则将对对应 EP 管编号为 a; 另取 10 支 1.5 mL EP 管各加入 100 μL LB broth with supplement 培养基, 依次标号 a ~ j, 从培养过的最大稀释倍数阳性管取 100 μL 菌液加入到 a 号管, 反复吸打充分混匀, 进行有限稀释; 将 a ~ j 稀释完成的菌液 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 10 h, 取各管培养液 2 μL 进行 PCR 检测, 确定最大稀释倍数的阳性管; 将最大稀释倍数的阳性管 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续振荡培养 2 h, 平均分装成 2 管, 第 1 管进一步进行有限稀释, 验证阳性克隆的稳定性, 验证完成, 第 2 管用于噬菌体单板的挑取。

1.6 阳性噬菌体斑的挑取

经过 2 轮有限稀释筛选, 取最大稀释倍数的阳性管菌液 2 μL 与 200 μL 振荡过夜培养的 XL1 - Blue MRF' 菌液 ($D_{600\text{nm}} \approx 1.6$) 混合, 并吸打均匀, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min; 将混合菌液加入到 8 mL, 温育在 48 $^{\circ}\text{C}$ 的 NZY Top Agar 中, 混合混匀后将 NZY Top Agar 混合液均匀地倒入预热的 NZY Agar 平板上超过 20 min, 至平板凝固; 将凝固后的平板倒置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养 7 ~ 8 h, 直至长出清晰的噬菌斑; 逐个从平板上挑取噬菌体单斑于 500 μL LB broth with supplement 培养基, 室温条件下温育 1 ~ 2 h, 噬菌体溶液进行 PCR 检测, 鉴定为阳性后进行 Phagemid Excision。

1.7 Phagemid Excision

在 10 mL 离心管中, 加入 50 μL 混匀的噬菌体溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min; 在离心管中加入 2 mL LB broth with supplement 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$, 260 r/min 振荡培养 2.5 ~ 3 h; 菌液 65 ~ 70 $^{\circ}\text{C}$ 热激 20 min, 以 1 000 g 离心 15 min, 收集上清于无菌离心管中; 取 100 μL 上清与 200 μL XL0LR 细胞吸打混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min; 加入 40 μL 5 \times NZY Broth, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 45 min; 加入 5 μL 20% IPTG 和 40 μL 125 mg/mL

X - Gal 充分混匀, 取 100 μL 涂板在含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基上, 倒置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜; 用灭菌牙签挑取平板上白色单菌落进行 PCR 鉴定, 阳性单克隆经液体培养, 送交北京华大基因生物工程技术服务有限公司测序。

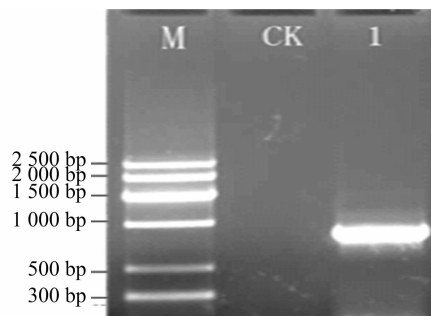
2 结果与分析

2.1 引物的设计

设计引物为 *TOR1AIP1* - F: 5' - AACCAAAGCTGTTGACAGATGAGAAC - 3'; R: 5' - GCGCTGCAGTCGACACTAGTG - GATC - 3'。

2.2 λ 噬菌体 cDNA 扩增文库目的基因的确定

取 2 μL 绵羊 cDNA 扩增文库 3.8×10^8 PFU/mL, 利用 *TOR1AIP1* 引物进行 PCR 检测, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳与 PCR marker 对比, 绵羊 cDNA 扩增文库在 800 bp 具有特异性条带 (图 2), 表明文库中含有目的基因。

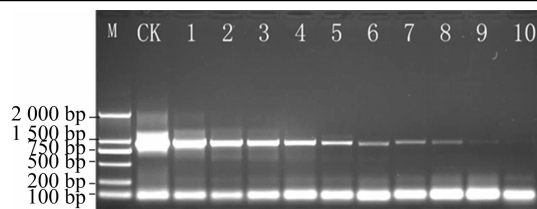


M—marker7; CK—空白对照; 1—目的条带
图2 绵羊 cDNA 扩增文库的琼脂糖凝胶电泳检测图

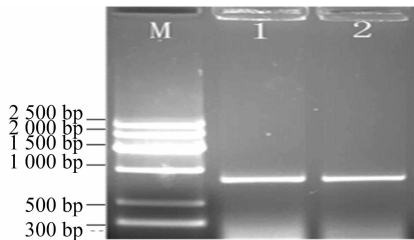
2.3 有限稀释 PCR 法目的基因筛选

由图 3 可见, 在第 1 轮有限稀释筛选中, 1 ~ 10 号管均有特异性条带, 且条带亮度逐渐降低, 说明 1 ~ 10 号管中总的克隆种类呈指数降低, 目的基因克隆数在减少; 9 ~ 10 号管特异性条带微弱, 说明 9 ~ 10 管中含有目的基因克隆且克隆数很少, 9 ~ 10 号管为最大稀释倍数阳性克隆管。

对 9 ~ 10 号管进行富集培养, 取培养菌液 2 μL 进行 PCR 验证, 结果由图 4 可见, 9 ~ 10 号均有明显的特异性条带, 能



M—marker2；CK—空白对照；1~10—目的条带
图3 第1轮有限稀释菌液的琼脂糖凝胶电泳检测图

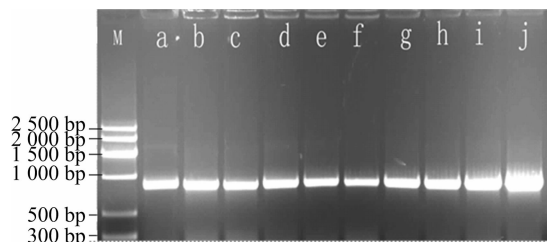


M—marker7；1~2—9~10号管目的条带

图4 第1轮有限稀释9~10号管菌液验证的琼脂糖凝胶电泳检测图

够进行第2轮筛选。

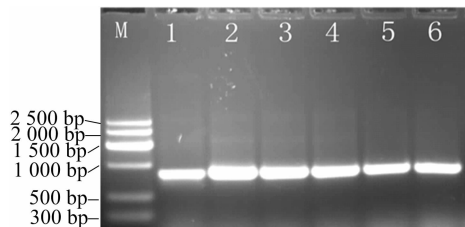
取10号培养管菌液100 μ L进行第2轮有限稀释，取菌液经PCR检测，结果由图5可见，a~j均出现特异性条带，各稀释管中均包含目的基因克隆；a~f条带亮度均一，g~j条带亮度逐渐增加，表明阳性克隆数在增加。这是有限稀释法的优点，经过第1轮和第2轮筛选，非阳性克隆在减少，阳性克隆数经过富集扩大培养后大量增加，能够有效地筛选含目的基因的阳性克隆。



M—marker7；a~j—目的条带

图5 第2轮有限稀释菌液的琼脂糖凝胶电泳检测图

为进一步确定j号管能够进行Phagemid Excision，对j号管进行有限稀释验证。由图6可见，在有限稀释的j号管1~6份检测样本中均有特异性条带，表明第2轮有限稀释能够进行Phagemid Excision。



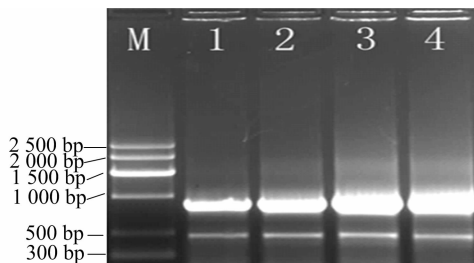
M—marker7；1~6—目的条带

图6 琼脂糖凝胶电泳检测图

2.4 Phagemid Excision

经过2轮有限稀释筛选，经Phagemid Excision，随机挑取6个单克隆进行PCR鉴定，结果由图7可见，4个单克隆有明

显的特异性条带，鉴定为含有目的基因的单克隆，将单克隆菌液送交测序。



M—marker7；1~4—4个单克隆

图7 经Phagemid Excision的4个单克隆琼脂糖凝胶电泳检测图

2.5 测序结果

将测序得到的TOR1AIP1基因序列，运用DNASTAR中Seqman进行拼接，在NCBI上载体搜索工具VecScreen去载体，对序列进行核苷酸序列比对，并将序列提交GenBank，GenBank登录号为KF779494。

3 结论与讨论

筛选cDNA文库是获取全长目的基因的基本方法之一。从cDNA文库中获得目的全长基因，建立该基因的结构、功能、表达调控等研究体系，是在基因组水平上研究特定生物器官、组织、发育时期基因表达的前提和基础。目前，基于PCR法从混合文库中筛选阳性单克隆的方法^[9,11]越来越受到关注。本试验构建了一种快速筛选噬菌体cDNA文库的方法——有限稀释PCR法，与常规PCR筛选cDNA文库方法相比，具有操作简便、检测灵敏、筛选快速、经济有效等优点。该方法以特定基因组DNA为探针筛选噬菌体cDNA文库中该基因的全长序列，摆脱了传统噬菌体文库铺板培养、分板洗脱等较为繁琐的操作步骤，只经过2轮PCR就可筛选到目的基因，并将目的基因富集到较高水平，整个过程只需4d时间。利用此项技术，能够快速有效地筛选噬菌体cDNA文库中全长序列基因，在筛选过程中不需要探针标记，降低了成本，提高了安全性，同时也降低了假阳性对试验的干扰。

有限稀释PCR法快速筛选噬菌体cDNA文库技术不仅原理简单，具有普遍适用性，而且具有一定的可行性和科学性，可以根据研究需要进行改进。如需要筛选大量已知基因，可在对库液的有限稀释时进行多对引物不同基因的统一筛选，这样使得筛选cDNA文库更加高效；如对于某些在文库中丰度比较低的基因，可以先有限稀释cDNA文库，找到最高的有限稀释倍数再进行培养，提高阳性克隆在稀释菌液中的分布，再按本试验步骤进行2轮有限稀释，可得到目的基因的单克隆。因此，在筛选文库之前，应确定文库中是否含有所要的阳性克隆，对文库进行滴定，再进行有限稀释确定基因的丰度；还可对 λ 噬菌体cDNA扩增文库进行MASS Excision protocol，将Phagemid Excision菌液保存，并利用有限稀释PCR法对大量基因进行筛选，达到高效筛选cDNA文库的目的。

目前， λ 噬菌体cDNA载体系统构建的cDNA文库包括噬菌体文库和细菌质粒文库，具有装载容量大、灵敏度高、代表性好、质量高、适合长期保存等优点，对于细菌质粒文库，使用有限稀释PCR法能够更高效快捷地筛选全长目的基因。

龙丽坤,李飞武,李葱葱,等.复合性状转基因玉米外源蛋白的时空表达规律[J].江苏农业科学,2014,42(12):29-33.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.008

复合性状转基因玉米外源蛋白的时空表达规律

龙丽坤,李飞武,李葱葱,武奉慈,宋新元

(吉林省农业科学院,吉林长春 130033)

摘要:应用酶联免疫吸附测定法(ELISA)定量检测转基因玉米 MON89034 × NK603 的 3 个复合性状转基因玉米中 Cry1A.105、Cry2Ab2、CP4-EPSPS 蛋白在各组织中的表达量,分别取苗期和心叶期叶片、吐丝期花粉和花丝、灌浆期籽粒、雌穗顶端和茎髓组织进行检测。结果显示,3 个转基因品种中,外源基因在各组织中的表达显示较高的一致性,均在叶片组织表达最高。转化体同一组织中表达外源蛋白在品种间变异不明显,组织间差异大于品种差异。

关键词:复合性状转基因玉米;ELISA;外源蛋白;时空表达规律

中图分类号:S513.035.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)12-0029-05

自 1998 年首例转基因玉米被批准商业化以来,转基因玉米种植面积不断扩大,随着转基因技术快速发展,新一代转基因植物及复合性状转基因植物不断涌现^[1]。2011 年,全球共有 16 个国家种植转基因玉米,种植面积达到 5 100 万 hm²,占全球玉米种植总面积的 32%。抗虫耐除草剂复合性状转基因玉米种植面积近 12 年来不断增长,2012 年种植面积达 2 029 万 hm²,比 2011 年增长 10.9%。复合性状转基因玉米已逐渐取代了单一性状转基因玉米,成为市场主导^[2]。然而,转基因大面积种植后引起的生态环境安全问题也引起了人们的广泛关注^[3-4]。因此,对复合性状转基因玉米在不

同栽培条件下外源蛋白时空表达成为转基因环境安全评价的关注焦点之一^[5]。本试验材料为孟山都公司选育的 DK007YGRR、DK008YGRR、NC6304YGRR 等 3 个复合性状转基因玉米品种,这 3 个品种均以 MON89034 和 NK603 为亲本杂交选育而成,具有来自父本的 Cry1A.105 和 Cry2Ab2 杀虫蛋白基因和母本的 CP4-EPSPS 蛋白外源基因,表达双价抗虫和耐除草剂的复合性状。本研究采用 ELISA 方法对 3 个复合性状转基因玉米不同时期、不同组织进行外源蛋白表达的实时检测,研究复合性状转基因玉米抗虫和耐除草剂基因的时空表达规律。同时,以本品种的同型对照品种以及当地主栽品种作为阴性对照开展外源蛋白组织表达测定,以期阐明杂交种外源蛋白时空表达规律,为杂交选育复合性状转基因玉米环境安全评价方案提供参考依据。

收稿日期:2014-02-27

基金项目:中国博士后面上项目(编号:2011M500626);吉林省科技发展计划(编号:20130522075JH);转基因生物新品种培育重大专项(编号:2014ZX08011-003)。

作者简介:龙丽坤(1976—),女,吉林长春人,博士,副研究员,从事转基因植物环境安全检测方向研究。Tel:(0431)87063122;E-mail:longlikun@126.com。

通信作者:宋新元,副研究员,从事转基因环境安全评价研究。E-mail:songxinyuan1980@163.com。

参考文献:

- [1] Searles L L, Jokerst R S, Bingham P M, et al. Molecular cloning of sequences from a drosophila RNA polymerase II locus by Element transpose tagging[J]. Cell, 1982, 31(3 Pt 2): 585-592.
- [2] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(12): 6025-6030.
- [3] Hofstetter H, Schamböck A, van Den Berg J, et al. Specific excision of the inserted DNA segment from hybrid plasmids constructed by the poly(dA). poly(dT) method[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1976, 454(3): 587-591.
- [4] Ren B Z. Biochemistry and clinical medicine[M]. Changsha: Hunan Science and Technical Press, 1993.

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

阳性转基因玉米材料 3 个,品种名为 DK007YGRR、DK008YGRR、NC6304YGRR,同型对照阴性玉米样品分别为 DK007、DK008 和 NC6304,由美国孟山都公司提供。当地主

- [5] 瞿礼嘉. 现代生物技术[M]. 北京:高等教育出版社,2004.
- [6] Yang X M, Xie L, Hu Z Y, et al. A method of screening an arrayed cDNA library by PCR[J]. Chinese Biochemical Journal, 1997, 13(5): 505-508.
- [7] 杨晓明,谢玲,胡志远,等. PCR 介导的 cDNA 文库矩阵排列筛选方法[J]. 生物化学杂志, 1997, 13(5): 14-17.
- [8] 瞿礼全,金治平,赵德修,等. 快速简便筛选 cDNA 文库的 SSS 法[J]. 遗传, 2003, 25(5): 583-586.
- [9] 王志成,蒋建雄,钟军,等. PCR 快速筛选棉纤维 cDNA 文库分离全长 cDNA 序列[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2005, 31(3): 272-275.
- [10] Israel D I. A PCR-based method for high stringency screening of DNA libraries[J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(11): 2627-2631.
- [11] Alfandari D, Darribère T. A simple PCR method for screening cDNA libraries[J]. PCR Methods and Applications, 1994, 4(1): 46-49.