

# 用绿色荧光蛋白基因作为筛选标记的新型克隆载体的构建

李寿东 齐义鹏\* 胡建红 林 宏

(武汉大学病毒研究所 武汉 430072)

目前通常使用的质粒克隆载体,如 pUC 系列、pGEM 系列和 pBluescript 等,都是以 lacZ' 作为筛选标记的插入失活型载体。lacZ' 编码  $\beta$ -半乳糖苷酶 N 端的一个片段,称为  $\alpha$ -肽。异丙基-硫代半乳糖苷 (IPTG) 可诱导  $\alpha$ -肽的合成,它能与宿主细胞所编码的缺陷型  $\beta$ -半乳糖苷酶实现基因内互补( $\alpha$ -互补),产生具有完整酶活性的二聚体。带有质粒载体的细菌在含有生色底物 5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-半乳糖苷(X-gal)的培养基上生成蓝斑。外源片段插入到载体上位于 lacZ' 5' 端编码序列内的多克隆位点后,可阻断 lacZ' 编码序列,破坏  $\alpha$ -互补作用。菌落形成白斑,因此可利用蓝/白斑显色平板筛选重组子。

绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein,简称 GFP)基因是一个新的标记基因<sup>[1]</sup>,来源于多管水母属的 *Aequorea victoria*,编码 238 个氨基酸残基,分子量为 2 688Da。经蓝光或紫外激发而发射绿色荧光。其吸收波长为 395nm,发射波长为 509nm<sup>[2]</sup>。GFP 的生色基团是由位于 65~67 位的 Ser、Tyr 和 Gly 被修饰后共价连接而形成的。GFP 构象非常稳定,不会发生光漂白,在异源细胞中表达的 GFP 能保持它的荧光特性<sup>[1,3]</sup>。GFP 突变体 GFP<sub>S65T</sub>是用点突变技术将野生型 GFP65 位 Ser 突变成 Thr。GFP<sub>S65T</sub>吸收波长向可见光部分移动(490nm),且吸收强度比野生型 GFP 增强 6 倍,可发射更强的绿色荧光<sup>[4]</sup>。由于 GFP 产生荧光不需要加入任何外源底物或辅助因子,在细菌细胞内高水平表达可使菌落呈现绿色,为此我们构建了以 gfp<sub>S65T</sub>基因作为筛选标记的新型克隆载体,建立了以绿/白斑显色平板筛选阳性重组子的新方法,替代 lacZ' 的蓝/白斑筛选法,且不需使用 X-gal。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

带有 gfp<sub>S65T</sub>基因 BamHI 片段的原核表达载体 pGFP<sub>S65T</sub>由美国加州大学 Tsien 博士赠送;pUC19 质粒购自 Promega 公司; $\lambda$ DNA/HindIII 片段、限制酶、T4 连接酶、Klenow 酶、IPTG、X-gal 和银染测序试剂盒均购自 Promega 公司。

### 1.2 方法

质粒 DNA 的提取和限制酶消化、DNA 片段的回收、5' 突出端的补平、平端连接反应等按常规方法进行。银染色法测定插入片段与载体连接位点的核苷酸序列按 Promega 公司提供的技术手册进行。

## 2 结果和讨论

### 2.1 以 gfp<sub>S65T</sub>基因作为筛选标记的克隆载体的构建

用 EcoRI 和 BamHI 双酶消化 pGFP<sub>S65T</sub>-DNA,补平限制性片段 5' 突出端,回收 gfp<sub>S65T</sub> ORF700bp 片段,将此片段与经 SmaI 酶切的 pUC19 进行连接(构建过程见图 1)。连接产物转化大肠杆菌 TG1 感受

国家自然科学基金和国家九五攻关项目资助课题。

\* 联系与负责作者。

本文于 1996 年 10 月 17 日收到。

态细胞,涂布 AP/IPTG + X-gal LB 平板。37℃ 培养 12h 后,平板上出现蓝斑和白斑。取出平板于室温放置 6h 后,一些白斑转变成绿斑(图 2)。挑取白斑和绿斑,小量提取质粒 DNA,酶切鉴定,结果证明来自绿斑和白斑的质粒都是阳性重组体,但  $gfp_{S65T}$ -ORF 插入  $SmaI$  位点的方向不同。银染法测定重组 DNA 连接位点核苷酸序列表明,绿斑来源的重组质粒上  $gfp_{S65T}$ -ORF 以同框方式在  $lacZ'$  起始密码子下游第 59 位插入,使  $gfp_{S65T}$  基因的表达受  $lacZ$  启动子-操纵基因控制,将此重组质粒命名为 pQLgreen(图 1)。带有 pQLgreen 的大肠杆菌 TGI 在 AP 平板上经 IPTG 诱导而表达 GFP<sub>S65T</sub>-部分  $\alpha$ -肽 N 端融合蛋白,融合蛋白在自然光下发出绿色荧光使菌落呈现绿色。

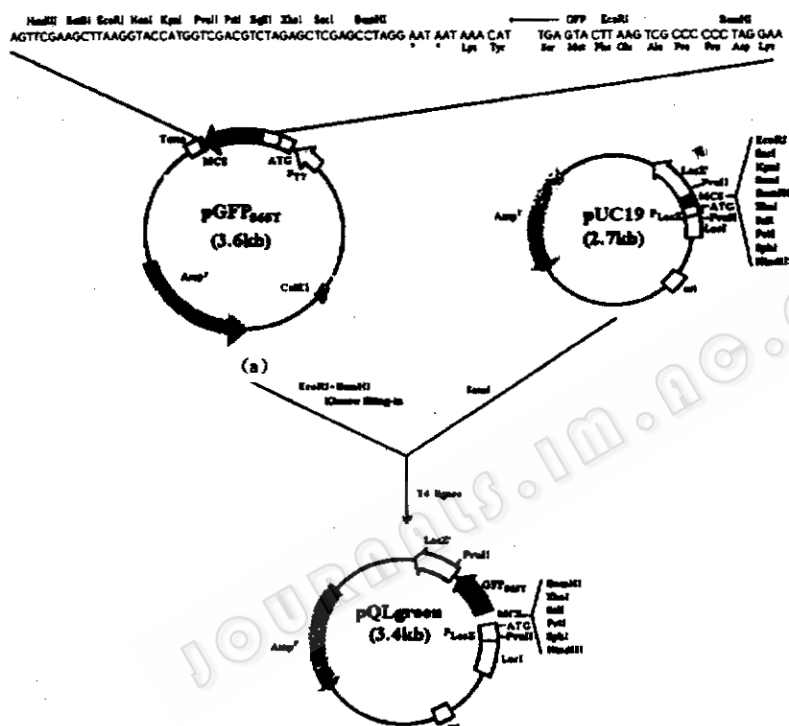


图 1 pQLgreen 克隆载体 pQLgreen 的构建过程

(a)  $gfp_{S65T}$  基因原核表达载体 pGFP<sub>S65T</sub> 示意图

将  $\lambda$ DNA HindIII 片段与用 HindIII 酶切的克隆载体 pQLgreen DNA 连接,转化大肠杆菌 TGI 感受态细胞,涂布 AP/IPTG LB 平板。37℃ 培养 18h 后,平板上出现绿斑和白斑(图 2)。挑取白斑和一个绿斑,小提质粒 DNA,用 HindIII 酶消化鉴定。来自白斑的质粒均有  $\lambda$  DNA HindIII 片段插入,而来自绿斑的质粒为载体 pQLgreen 自我环化的阴性结果。HindIII 位点插入外源 DNA 片段引起  $gfp_{S65T}$  基因插入失活,重组质粒转化的受体菌在 AP/IPTG LB 平板上呈白斑,可与载体转化的受体菌区分开来,从而证实了我们构建的以  $gfp_{S65T}$  基因为筛选标记的新型克隆载体的实用价值,和在分子生物学研究中的巨大潜力。

如何简便、快速、经济地筛选阳性重组体是分子生物学研究中的重要课题,好的筛选标记基因是解决这一问题的关键。目前使用的标记基因如  $lacZ$ 、CAT、luc 等均是利用酶促催化反应,需要加入外源底物和辅助因子,不仅操作繁琐而且价格昂贵。 $gfp$  基因是 1994 年报道的新的有极大应用价值的标记基因,野生型 GFP 只需要紫外光或蓝光照射就可发射绿色荧光。GFP 无毒,不需要任何底物和辅助因子,即可直接对生活细胞进行观察,而 GFP 的突变体 GFP<sub>S65T</sub> 其激发波长变长(490nm),因此可用自然光激发,

pQLgreen 在  $gfp_{S65T}$  基因起始密码子 ATG 前保留了 pUC19 多克隆位点中的 6 个限制性酶切位点: Hind III、SphI、PstI、SalI、XbaI 和 BamHI, 用来克隆外源 DNA 片段。在这些位点插入外源 DNA 片段,将阻断  $gfp_{S65T}$  基因编码序列,不能表达 GFP<sub>S65T</sub>-部分  $\alpha$ -肽 N 端融合蛋白,重组菌落在 AP/IPTG LB 平板上显白色,因而可用绿/白斑显色平板筛选重组 pQLgreen。为了证明我们构建克隆的载体 pQLgreen 的实用价值,我们用外源片段的克隆检验了这一载体。

## 2.2 克隆载体 pQLgreen 的检验



图2 蓝色、绿色和白色细菌

三种细菌分别来自 AP/IPTG + X-gal 平板上的蓝色、绿色和白色大肠杆菌 TGI 菌落。

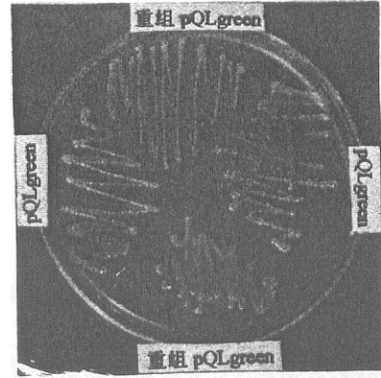


图3 AP/IPTG 平板上的绿色和白色细菌

绿色细菌带有 pQLgreen, 白色细菌带有克隆了  $\lambda$ DNAHind III 片段的重组质粒。

产生比野生型 GFP 强 6 倍的绿色荧光。根据 GFP<sub>S65T</sub> 的这一特性, 我们在 pUC19 的基础上设计并构建了利用绿斑和白斑来筛选重组质粒的新型克隆载体 pQLgreen, 经  $\lambda$  片段的插入证明 pQLgreen 是实用的。通过比较发现, 虽然绿斑和白斑筛选重组质粒的方法比蓝斑和白斑筛选方法速度稍慢, 颜色对比也不是那样一目了然, 但操作简便, 不需要昂贵的 X-gal (1g 约 6000 元, 每个平板使用 0.8mg), 因而从经济的角度看, 具有很大优势。pQLgreen 上限制性单酶切位点较少, 我们将进一步构建有更多克隆位点的以 gfp<sub>S65T</sub> 基因作为筛选标记的质粒载体, 使之更为实用。

#### 参 考 文 献

- [1] Chalif M, Tu Y, Euskirchen C *et al.* Science, 1994, 263:802~805.
- [2] Morise H, Shimamura O, Johnson F H *et al.* Biochemistry, 1974, 173:2656~2660.
- [3] Ward W W, Bokman S H. Biochemistry, 1982, 21:4535~4539.
- [4] Heim R, Cubitt A B, Tsien R Y. Nature, 1995, 373:663~664.

### Construction of a Novel Cloning Vector and Screening the Recombinants by Green and White Colonies

Li Shoudong Qi Yipeng Hu Jianhong Lin Hong  
(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072)

**Abstract** A novel cloning vector named pQLgreen was derived from pUC19 by insertion the ORF of gfp<sub>S65T</sub> gene into SmaI site of pUC19, under the control of LacZ promoter-operator. Host bacteria transformed by pQLgreen may grow to blue colonies on Ap/IPTG LB plates. Green tag lost when the multiple restriction sites upstream the gfp<sub>S65T</sub> ORF was inserted by foreign DNA fragments. The colonies of host bacteria with recombinant plasmid showed colorless. So we incorporate a new colour selection for insertion, different from the blue and colourless selection system. It is economical because it does not require the use of costly X-gal.

**Key words** Cloning vector, gfp<sub>S65T</sub>, selection, recombinant