

Red 体内同源重组介导的 *egfp*、*kan* 基因融合和重组质粒构建 Gene Fusion of *egfp* & *kan* and Recombinant Plasmid Construction by Red Mediated *in vivo* Homologous Recombination

吴 洋^{1,2} 李山虎¹ 施庆国¹ 刘党生² 周建光^{1*}

WU Yang^{1,2} ,LI Shan-Hu¹ ,SHI Qing-Guo¹ ,LIU Dang-Sheng² and ZHOU Jian-Guang^{1*}

1 军事医学科学院生物工程研究所 ,北京 100850

2 沈阳药科大学 ,沈阳 110015

1 Institute of Biotechnology ,Academy of Military Medical Sciences ,Beijing 100850 ,China

2 Shenyang Pharmaceutical University ,Shenyang 110015 ,China

摘 要 重组工程是近年来建立的一种基于高效率体内同源重组的新型遗传工程技术 ,可应用于靶 DNA 序列的敲入、敲除和基因克隆等。在应用重组工程技术进行基因亚克隆时发现 ,体外重叠 PCR 法难以获得高质量的目的 DNA 靶片段 ,严重影响重组效率。为了解决上述问题 ,根据 Red 重组酶介导的体内同源重组工作原理进行了技术改进。先用 PCR 方法合成 *egfp* 和 *kan* 两条末端互补的线性 DNA 片段 ,然后将其电击共转化进入携带 Red 重组酶和 pcDNA3.1 载体 DNA 的大肠杆菌 DY331 菌株内 ,经体内同源重组直接产生的 pcDNA3.1-*egfp-kan* 环状重组质粒 DNA 分子可通过抗生素标记筛选获得 ,阳性率可达到 45% ,瞬时转染 pcDNA3.1-*egfp-kan* 可获得绿色荧光蛋白在 293 细胞中的表达。

关键词 重组工程 ,Red 重组酶 ,基因体内融合 ,重组质粒构建

中图分类号 Q812 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)04-0598-04

Abstract Recombineering ,a new genetic engineering technology based on high efficiency *in vivo* homologous recombination ,can be used in target DNA knock-in ,knock-out and gene cloning. In the process of gene subcloning mediated by Recombineering technique ,high-quality target DNA fragments were difficult to obtain using *in vitro* overlapping PCR ,therefore the efficiency of *in vivo* homologous recombination was severely interrupted. To solve this problem ,some technology improvements have been established based on the principle of Red recombinases. The PCR DNA fragments of *egfp* and *kan* genes with complementary sequences on the end of each fragment were co-introduced into a pcDNA3.1 vector and Red recombinases containing *E. coli* DY331 host cells by electroporation. A recombinant plasmid pcDNA3.1-*egfp-kan* was screened directly by antibiotic marker. The positive rates can reach to 45%. The EGFP gene expression of pcDNA3.1-*egfp-kan* can be observed by transient transfection of 293 eukaryotic cells.

Key words recombineering ,Red recombinases ,*in vivo* gene fusion ,recombinant plasmid construction

Received : December 1 2006 ; Accepted : January 9 2007.

This work was supported by the grant from the Medical Science Foundation of PLA(No.06MA329).

* Corresponding author. Tel :+ 86-10-66948713 ;E-mail :zhoujgx@public.bta.net.cn

全军医药卫生科研基金(No.06MA329)资助。

重组工程(recombineering)是近年来建立的一种新型遗传工程技术^[1],是用 PCR 方法合成一条携带约 40 个碱基同源臂的线性 DNA 片段作为打靶序列,将打靶序列电击转化进携带噬菌体重组酶的大肠杆菌体内,通过重组酶介导的高效率的体内同源重组反应,对目的 DNA 序列进行基因敲入、敲除、替换等操作^[4,5]。该技术在对细菌染色体 DNA 改造、对携带数百 kb 基因组 DNA 片段的 BAC 质粒修饰以及构建重组质粒 DNA 方面显示出了传统分子生物学技术无法替代的优势。随着基因测序工作的完成和基因组学工作的开展,重组工程技术正在受到越来越多的关注。

λ -噬菌体重组酶 Red 由 Exo、Beta 和 Gam 3 种蛋白组成。Exo 具有核酸外切酶的功能,能降解线性双链打靶序列 DNA 的 5' 末端,Beta 则与暴露出的 3' 端单链 DNA 结合并促进同源重组。Gam 抑制大肠杆菌中 RecBCD 的外切核酸酶活性,保证线性 DNA 打靶分子在体内不会被降解^[2,3]。

我们根据 Red 重组酶介导体内同源重组的工作原理,先以 *egfp* 和 *kan* 为 DNA 模板,PCR 方法分别合成两条末端互补重叠的 DNA 序列,然后将其共同电击转化进入已携带 Red 重组酶和 pcDNA3.1 载体 DNA 的大肠杆菌 DY331 内,*egfp* 和 *kan* 在体内通过 Red 介导的同源重组构成融合 DNA 片段,*egfp-kan* 融合基因目的片段与 pcDNA3.1 载体发生体内重组

后产生质粒重组子,通过卡那霉素和氨苄青霉素双抗性筛选出重组子 pcDNA3.1-*egfp-kan*。瞬时转染 pcDNA3.1-*egfp-kan* 可获得绿色荧光蛋白在真核细胞中的表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和细胞株:菌株 *E. coli* DH5 α 、DY331、293 细胞,质粒 pcDNA3.1 均为本室保存。

1.1.2 工具酶和试剂:Super Taq DNA 聚合酶、Taq DNA 聚合酶为申能博彩生物公司产品;*Eco*R I 限制性酶为 TaKaRa 公司产品;质粒提取试剂盒和 PCR 产物回收试剂盒购自 Promega 公司;高效真核转染试剂盒购自威格拉斯公司;PCR 引物为上海英骏生物技术有限公司合成。

1.1.3 PCR 扩增引物:引物序列见表 1,小写字母代表同源臂序列,大写字母代表 PCR 扩增引物序列,带下划线的大写字母代表外加连接两个基因的弹性氨基酸序列。其中 P2 和 P3 扩增 *egfp* 基因,P4 和 P5 扩增 *kan* 基因。P3(5'-GTATGGCTGGATCAGTTATCTAGATCCGG-3')和 P4(5'-ccggatctagataactgacCAGCCA TAC-3')有 29bp 同源区,以便 *egfp* 和 *kan* 基因在体内互搭成 *egfp-kan* 串联片段。P2 和 P5 携带质粒的同源臂。P1 和 P3 作为鉴定 *egfp* 基因的引物。

表 1 引物序列

Table 1 Primers used in this paper

No.	Primer sequences
P1	5'-gtctatataagcagagctctGACATAGCTTACTGGGACG-3'
P2	5'-catagcttaactgggacgaagacgaactcttcatcgCCGGTCGCCACCATGTG-3'
P3	5'-GTATGGCTGGATCAGTTATCTAGATCCGG-3'
P4	5'-ccggatctagataactgacCAGCCATACTAGAAGAACTCGTCAAGAAG-3'
P5	5'-gatggattccaattcagcggggagccacctgalagcctTATGGACAGCAAGCGAACC-3'

1.2 方法

1.2.1 线性双链 DNA 的制备:PCR 法扩增带同源臂和互补序列的目的基因,产物用 Promega 试剂盒纯化回收,定量。作为电转打靶序列备用。

1.2.2 感受态的制备与电击转化:将过夜培养的大肠杆菌 DY331(携带 pcDNA3.1)按 50:1 的量转接,振荡培养至 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$ 。取 15mL 培养液于 42℃ 诱导 15min 后冰浴 30min。离心收集菌体,用去离子水洗 3~4 次,最后用 100 μ L 冷的去离子水重悬菌体得到 DY331 感受态,取 48 μ L 感受态与两种打靶 DNA 片段各约 300ng 进行一次性电转。电转条件参照 Yu^[5]等人的方案进行。

1.2.3 转染:转染前 24h 接种适量 293 细胞于六孔板,转染前 1h 换液。取 3 μ g 质粒 DNA 稀释到 100 μ L,取 VigoFect 脂质体 2 μ L 稀释到 100 μ L,室温放置 5min。将稀释的 VigoFect 逐滴加入稀释的 DNA 溶液中,将该转染工作液在室温放置 15min。将转染工作液逐滴加入六孔板培养液中,24h 后观察。

2 结果

2.1 Red 介导外源基因体内融合和基因克隆的新策略

2.1.1 引物设计:按照重叠 PCR 原理设计引物,使目的基因在 PCR 过程中加载同源臂序列。引物 P2

和 P3 用于扩增 *egfp* 基因 其中 P2 的 5'端 38bp 为同源臂序列,与质粒载体上游 DNA 序列同源。引物 P4 和 P5 用于扩增 *kan* 基因 其中 P5 的 5'端 38bp 为同源臂序列,与载体质粒下游 DNA 序列同源。另外 P4 的 5'端和 P3 有 29bp 序列互补,以提供 *egfp* 和 *kan* 基因在体内发生重组的同源序列,引物设计如图 1 所示。

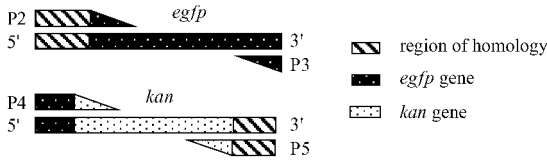


图 1 设计重组引物

Fig.1 Designing primers for recombination

2.1.2 基本策略:将上述 *egfp* 和 *kan* 片段经纯化后同时电转入含 pcDNA3.1 质粒载体的 DY331 受体菌中。我们按照 Red 重组酶的作用原理推测,由于引物设计时已经在 *kan* 片段上游引入 29 bp 与 *egfp* 片段下游互补的同源序列,*egfp* 和 *kan* 线性 DNA 分子的两端在 Exo 核酸外切酶的作用下可产生 3'末端突出的单链 DNA, Beta 可以与其结合并促进 *egfp* 和 *kan* 同源重组,接下来在体内 DNA 聚合酶的作用下构成双链 *egfp-kan*(1851bp)融合基因 DNA 片段(如图 2)。

因为敲入的外源 DNA 片段中含有一个卡那霉素抗性基因筛选标记,可以一次性方便地通过卡那霉素抗性筛选得到敲入 *egfp-kan* 融合片段的重组质粒 pcDNA3.1-*egfp-kan*。然后通过 PCR 鉴定便可得到预期的重组质粒。整个实验思路如图 3 所示。

2.2 pcDNA3.1-egfp-kan 重组质粒的筛选

发生 DNA 重组的菌株应该能在氨苄、卡那霉素双抗 LB 平板上生长。对挑取的克隆进行 PCR 鉴定 表明重组效率为 45% ~ 87%。提取重组质粒进行 PCR 鉴定,引物 P2/P3 扩增产生 900bp *egfp* DNA

片段,引物 P4/P5 扩增产生 1kb 的 *kan* DNA 片段(图 4A)。EcoR I 酶切电泳条带与预期结果一致(图 4B 和 C)。对重组质粒中外源基因进行测序分析 结果表明 *egfp-kan* 外源基因序列正确,说明重组质粒构建成功。阳性克隆命名为 pcDNA3.1-*egfp-kan*。

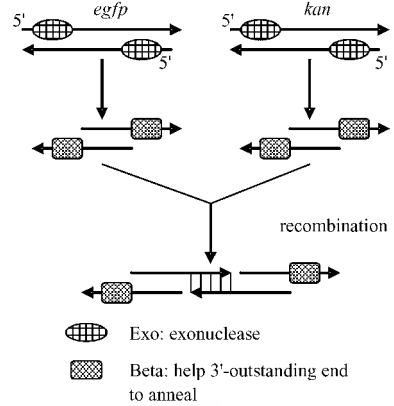


图 2 egfp、kan 片段体内重组形成融合片段
Fig.2 The fusion of egfp and kan fragments in vivo by recombination

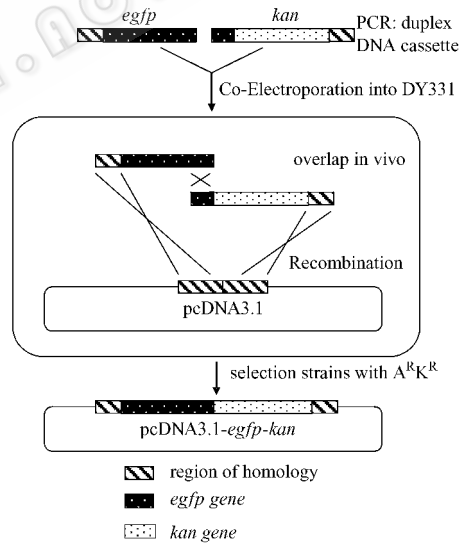


图 3 共电转敲入 egfp 基因流程图
Fig.3 Flue chart for co-electroporation of two DNA fragments to knock in gene egfp

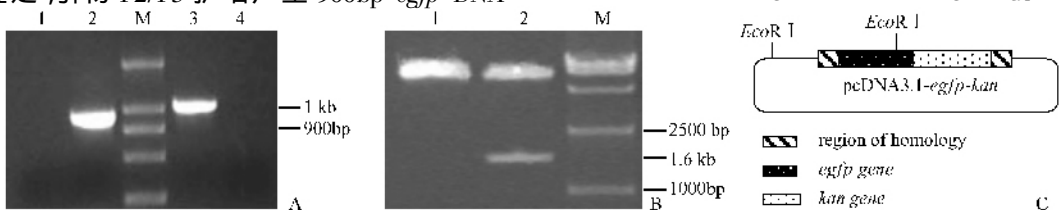


图 4 PCR 鉴定图(A) 纯化的重组质粒 EcoR I 酶切鉴定图(B)及重组质粒的 EcoR I 酶切位点示意图(C)

Fig.4 Identification of pcDNA3.1-egfp-kan by PCR amplification of egfp and kan (A), Identification of purified recombinant plasmid with EcoR I restriction enzyme(B) and diagram for sites of EcoR I restriction enzyme on recombinant plasmid(C)

A, M: marker DL2000; 1: pcDNA3.1; 2: pcDNA3.1-egfp-kan (egfp amplified by P2/P3); 3: pcDNA3.1-egfp-kan (kan amplified by P4/P5) 4: pcDNA3.1. B, M: marker DL15000; 1: pcDNA3.1; 2: pcDNA3.1-egfp-kan.

2.3 pcDNA3.1-*egfp-kan* 重组质粒表达能力的检测
用阳性重组质粒 pcDNA3.1-*egfp-kan* 和对照质粒 pEGFP-C1 分别转染 293 细胞, 24h 后观察到样品和阳性对照均产生绿色荧光, 说明所构建的重组质

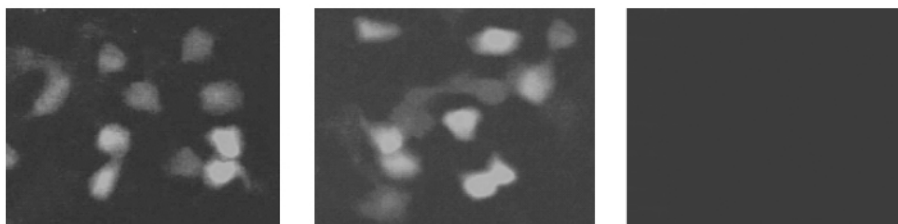


图 5 重组质粒 pcDNA3.1-*egfp-kan* 转染 293 细胞

Fig.5 Transfection of 293 with recombinant plasmid pcDNA3.1-*egfp-kan*. pEGFP-C1 is used as positive control. It is observed 24h post-transfection.

1 : pcDNA3.1-*egfp-kan* 2 : pEGFP-C13 : negative control.

3 讨论

重组工程技术不依赖于限制性内切酶, 可直接利用线性 DNA 分子通过体内同源重组构建重组 DNA 分子^[1,5]。因此, 制备高质量的线性 DNA 打靶片段是实验成功的关键。目前同源重组技术打靶 DNA 片段的形式主要有线性双链 DNA、寡核苷酸单链^[6,7]、互搭的两条单链寡核苷酸^[8,9], 多数集中于突变修复的应用及功能和机理研究中, 而对基因敲入的研究较少^[4], 特别是基因融合的研究。

目前, 制备较大基因或者多基因敲入的线性 DNA 打靶片段需要采用重叠 PCR 技术, 是将 2 个或多个基因片段通过末端互补重叠延伸的方法进行体外基因拼接的 DNA 重组技术。但是受 DNA 聚合酶和 4 种核苷酸质量的影响, PCR 扩增较长片的过程中容易引入突变。另外, 受 PCR 引物特异性的影响, 有时很难获得特异性好的长的 PCR 产物。

我们依据重组酶的作用原理对体外基因融合技术作出改进, 即将 *egfp* 和 *kan* 2 条 DNA 片段同时电转入携带环质粒载体的受体菌中, 让两条 DNA 片段在 Red 重组酶 Exo 作用下在体内通过同源重组生成一条 *egfp-kan* 融合 DNA 序列, 这样就可通过一次电转同时完成 DNA 片段的融合及亚克隆(基因敲入)。经重复试验证明本方法的重组效率可达到 45% ~ 87%, 表明此种改进可行, 解决了两个问题: 其一, 两基因融合片段不必在体外做重叠 PCR, 简化了实验步骤, 避免突变和非特异条带产生; 其二, 在质粒载体无合适限制酶位点的情况下, 若不要求无痕基因敲入操作, 只需一次性将目的基因和筛选标记基因 2 条线性 DNA 片段共转入携带质粒载体的受体菌中即可获得重组质粒。

另外, 我们推测, 在质粒载体可以被线性化的情

况下, 可以将 2 条甚至多条末端互补重叠的线性外源目的 DNA 片段共转入受体菌中, 在 Red 重组酶和 DNA 聚合酶的作用下多基因体内融合形成重组质粒。这种体内融合和重组质粒构建方法可以节省花费和时间, 提高工作效率。为需要依次敲入多个目的基因的工作提供了一种新的思路。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Zhou JG(周建光), Hong X(洪鑫), Huang CF(黄翠芬). Recombineering and its application. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报) 2003, **30**(10): 983-988.
- [2] Little JW. An exonuclease induced by bacteriophage lambda. II. Nature of the enzymatic reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 1967 **242**(4): 679-686.
- [3] Yu DG, Sawitzke JA, Ellis H, et al. Recombineering with overlapping single-stranded DNA oligonucleotides: testing a recombination intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, **100**(12): 7207-7212.
- [4] Ellis HM, Yu D, DiTizio T, et al. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001 **98**(12): 6742-6746.
- [5] Yu D, Ellis HM, Lee EC, et al. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000 **97**(11): 5978-5983.
- [6] Yin WX, Wu XS, Liu G, et al. Targeted correction of a chromosomal point mutation by modified single-stranded oligonucleotides in a GFP recovery system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005 **334**: 1032-1041.
- [7] Huen MSY, Lu LY, Liu DP, et al. Active transcription promotes single-stranded oligonucleotide mediated gene repair. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007 **353**: 33-39.
- [8] Chen W(陈伟), Yu M(于梅), Li SH(李山虎). Gene knockout and knockin on the *Escherichia coli lac* operon *oci* using pBR322-Red system. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2005 **21**(2): 192-197.
- [9] Søren Warming, Nina Costantino, Donald L Court, et al. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Research* 2005 **33**(4): e36.