

重组子小插入片段间接内切酶图谱研究^①

傅蕙英^② 曾王勇 陈 珈
(中国科技大学生物系) (生物学院)

摘 要 针对重组子中 100 bp 左右的小插入片段与载体不能同时在普通琼脂糖胶上呈现而无法用内切酶图谱鉴定此类重组子的问题,提出了小插入片段间接内切酶图谱,并用普通琼脂糖凝胶电泳研究分析了此类图谱,获得了通过间接内切酶图谱的间接比较来鉴定此类重组子的实验依据,为在国内普通实验室条件下,经济有效地进行小插入片段基因重组研究提供了有益的启示和参考。

关键词 小插入片段; 间接内切酶图谱; 间接比较; 脑钠肽

中图分类号 Q784

Study on Map of the Recombiant Contained Small Insert by Indirect Restriction Analysis

Fu Huiying Zen Wangyoung Chen Jia
(University of science and Technology of China) (College of Biological Sciences)

Abstract When the insert is about 100bp long, the insert and its vector can't be revealed in the normal agrose gel. For solving this problem the indirect restriction map has been established and analysed on normal agarose gel through electrophoresis. The result show that indirect restriction map can be used as the identification of recombinant which contained small insert at common laboratory with normal agarose gel electrophoresis.

Key words small insert; indirect restriction map; indirect comparison; brain natriuretic polypeptide BNP

基因工程中,将重组的 DNA 转化进宿主菌后,最后一个重要而困难的环节是从转化细菌菌落中筛选出含有阳性重组子的菌落,并鉴定重组子的正确性。不同的克隆载体及相应的宿主系统,其重组子的筛选、鉴定不尽相同。对于初步筛选、鉴定具有重组子的菌落,进一步鉴定重组子是否正确时,通常首选的方法是内切酶图谱鉴定,采用相应的内切酶(1 种或 2 种)切割重组子,释放出插入片段,通过凝胶电泳检测插入片段和载体的大小而加以判断^[1,2]。然而,当插入片段很小(100 bp),载体又偏大(5 kb)时,内切酶切出的二个片段相差很大(约 50 倍),普通琼脂糖凝胶电泳,在小片段清晰可辨时,大片段尚未呈现;待大片段清楚可见时,小片段又已模糊消失。因此含小插入片段重组子内切酶图谱鉴定不能用普通琼脂

收稿日期: 1997-05-22

①国家自然科学基金资助项目 39470154

②傅蕙英,安徽教育学院生物系,230026

糖胶电泳。国外对此类重组子的鉴定,依据文献中的方法而采用小分子量琼脂糖凝胶电泳分析,其效果虽很好,但因小分子量琼脂糖价格昂贵,国内一般实验室难以承受。而在国内一般实验室条件下,对此类重组子如何进行内切酶图谱的鉴定,又未见报道。为了解决小插入片段不能在普通琼脂糖胶上与载体同时呈现的困难,本文首先提出了小插入片段的间接内切酶图谱,接着又用普通琼脂糖胶对间接内切酶图谱进行了电泳分析,通过对这些图谱的间接比较,获得了判断此类重组子的实验依据。同时结合我们的工作,选用有实用意义的脑钠肽(BNP)为例。BNP 是 1988 年在猪脑中发现的一种新的肽类物质^[3],它具有很强的利尿、扩张血管、降低血压作用,因此具有潜在的药用前景,而 BNP-32 是循环系统和中枢神经系统的内源分子形式^[4],更接近于活性中心的 17 个氨基酸环,因此对它的研究就更具一定意义。为此,本文将 BNP-32cDNA 插入融合蛋白表达载体 pGEX-2T 中重组成含小插入片段的重组子 pGEX-2T-BNP-32 cDNA 用作实例。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 PCR 引物 上海细胞所合成。

1.1.2 外源 DNA(小插入片段) BNP-32cDNA(101 bp)PCR 技术扩增。

1.1.3 载体 pGEX-2T(4 948 bp)(见图 1);对照:pGEX-2T-BNP-45cDNA,长 5078 bp(除插入片段比实例的大 44 bp 外,其它均相同);宿主菌: TG1。均由中国科技大学生物系提供。

1.1.4 琼脂糖、培养基各组分、Tag DNA 聚合酶、T₄ 连接酶、限制性内切酶,均购自华美生物技术公司。

2 方法

2.1 BNP-32cDNA 的 PCR 扩增与 PCR 扩增产物的回收

基本按文献^[2],循环参数作调整。

2.2 pGEX-2T 和 BNP-32cDNA 的双酶切及其酶切产物的回收

用 BamHI, EcoRI 于 37℃ 酶切 1.5 h。薄膜回收,基本按文献^[2],插膜方法作改进。

2.3 pGEX-2T/BamH I + EcoR I 去磷酸化、连接、转化感受态细胞制备

氯化钙法、质粒 DNA 小量制备:碱裂解法,均按文献^[2]。

2.4 间接内切酶图谱及其判断方法

1)判断重组的间接内切酶图谱及其判断法选择空载体或插入片段上独有的酶切位点,用相应的限制性内切酶(实例为 Sma I)酶切与空载体质粒图谱相似的质粒,普通琼脂糖凝胶电泳紫外透射仪下检测,图谱上呈现二条谱带的质粒为重组子。

2)判断目的重组的间接内切酶图谱及其间接比较法:在小插入片段外沿选择合适的酶切位点,用相应的限制性内切酶对空载体、对照和重组子在相同的酶切体系中进行酶切,普通琼脂糖凝胶电泳,紫外透射仪下检测,图谱中小带位置介于空载体和对照小带之间的重组

子为目的重组子。

2.5 普通琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖浓度:1.2%~1.5%;电压:70~80V;电泳时间:30~45 min;电泳缓冲液:TAE液。

3 结果与分析

3.1 SmaI 酶切与空载体质粒图谱相似的质粒,呈现二种图谱

一条谱带的和二条谱带的(见图 2-1)。由于载体含 Sma I 酶切位点(见图 1),能被切成一条谱带,因此呈现一条谱带的质粒是空载体(图 2-1b)。而重组子因其在外源 DNA 插进载体前,均已经 BamH I、EcoR I、双酶切处理,Sma I 酶切位点被切除;插入片段 BNP-32cDNA 经计算机查找亦无 Sma I 位点,因此呈现二条谱带的图谱是未被酶切的质粒图谱,该质粒是重组子(图 2-1a)。

3.2 ScaI 酶切重组子,其图谱为二条谱带

大带与空载体和对照的大带等高,小带呈现二种(图 2-2,3):一种高于空载体和对照的小带(图 2-2b)。另一种介于以上小带之间(图 2-3b)。由于载体 pGEX 含二个 ScaI 酶切位点(分别在 829 bp 和 1664 pb),因而被切成大小二条谱带,BNP-32cDNA 插在小带 930 bp 和 940 bp 之间,因此大带等高,小带则因插入片段的有无和大小不同而呈现不同高度。由于插入片段很小(只有 101 bp),在连接时,它们彼此易于先相互连接后再插入载体^[5],而形成串联重组子。串联重组子的插入片段最小为 303 bp,比对照至少大 163 bp,因此小带明显高于对照小带的重组是串联重组子。小带介于空载体和对照之间的重组可能是目的重组子,因为目的重组子的插入片段比对照的插入片段小 44 bp,所以目的重组子的小带必在空载体和对照的小带之间。

3.3 BamH I 和 Pst I 双酶切目的重组子,其图谱呈现的二条谱带

大带与空载体和对照的大带等高,小带介于空载体和对照的小带之间(图 2-4)。该结果

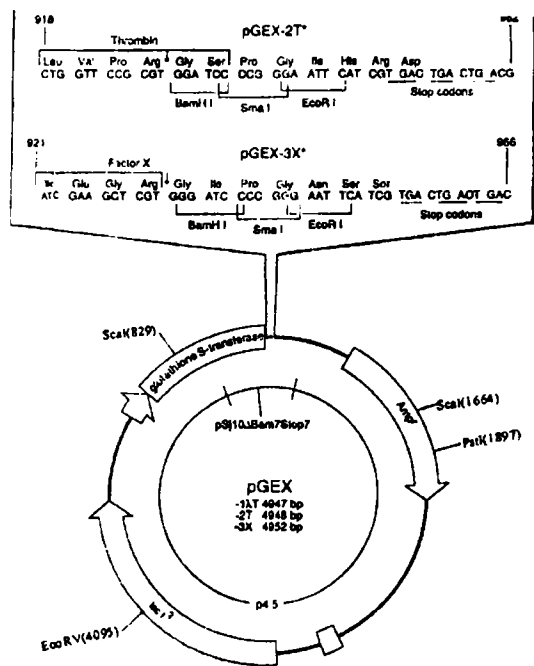


图 1 融合蛋白表达载体 pGEX-2T 物理图谱

与 *Sca* I 酶切结果(图 2-3b)一致。由于 *Bam*HI 的酶切位点在 930 bp, *Pst* I 酶切位点在 1 897 bp, BNP-32cDNA 插在 *Bam*HI 后,因此也在该双酶切的小带上。所以小带介于空载体和对照小带之间的重组子必是目的重组子。该双酶切的大带在 4 kb 左右,小带在 1 kb 左右,空载体小带(967 bp)与对照(1 100 bp)小带的碱基数相差近于 14%,在普通琼脂糖胶上,小带高度差别能较明显地呈现。

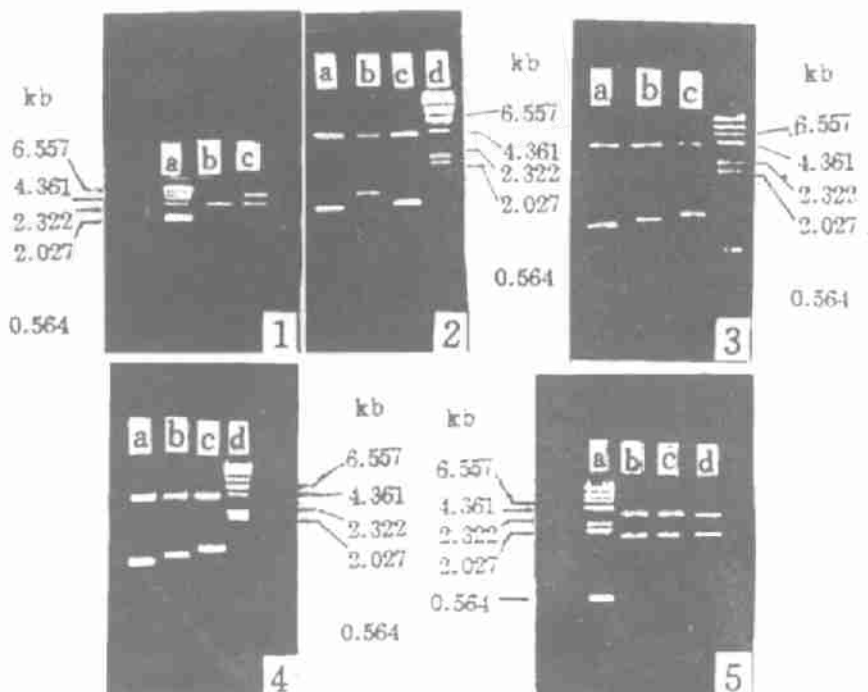


图 2 间接内切酶图谱

- ① *Sma* I 酶切与载体质粒图谱相似的质粒
a. λ /Hind III M. W. Marker; b. 空载体; c. 重组子
- ② *Sca* I 酶切重组子 A
a. 空载体; b. 重组子 A; c. 对照 2T-45; d. λ /Hind III M. W. Marker
- ③ *Sca* I 酶切重组子 B
a. 空载体; b. 重组子 B; c. 对照 2T-45; d. λ /Hind III M. W. Marker
- ④ *Bam*HI, *Pst* I 双酶切目的重组子 B
a. 空载体; b. 重组子 B; c. 对照 2T-45; d. λ /Hind III M. W. Marker
- ⑤ *Eco*RI, *Eco*RV 双酶切目的重组 B
a. λ /Hind III M. W. Marker; b. 空载体; c. 重组子 B; d. 对照 2T-45

3.4 *Eco*RI, *Eco*RV 双酶切目的重组子,其图谱呈现的二条谱带

大带亦与空载体和对照的大带等高,小带也介于以上二者的小带之间,其结果也与 *Sca* I 酶切结果(图 2-3b)一致,但小带间高度差别不明显(图 2-5)。由于 *Eco*RI 的酶切位点在 940 bp, *Eco*RV 的酶切位点在 4 095 bp, BNP-32cDNA 插在 *Eco*RI 前,即也在双酶切的小

带之中,所以大带等高,小带介于空载体和对照之间的必为目的重组子。该双酶切的大带在 3.1 kb 左右,小带在 1.9 kb 左右,空载体小带(1 792 bp)与对照小带(1 925 bp)碱基数相差约 7.5%,因此小带高度差别不如在 1 kb 左右、碱基数相差 14%的小带差别明显。

4 讨论

通过对实例四种不同的间接内切酶图谱的研究可知:载体或重组子独有酶切位点的间接内切酶图谱,可用于含小插入片段重组子和空载体的判断,其结果清晰、准确。不同的小插入片段外沿酶切位点的间接内切酶图谱,可用来判断重组子中的串联重组子和目的重组子。判断目的重组子的间接内切酶图谱以符合下列条件为最佳:一是所设的对照与空载体的碱基相差数应达 14%以上;二是进行比较的谱带的大小宜在 1 kb 左右。如果用于比较的谱带近于 2 kb,碱基相差数少于 10%,则图谱差别小,不易通过间接比较来判断目的重组子。

对同一个目的重组子用三种不同的内切酶进行间接酶切,对所得的三组不同的间接内切酶图谱电泳分析,其分析结果完全一致。同时又对依据间接内切酶图谱鉴定而得的串联重组子和目的重组子进一步进行融合蛋白的表达,在宿主菌 TG1 中,空载体的谷胱甘肽转移酶蛋白表达,重组子的谷胱甘肽转移酶与 BNP-32 的融合蛋白不表达。以上二个方面结果表明:间接内切酶图谱用于含小插入片段重组子的鉴定是可行的、有效的。

间接内切酶图谱鉴定与文献中内切酶图谱鉴定的区别在于:后者直接将插入片段按原来大小切出来,在胶上通过直接检测插入片段和载体大小来判断重组;前者则是切出的片段中含插入片段,通过与对照(所含插入片段仅长短不同)比较来判断目的重组,因此它是通过对间接内切酶图谱进行间接比较分析而加以判断的。重组子小插入片段间接内切酶图谱的提出解决了小插入片段无法在普通琼脂糖胶上呈现的问题。为在国内普通实验室条件下,经济有效地进行小插入片段基因重组研究提供了有益的启示和参考。插入片段序列的正确性,尚需通过序列测定才能最终确认。此项工作尚待进行。

参 考 文 献

- 1 卢圣栋等. 现代分子生物学实验技术. 北京:高等教育出版社,1993,294
- 2 Sambrook J, et al. Molecular cloning a laboratory manual 2nd ed. Cold Spring. Laboratory Press, 1989. 19~25
- 3 Sudoh T, Kangawa, et al, Natriuretic peptide family: anp and bnp nature. 1988,332(3):78~81
- 4 Minamino, et al. Birstribulion and molculai fomns of Bnp in the central nergous aystem, heart and peripheral pissue of rat. BBRC,1989,165(2):880~887
- 5 蔡良琬. 核酸研究技术. 北京:科学出版社,1993. 305~325