

王珊珊,徐海洋,王世明. 酵母穿梭质粒 pXZ200 的构建[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):31-34.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.009

酵母穿梭质粒 pXZ200 的构建

王珊珊,徐海洋,王世明

(南京理工大学环境与生物工程学院,江苏南京 210094)

摘要:利用酿酒酵母高效的同源重组能力,通过 PCR 扩增技术,将复制子 pBBR1 片段、Kan^R(卡那霉素抗性)片段、酵母复制子 2 μ 片段这 3 个两端含有 30 bp 同源臂的片段电转入酿酒酵母,通过同源重组获得宿主更具广谱性的革兰氏阴性细菌-啤酒酵母穿梭质粒 pXZ200。经检测,pXZ200 能够在恶臭假单胞杆菌 KT2440 和大肠杆菌中稳定复制。

关键词:酿酒酵母;同源重组;穿梭质粒;PCR 技术;pXZ200

中图分类号: Q936 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)08-0031-03

分子生物学中,利用 DNA 重组技术使宿主细胞获得某种特殊能力是非常重要的而且被广泛利用的方法。然而,这种方法在体外需要经多步的酶切和酶连,很大程度上依赖于载体上限制性核酸内切酶的酶切位点,步骤繁琐,所连接片段一般限于几个 kbp 大小,很少超过 10 kbp,但同源重组的新方法克服了这种限制。

酿酒酵母细胞内有着较其他生物更高效的同源重组修复双链 DNA 断裂机制,是研究同源重组机制和应用同源重组技术的主要模式生物^[1-2]。在酿酒酵母系统中,15 bp 的同源序列就可以介导同源重组的发生,获得重组克隆^[3];当两端的同源序列为 30 bp 时,有效同源重组的频率可接近 80%^[4-5]。PCR 介导重组技术是指通过人工合成寡核苷酸单链作为 PCR 引物,用 PCR 扩增方法得到重组片段的两端带有重组所需同源臂外源的 DNA 片段^[6-7],是目前应用最为广泛的一种重组技术^[4,8-10],这种方法与传统酶切酶连的基因克隆方法相比,具有很多优点:省去了多步的酶切酶连,操作更为简单快捷;不依赖于限制性酶切位点的存在,不会引入多余的碱基;通过合成特定的同源序列,目的基因可以精确地定位在靶位点上;解决了大片段的基因克隆问题^[11-12]。体外将合成的 DNA 片段利用酿酒酵母的重组机制,在体内完成多个 DNA 片段的一步整合已被广泛运用。1970—2008 年,DNA 合成片段已经从 75 bp 增加到 583 kbp^[13]。1970 年,Khorana 等成功合成丙氨酸转运 RNA 的完整基因,这是第一次实现化学合成可遗传序列^[14];2008 年,Venter 研究组合成了由 101 个 DNA 片段构建、长度为 583 kbp 的 DNA^[15],该 DNA 通过体外合成 25 个具有同源臂的 DNA 片段,然后利用酵母重组机制合成基因组^[16];2009 年,Shao 等在酵母中一步装配完成含有 8 个

基因的生化途径,含有这个生化途径的重组菌能够利用木糖产生玉米黄质^[17]。

带有完整 2 μ 质粒序列的质粒 pXZ198 是一个既能在酵母中复制表达、又能在大肠杆菌中复制表达的穿梭质粒,在研究中被广泛应用。但是,pXZ198 质粒只含有大肠杆菌的复制子 *Coli* E1,而不能在其他原核细胞中复制表达,而 pBBR1MCS5 却是能够在多种革兰氏阴性菌中稳定复制表达的质粒^[18]。本试验利用酿酒酵母的体内高效重组系统,将广谱复制子 pBBR1、卡那霉素抗性基因 Kan^R、酵母复制子 2 μ 序列重组成一新的质粒 pXZ200,经验证,该质粒可以在大肠杆菌及恶臭假单胞杆菌 KT2440 中稳定复制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器 恒温培养箱、PCR 仪、摇床、低温离心机、冰箱、制冰机、无菌操作台、灭菌锅、电转杯、电转仪、多功能酶标仪等。

1.1.2 主要试剂 *Dra* I 限制性内切酶、DNA 回收试剂盒、1 mol/L 山梨醇、氨苄抗生素、庆大霉素、卡那霉素、博来霉素等。

1.1.3 主要菌种和质粒 酿酒酵母 S288C、大肠杆菌 DH5 α 、恶臭假单胞杆菌 KT2440、含有完整 2 μ 序列及博来霉素抗性基因片段 pXZ 的 pXZ198 质粒、含有 Kan^R 片段的 pET29a 质粒、含有在多种原核细胞中能复制的广谱复制子 pBBR1 的 pBBR1MCS5 质粒。

1.1.4 培养基 YPD 培养基:2% 蛋白胨、1% 酵母粉、2% 葡萄糖,pH 值为 7.0,115 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。LB 培养基:1% 蛋白胨、0.5% 酵母粉、1% 氯化钠,pH 值为 7.0,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min。固体培养基是在液体培养基的基础上加入 1.5% 琼脂。

1.2 方法

1.2.1 打靶片段的准备 在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 接种 pXZ198 DH5 α 至含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄抗生素、接种 pET29a DH5 α 至含有 50 $\mu\text{g/mL}$ Kan、接种 pBBR1MCS5 DH5 α 至含有 30 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素的 LB 试管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 过夜培养;分别取约

收稿日期:2014-08-21

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(编号:30920130121013)。

作者简介:王珊珊,女,硕士,从事微生物生理生化研究。E-mail: wangshanshanb305@163.com。

通信作者:王世明,博士,副教授,从事微生物生理生化研究。E-mail: wangshanshanb305@163.com。

3 mL 菌液,提取质粒^[19] pXZ198、pET29a、pBBR1MCS5,用 PCR 扩增方法获得两端含有 30 bp 同源臂的打靶片段,打靶片段 PCR 对应的引物和模板见表 1;每个片段扩增约

120 μL,按照康宁生命科学试剂盒回收各个片段;回收的各个片段进行 0.75% 琼脂糖电泳并测各片段的浓度。

表 1 打靶片段 PCR 对应的引物和模板

引物	模板	片段名称	片段大小 (kb)
pXZ-F:5'-CGCCCAATACGCAAACCGCC-3'	pXZ198	pXZ	2.8
pXZ-R:5'-TTTAAAAGCTTGCAAATTAAGCCTTCG-3'	pXZ198	pXZ	2.8
Kan-F:5'-CCGACACGGGTCACGCTGCCGCGCCGGTAGGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACG-3'	pET29a	Kan ^R	1.0
Kan-R:5'-CGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGT-3'	pET29a	Kan ^R	1.0
pBBR1-F:5'-CTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTTTTAAACCTACGGGCTTGCTCTCC-3'	pBBR1MCS5	pBBR1	1.5
pBBR1-R:5'-CTACCGGCGCGGCAGCGTG-3'	pBBR1MCS5	pBBR1	1.5

1.2.2 感受态细胞的制备 参照文献[17]的方法制作酵母电转感受态、KT2440 电转感受态以及采用大肠杆菌 DH5α 一步法转化感受态细胞^[20]。

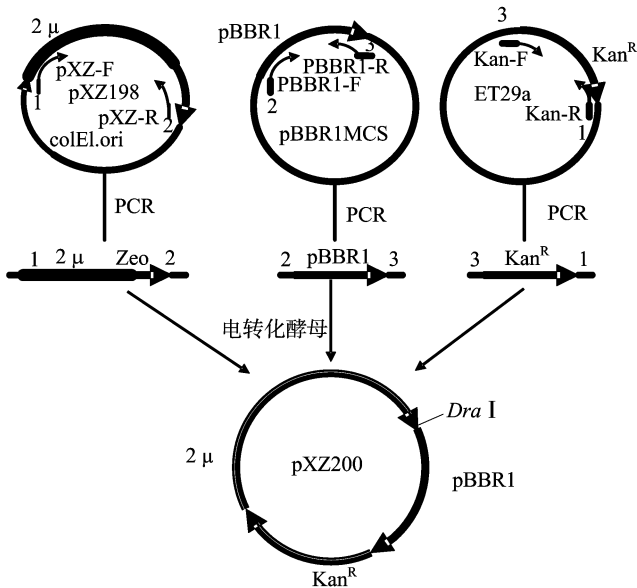
1.2.3 电转重组及初步筛选 取 50 μL 酵母感受态细胞置于预冷的 0.2 cm 的电转杯中,加入打靶片段 pXZ、pBBR1、Kan^R 各 5 μL,混匀;擦干电转杯上的水,放入电转化仪的样品槽中,以 1.5 kV 进行电转化;电转结束,迅速将 1 mL 已灭菌的 YPD 培养基加入到电转杯中;在无菌操作台上,将电转杯中液体转移到 1.5 mL 已灭菌的离心管中,30 ℃ 120 r/min 复苏 1 h;取 100 μL 涂布于含有 200 μg/mL 博来霉素的 YPD 平板上,共涂 10 个平板;平板放置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 24~36 h。

1.2.4 酵母重组子的验证及 pXZ200 在酵母中的稳定性 将平板上长出的单菌落随机挑选出 3 个,并编号为 1、2、3,接种至含 200 μg/mL 博来霉素的 YPD 试管中,30 ℃ 200 r/min 培养 24 h,以 Kan-R、pBBR1-F 为引物对重组子进行 PCR 鉴定。经 PCR 鉴定正确的重组子转接至含有 200 μg/mL 博来霉素的 50 mL YPD 培养基中,30 ℃ 200 r/min 培养 24 h 以提取质粒。由于酵母菌是真核生物,细胞的破碎难于大肠杆菌。试验采用液氮研磨的方法进行细胞破碎,用酚氯仿反复抽提进行质粒的提取。质粒以 pXZR-F、pXZR-R 为引物,送至上海桑尼生物科技有限公司测序,测序序列与 pBBR1、Kan^R 片段的序列进行比对;测序正确的重组子转接至 YPD 试管中,30 ℃ 200 r/min 过夜培养,反复转接 1 周并提质粒;对所提质粒进行 *Dra* I 酶切,酶切体系为 10 μL: pXZ200 3 μL、*Dra* I 和 10 × M Bf 各 1 μL、无菌 ddH₂O 5 μL;0.75% 琼脂糖电泳检测质粒的正确性。

1.2.5 构建质粒在宿主细菌中的复制 将 2 μL 质粒转入^[21]50 μL DH5α 一步法感受态细胞中;转化后加入 600 μL 的 LB 复苏 1 h;取 100 μL 涂布于含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上,平板放置于 37 ℃ 恒温培养箱中过夜培养;挑取平板上长出的单菌落,接种到含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 试管中,37 ℃ 200 r/min 过夜培养,提取质粒;质粒正确的菌转接至 LB 试管中,37 ℃ 200 r/min 过夜培养,反复转接 1 周并提取质粒,对所提质粒进行 *Dra* I 酶切;0.75% 琼脂糖电泳检测质粒的正确性。以同样方法在假单胞杆菌 KT2440 中检测 pXZ200 的稳定性。

2 结果与分析

2.1 pXZ200 质粒的构建 pXZ200 质粒构建的基本流程见图 1。



1、2、3分别为3个同源臂
图1 构建质粒的基本流程

2.2 打靶片段的制备

由图 2 可见,以 PCR 方式获得两端含有 30 bp 同源臂的打靶片段是正确的。经测量,该片段浓度为 100 ng/μL,适合作为打靶片段做电转化。

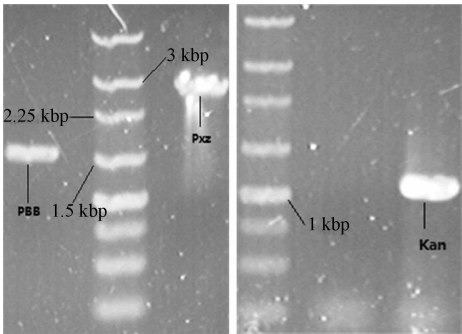


图2 打靶片段回收后的电泳图

2.3 对重组子的验证及 pXZ200 在酵母中的稳定性。

结果表明,10 个含 200 $\mu\text{g/mL}$ 博来霉素的 YPD 平板上都长出单菌落,每个平板平均长出 20 个单菌落;对菌落进行验证统计,重组效率约为 70%;对其中 3 个重组子进行 PCR 验证,由图 3 可见,Kan^R 和 pBBR1 2 个片段的长度大小约为 2.5 kbp,1 号和 2 号单菌落是正确的。将 2 号菌提出的质粒以 pXZR - F、pXZR - R 为引物测序,经与 pBBR1 及 Kan^R 片段的序列进行比对,符合度达 99%,证明该质粒构建正确。

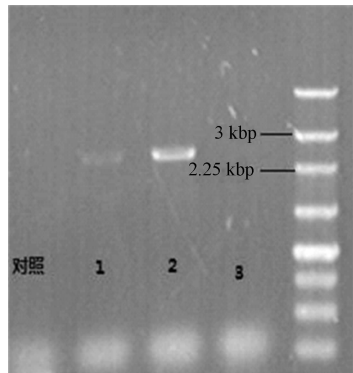


图3 验证 PCR 的电泳图

2.4 构建质粒 pXZ200 在假单胞杆菌和大肠杆菌中的表达及稳定性

从酵母菌提取的质粒 pXZ200 转入大肠杆菌和假单胞杆菌 KT2440 中,提质粒(3 mL 菌液)验证都正确(图 4)。将含有质粒的大肠杆菌、假单胞杆菌 KT2440 及验证正确的酵母重组子分别连续转接 1 周,所提取的质粒经 *Dra* I 酶切。由图 5 可见,从大肠杆菌及假单胞杆菌 KT2440 中提取的质粒和从酵母中提取的质粒相比,大小一致且转接 1 周后质粒的量没有变化,酶切后质粒大小为 5.3 kbp。说明 pXZ200 能够在酵母菌、大肠杆菌 DH5 α 和假单胞杆菌 KT2440 中稳定复制。

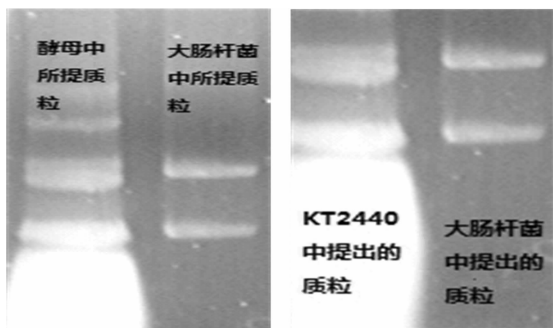
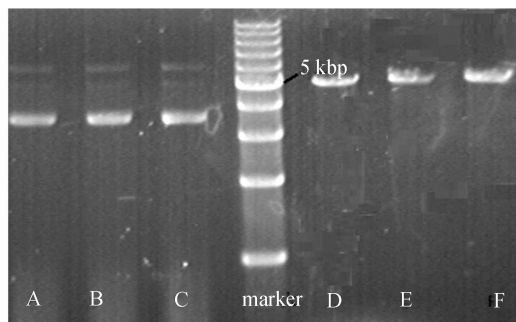


图4 质粒的电泳图谱

3 结论

传统的质粒构建需要找到一个合适的载体,将目的片段和载体片段在相同的酶切后进行酶连,再转入到宿主菌中鉴定,如果构建的质粒需要插入多个片段,则工作量很大。本试验采用的方法比较简单,只需要在 PCR 获取目的片段时加入同源臂,然后将所有目的片段混匀,电转到酵母感受态细胞中再进行筛选验证。与传统方法相比,这种方法对多片段质粒的构建简单且易于操作。试验所构建的新质粒 pXZ200 能够在酵母菌及大肠杆菌、假单胞杆菌中稳定复制。



A—从酵母中提取的质粒;B—从大肠杆菌中提取的质粒;C—从KT2440中提取的质粒;D—酵母中提取质粒的酶切产物;E—大肠杆菌中提取质粒的酶切产物;F—KT2440中提取质粒的酶切产物

图5 质粒及质粒酶切的电泳图

参考文献:

- [1] Szostak J W, Orr - Weaver T L, Rothstein R J, et al. The double - strand - break repair model for recombination [J]. Cell, 1983, 33 (1): 25 - 35.
- [2] Bhatia P K, Wang Z G, Friedberg E C. DNA repair and transcription [J]. Current Opinion Genetics Development, 1996, 6(2): 146 - 150.
- [3] Judd S R, Petes T D. Physical lengths of meiotic and mitotic gene conversion tracts in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Genetics, 1988, 118 (3): 401 - 410.
- [4] Nickoloff J A, Hoekstra M F. Double - strand break and recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae* [M]//Nickoloff J A, Hoekstra M F. DNA damage and repair, vol. 1: DNA repair in prokaryotes and lower eukaryotes. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 1998: 335 - 362.
- [5] Willis K K, Klein H L. Intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*: reciprocal exchange in an inverted repeat and associated gene conversion [J]. Genetics, 1987, 117(4): 633 - 643.
- [6] Kramer K M, Brock J A, Bloom K, et al. Two different types of double - strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* are repaired by similar RAD52 - independent, nonhomologous recombination events [J]. Molecular and Cellular Biology, 1994, 14(2): 1293 - 1301.
- [7] Orr - Weaver T L, Szostak J W. Yeast recombination: the association between double - strand gap repair and crossing - over [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1983, 80(14): 4417 - 4421.
- [8] Schwacha A, Kleckner N. Identification of double Holliday junctions as intermediates in meiotic recombination [J]. Cell, 1995, 83(5): 783 - 791.
- [9] Nasmyth K A. Molecular genetics of yeast mating type [J]. Annual Review Genetics 1982, 16: 439 - 500.
- [10] Thaler D S, Stahl F W. DNA double - chain breaks in recombination of phage lambda and of yeast [J]. Annual Review of Genetics, 1988, 22: 169 - 197.
- [11] Nassif N, Penney J, Pal S, et al. Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P - element - induced gap repair [J]. Molecular and Cellular Biology, 1994, 14(3): 1613 - 1625.
- [12] McGill C, Shafer B, Strathern J. Coconversion of flanking sequences with homothallic switching [J]. Cell, 1989, 57(3): 459 - 467.
- [13] Mueller S, Coleman J R, Wimmer E. Putting synthesis into biology: a viral view of genetic engineering through de novo gene and genome synthesis [J]. Chemistry & Biology, 2009, 16(3): 337 - 347.

张涛,韩梅,刘翠晶,等. 人参总 RNA 提取方法及反转录酶的比较[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):34-37.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.010

人参总 RNA 提取方法及反转录酶的比较

张涛,韩梅,刘翠晶,胥苗苗

(吉林农业大学中药材学院,吉林长春 130118)

摘要:为了探索人参根、叶片总 RNA 的提取方法,以多年生人参根、叶片为材料,比较 7 种提取方法的总 RNA 质量。结果表明:除改良 CTAB 法对人参根总 RNA 的提取效果不明显,其余方法均能从人参根、叶片中提取、分离到总 RNA,其中 RNAPure 高纯总 RNA 快速提取试剂盒法能提取到完整性较好、纯度较高的总 RNA,琼脂糖凝胶电泳显示的条带清晰完整,根中 RNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 1.87, RNA 浓度为 351.8 ng/ μL ;用 Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-)试剂盒、PrimeScript Reverse Transcriptase 试剂盒、GoScript™ Reverse Transcription System 试剂盒对提取的总 RNA 进行反转录,其中用 GoScript™ Reverse Transcription System 试剂盒反转录后进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳条带较亮,证明转录效果较好。经反转录、PCR 证明,提取的总 RNA 适用于后续分子生物学研究。

关键词:人参;根;叶片;总 RNA;提取方法;反转录酶

中图分类号: S567.5+10.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)08-0034-04

人参为五加科人参属植物,素有“东北三宝”的美誉,人参皂苷为人参的主要药效成分,具有较好的抗肿瘤、提高机体免疫力、改善心脑血管供血不足、抑制细胞凋亡等药理活性^[1-3],目前人们已经从人参中分离到了约 90 个人参皂苷单体^[4-5]。人参皂苷的含量是判断人参质量的主要标准,但是目前对人参功能基因和次生代谢物合成途径的研究相对较少,人参皂苷的产率较低,次生代谢产物人参皂苷尚未实现人工合成,对于一些含量甚微的单体皂苷的新药开发还较为困难^[6]。人参皂苷的生物合成途径与功能基因表达量之间的关系仍处于探究阶段^[7],因此深入了解人参皂苷的生物合成途径及其调控机理,并在分子水平上实现人参皂苷的人工合成,这是利用生物技术手段大量生产人参皂苷的必要前提。

为了探究人参皂苷生物合成途径与功能基因表达量之间的关系,首要的问题是提取完整性好、纯度高的总 RNA。由

于植物细胞组成成分复杂多样,使得植物组织总 RNA 的提取难于其他生物材料。成熟的人参组织中含有大量的酚类、糖类,人参组织的研磨过程破坏了酚类物质与多酚氧化酶的平衡分布,酚类极易被氧化成醌,并易与 RNA 分子发生不可逆结合,产生褐化反应^[8],从而影响 RNA 的提取,导致 RNA 的产量、质量较差。本研究比较了 7 种提取人参根、叶片总 RNA 的方法,筛选出适合提取人参根、叶片总 RNA 的提取方法,并用该方法提取出完整性好、纯度高的总 RNA。反转录可以检测提取的总 RNA 质量,反转录酶的不同直接决定反转录效果,本试验比较了 3 种反转录酶对总 RNA 的转录情况,筛选出转录效果较好的方法,为人参皂苷合成途径中功能基因的克隆与功能研究奠定了一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

五年生人参取自吉林省抚松县抚南林场(42°03'06"N, 127°33'21"E,海拔 903 m),用刀将根部切成小块,放入冻存管迅速用液氮冷冻,于 -80℃ 保存待用,叶片进行同样处理,试验所用部位为人参根、叶片。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂 TaKaRa MiniBEST 总 RNA 提取试剂盒(TaKa-

method for rapid construction of biochemical pathways[J]. Nucleic Acids Research,2009,37(2):e16.

[18] Kovach M E, Elzer P H, Steven Hill D, et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBS1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes[J]. Gene, 1995, 166(1): 175-176.

[19] 任大勇,李昌,秦艳青,等. 小提质粒快速排除假阳性克隆的新方法[J]. 吉林农业大学学报,2011,33(2):185-188.

[20] 涂知明,陈明洁,何光源,等. 三种大肠杆菌高效感受态的制备及转化[J]. 华中科技大学学报:自然科学版,2006,34(4): 112-115.

收稿日期:2014-09-04

基金项目:国家自然科学基金(编号:31270371);国家科技支撑计划(编号:2011BAI03B01-02)。

作者简介:张涛(1991—),男,吉林延吉人,硕士研究生,主要从事药用植物分子生态学研究。E-mail:251073371@qq.com。

通信作者:韩梅,博士,教授,主要从事药用植物资源与药材质量评价。E-mail:hannmei77@sohu.com。

[14] Gibson D G. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides[J]. Nucleic Acids Research,2009,37(20):6984-6990.

[15] Gibson D G, Benders G A, Andrews P, Fannkoch C, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a mycoplasma genitalium genome[J]. Science, 2008, 319(5867):1215-1220.

[16] Gibson D G, Benders G A, Axelrod K C, et al. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic mycoplasma genitalium genome[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(51):20404-20409.

[17] Shao Z Y, Zhao H, Zhao H M. DNA assembler, an *in vivo* genetic