

IBV S1 基因 RT-PCR 产物的分子克隆^{*}

王林川 刘福安

(华南农业大学动物医学系, 广州 510642)

摘要 报道了在两条引物的 5' 端加有不同酶切位点的 IBV D41 株 S1 基因 PCR 产物与 pUC18 进行分子克隆的研究情况。采用自己改进的微量基因克隆的方法, 经回收的插入片段的分子量大小及 Hae III 酶切分析, 证明获得了两株重组质粒转化子。

关键词 IBV; S1 基因; PCR; 分子克隆

中图分类号 S855.3

用 PCR 技术可使一个目的基因扩增到百万个拷贝, 进而可直接克隆插入任一基因载体。PCR 产物插入载体的方法主要有 3 种 (Innis, 1990): (1) 钝性末端连接, 此法产率较低; (2) 引物内部设计有限制性酶切位点, 再行粘性末端连接, 此法对引物与模板的结合有影响, 拟在不影响模板序列时应用; (3) 在引物的 5' 端加有限制性酶切位点, 再行粘性末端连接, 此法对 PCR 本身无影响, 克隆时产率也较高。本文报告了用 (3) 法对 IBV S1 基因经 RT-PCR 后, 进而插入 pUC18 中保存的工作情况, 为基因的表达、核酸探针的制备和基因的测序等做好准备。

1 材料与方法

1.1 获取方法

IBV D41 株 (陈天杰等, 1987)、M41 株 S1 基因的 RT-PCR 产物见文献 (王林川, 1994a), 1 μ L 电泳后紫外检测仪上可见清晰条带。

1.2 PCR 引物设计

两条引物为 27 个碱基, S1 Oligo 5' 引物的 5' 端加有 Hind III 酶切位点, 再外加 CA 两碱基用以保护, S1 Oligo 3' 引物的 5' 端加有 BamH I 酶切位点, 再外加 TT 两条碱基用以保护。

1.3 主要试剂及质粒

Hind III (1×10^7 单位/L), BamH I (1×10^7 单位/L) 为 BM 公司产品; Hae III (2×10^7 单位/L)、pUC18 为北京协和科技开发公司产品; T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品; E coli DH5 α 由华南农业大学中心实验室胡维民老师提供。

1.4 IBV D41 S1 基因 PCR 产物及 pUC18 的酶切

1.4.1 PCR 产物酶切 10 \times Buf 10 μ L, ddH₂O 54 μ L, DNA 30 μ L, BamH I 3 μ L, Hind III 2 μ L, 37 $^{\circ}$ C 3 h。

1.4.2 pUC18 酶切 10 \times Buf 5 μ L, ddH₂O 37 μ L, DNA 4 μ L, BamH I 2 μ L, Hind III 2 μ L, 37 $^{\circ}$ C 3 h。

1995-11-14 收稿

^{*} 高校博士点科研基金和国家自然科学基金资助

1.5 酶切产物的纯化

酶切产物用等量苯酚/氯仿抽提,加 2.5 mol/L 醋酸铵及 1 倍体积无水乙醇,室温 10 min,以 15 000 r/min 离心 20 min,去上清,再用 70%冷乙醇轻洗沉淀,以 15 000 r/min 离心 10 min,加 15 μ L~20 μ L ddH₂O 溶解。

1.6 IBV D41 S1 基因 PCR 产物及 pUC18 酶切产物的连接

10 \times Buf 2 μ L, pUC18 5 μ L, PCR 产物 5 μ L, 65 $^{\circ}$ C 2 min 后, T4 DNA 连接酶 1 μ L, ddH₂O 7 μ L 混匀, 12 $^{\circ}$ C 24 h。

1.7 IBV D41 S1 基因 PCR-pUC18 连接物的转化

(1) 取 *E. coli* DH5 α 菌种一环接于 4 mL LB 液体培养基(种子培养), 37 $^{\circ}$ C 振荡 16 h; (2) 80 μ L 种子菌于 8 mL 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡 3.5 h; (3) 冰浴 10 min, 1.4 mL/管(1.5 mL Eppendorf 管)分装, 以 7 500 r/min 离心 5 min(TGL G16 型高速台式离心机, 下同)去上清; (4) 菌体悬浮在 50 mmol/L 冷 CaCl₂ 中, 750 μ L/管, 冰浴 30 min, 以 7 500 r/min 离心 5 min, 去上清; (5) 菌体悬浮在 50 mmol/L 冷 CaCl₂ 中, 94 μ L/管, 4 $^{\circ}$ C 18 h~19 h; (6) 取 2 μ L、8 μ L 重组 DNA 连接物分别加入一 E 管中, 另一 E 管不加, 4 $^{\circ}$ C 30 min、42 $^{\circ}$ C 3 min、4 $^{\circ}$ C 10 min; (7) 加 LB 液体培养基 800 μ L/E 管, 37 $^{\circ}$ C 1 h; (8) 加有重组 DNA 的两 E 管, 各取 120 μ L, 各涂两块 Amp⁺ 麦康凯平板; 未有重组 DNA 的 E 管各取 60 μ L, 涂于一 Amp⁺、另一 Amp⁻ 麦康凯平板 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h, 挑出白色菌落作为重组质粒受体菌来检测。

1.8 重组质粒的鉴定

1.8.1 重组质粒的抽提 (1) 将上述筛选出的重组质粒受体菌株进行冷冻保种; (2) 取一环菌种接于含 100 g/L Amp 的 1.5 mL LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡 16 h; (3) 冰浴 15 min, 15 000 r/min 离心 15 s, 去上清; (4) 加 100 μ L Sol I (50 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L EDTA, 25 mmol/L pH8.0 Tris-HCl), 旋涡混合器振荡匀(溶菌), 冰浴 10 min; (5) 加 200 μ L Sol II (200 mmol/L NaOH, 1% SDS), 温和振荡, 冰浴 10 min; (6) 加 150 μ L Sol III (3 mol/L pH4.8 NaAc), 温和振荡, 冰浴 30 min; (7) 10 000 r/min 离心 20 min, 约 450 μ L 上清液转移到另一 E 管中, 加 1 mL 预冷的无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 2 h 以上; (8) 15 000 r/min 离心 10 min, 去上清, 倒放于滤纸风干; (9) 加 50 μ L TE 混匀, 加 0.5 μ L RNase (1 \times 10⁷ 单位/L), 37 $^{\circ}$ C 15 min; (10) 用等体积苯酚(pH8.0)抽提, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液; (11) 重复(10)1~2 次; (12) 用等体积的氯仿/异戊醇(24:1)抽提 1 次, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清; (13) 加 Sol III 5 μ L 和两倍体积的无水乙醇-20 $^{\circ}$ C 2 h 以上; (14) 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 风干, 50 μ L ddH₂O 溶解; (15) 取 2 μ L 于 1% 琼脂糖电泳检查, 并粗计含量。

1.8.2 重组质粒 DNA 的酶切 DNA 20 μ L, 10 \times Buf 4 μ L, BamH I 2 μ L, Hind III 2 μ L, ddH₂O 12 μ L, 37 $^{\circ}$ C 3 h; 酶切溶液与 DNA 分子量标记物同时电泳, 紫外分析仪检查有无 1.7 kb 左右的插入片段。

1.8.3 重组质粒 DNA 插入片段的回收 (1) 在紫外灯下切下进入低熔点琼脂糖中 1.7 kb 左右的 DNA 区带胶条, 除去多余凝胶, 把胶条放入小 E 管中; (2) 加 1/3 体积的苯酚, 1/15 体积的 3.3 mol/L NaCl, 65 $^{\circ}$ C 水浴中保温 10 min, 间歇振荡数次, 使胶融化; (3) 8 000 r/min 离心 1 min 以分相; (4) 移出水相, 用饱和酚再抽提一次; (5) 水相中加至 2.5 mol/L NH₄Ac, 1 倍体积乙醇, 室温 10 min; (6) 15 000 r/min 离心 20 min。弃上清; (7) 风干, 沉淀溶于 25 μ L ddH₂O 中。

1.8.4 重组质粒插入片段的酶切分析 回收 DNA 8.5 μ L, 10 \times Buf 1 μ L, Hae III 5 μ L, 37 $^{\circ}$ C 1 h; 酶切溶液与 DNA 分子量标记物、IBV D41 株和 M41 株 S1 基因 PCR 产物的 Hae III 酶切产物(王林川, 1994b)同时电泳, 紫外分析仪检查。

2 结果

2.1 BamH I、Hind II 酶活性

用同一种缓冲液, 分别用单一内切酶、两种酶混合于 37 $^{\circ}$ C 3 h 酶切 pUC18 质粒, 两单一酶得到相同大小的线状片段, 双酶则得到略小于单一酶酶切的线状片段, 说明酶活性良好。

2.2 DNA 酶切效果

双酶酶切 pUC18 3 h, 取 8 μ L 电泳, 仅见线状质粒状态, 说明酶切完全。

2.3 酶切产物的纯化效果

纯化的双酶切 D41 S1 基因 PCR 产物经电泳检查无引物带, 说明此纯化方法效果良好。

2.4 PCR 产物与 pUC18 连接

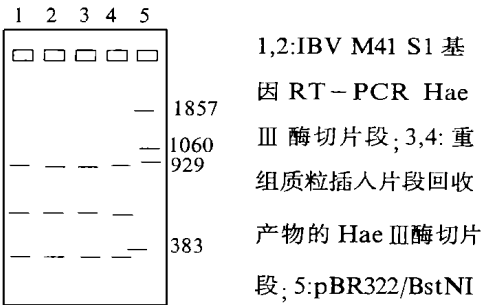
电泳检查出现两者的连接物。

2.5 连接物的转化情况

未加重组 DNA 的感受态细菌在 Amp⁺ 平板上未长, Amp⁻ 平板上铺满。在重组 DNA 平板上得有白色菌落 15 个, 抽提其质粒 DNA, 电泳后紫外光下检测结果均有重组子 DNA 的分子量大小; 但用 Hind III、BamH I 双酶切这 15 个菌落的抽提质粒 DNA, 有 2 个出现 PCR 产物大小的酶切片段, 这 2 个阳性转化子命名为 pIBVS1 I. D41 和 pIBVS1 II. D41。另 13 个双酶切无结果。

2.6 重组质粒插入片段的 Hae III 酶切结果

电泳检查发现 2 重组质粒的插入片段为 1.7 kb 左右, 其 Hae III 酶切产物与 IBV D41、M41 株 S1 基因 PCR 产物的 Hae III 酶切结果一致, 有 3 条分子量大小一致的条带(见图 1)。



3 讨论与结论

3.1 本研究获得了含 IBV D41 S1 基因片段的两个重组质粒 pIBVS1 I. D41 和 pIBVS1 II D41。

3.2 通过研究, 对获得 PCR 产物的重组质粒认识到需要有一些先决条件, 如质粒的纯度要高, PCR 产物以新制备的为好等, 但曲折最多的是受体菌的使用。据试剂公司产品说明, 在 LB 培养基中生长的 *E. coli* JM 103 对 pUC 系统质粒转化亦良好, 因当时手头上只有 JM103 受体菌株, 转化时却无结果, 由此而反反复复检查诸因素达半年之外, 最后只换受体菌株为 *E. coli* DH5 α 即出结果; 对本实验前期结果不理想的原因, 推则 JM103 的感受态制备需在 M9 培养基活化才会有较好活性, 此问题提请从事这方面工作的人员探讨与借鉴。

3.3 对研究中出现 15 个重组菌落中有 13 个不能用原来连接的两个酶双酶切出插入片段这一现象, 在 1994 年首届全国禽病分子生物学研讨会上多位一线工作者都云碰到此类情况, 其可能原因是分子克隆过程中酶的识别位点有甲基化, 使酶不能再发生作用。

3.4 对基因工程技术方法上的创新和改进是一个极富吸引力的课题。本研究在经典分子克隆方法 (Sambrook, 1989; 彭秀玲, 1987) 指导下摸索出适合自己实验室的一套 PCR 产物的微量分子克隆方法, 为今后的研究打下了良好的基础, 也丰富基因工程的技术方法。

参 考 文 献

- 王林川, 刘福安, 林维庆等. 1994a. 禽传染性支气管炎病毒免疫原基因的 RT-CPCR 研究. 中国兽医杂志. 20(8): 3~4
- 王林川. 1994b. 禽传染性支气管炎病毒免疫原基因 cDNA 的构建与鉴定: [学位论文]. 广州: 华南农业大学动物医学系
- 陈天杰, 梁眷衡, 辛朝安, 等. 1987. 鸡传染性支气管炎 D41 等弱毒株的培育与抗原性筛选试验. 广东农业科学. 79(4): 41~43
- 彭秀玲, 袁汉英. 1987. 基因工程实验技术. 长沙: 湖南科学技术出版社, 5~106
- Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. California: Academic Press. Ing 76~83.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1.1~1.110

RESEARCH ON THE MOLECULAR CLONING OF THE RT-PCR PRODUCTS OF IBV S1 GENE

Wang Linchuan Liu Fu'an

(Dept. of Vet. Med. South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

The S1 gene of IBV strain D41 was isolated by RT-PCR using two primers (oligo 5' and oligo 3') which were synthesized with a Hind III cleavage site added to the 5' end of oligo 5' and a BamHI site added to the 5' end of oligo 3'. The gene was cloned into pUC18. By checking the DNA molecular weight and digestion of the recovered insert with Hae III it was confirmed that two recombinant plasmids were obtained.

Key words IBV; S1 gene; PCR; molecular cloning