

• 生物技术与方法 •

## 基于抗性恢复的高效克隆超短片段重组质粒的构建

刘美丽, 罗砚曦, 赵铮蓉, 阎辉

浙江省医学科学院药物研究所 浙江 杭州 310013

刘美丽, 罗砚曦, 赵铮蓉, 等. 基于抗性恢复的高效克隆超短片段重组质粒的构建. 生物工程学报, 2017, 33(7): 1190–1197.

Liu ML, Luo YX, Zhao ZR, et al. Cloning short gene fragment and constructing recombinant plasmid based on restoration of antibiotic resistance. Chin J Biotech, 2017, 33(7): 1190–1197.

**摘要:** 分子克隆作为一种常规技术被广泛应用于 DNA 及蛋白质的研究。在传统的分子克隆中, 主要通过限制性内切酶先分别消化目的 DNA 片段及载体, 再纯化回收, 然后用 DNA 连接酶将二者连接。而对一些超短基因片段 (<300 bp), 通过酶切及切胶纯化后, 回收率极低, 导致插入表达载体比较困难。文中介绍了一种新的利用质粒抗性恢复进行克隆的方法, 大大提高了克隆效率, 为短基因片段的分子克隆提供了一种高效的方法。

**关键词:** 分子克隆, 构建, 短基因片段

## Cloning short gene fragment and constructing recombinant plasmid based on restoration of antibiotic resistance

Meili Liu, Yanxi Luo, Zhengrong Zhao, and Hui Yan

*Institute of Materia Medica, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, Zhejiang, China*

**Abstract:** Molecular cloning is one of the most important and widely used technologies in molecular biology research. Generally, the target DNA fragment and the vector are separately digested by restriction enzyme, then purified and recovered, and then ligated with DNA-ligase. For some very short gene fragments (<300 bp), the recovery efficiency of the purified fragment is very low after digestion and cleavage, leading to the difficulty in its inserting into the expression vector. To address this issue, we developed a cloning method based on restoration of antibiotic resistance in constructing recombinant plasmid, which proved highly efficient in cloning very short gene fragments.

**Received:** January 17, 2017; **Accepted:** May 10, 2017

**Supported by:** Zhejiang Province Medical and Health Research Projects (No. 2014KYA041).

**Corresponding author:** Hui Yan. Tel: +86-571-88215439; E-mail: jipei2006@163.com

浙江省医药卫生科研项目 (No. 2014KYA041) 资助。

**Keywords:** molecular cloning, plasmid construction, short gene fragment

分子克隆技术是分子生物学和基因工程研究中的一种常用技术<sup>[1]</sup>。随着基因工程的发展,出现了一些新技术的应用,如 GATEWAY 系统<sup>[2-4]</sup>、In-fusion 系统<sup>[5-7]</sup>、尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (Uracil-DNA glycosylase, UDG)<sup>[8-10]</sup>以及连接非依赖克隆 (Ligation-independent cloning, LIC)<sup>[11-13]</sup>等。但这些新技术要么所需酶类价格昂贵 (如 GATEWAY 系统, In-fusion 系统), 要么应用条件苛刻 (如 LIC, 需要在重叠区段缺少某个特定核苷酸<sup>[11,14]</sup>), 无法广泛应用, 因而传统的酶切、连接方法仍然是分子克隆中使用最广泛的方法。

尽管传统的分子克隆技术改进了很多, 有的已转化为商品化的克隆试剂盒, 如 T 载体克隆<sup>[15-16]</sup>、重组融合 PCR<sup>[17-19]</sup>和 TOPO 克隆技术<sup>[20]</sup>等, 但对于将超长或超短 (<300 bp) 目的基因片段插入表达载体仍然比较困难, 尤其是后者。造成超短片难以克隆的主要原因是, 超短 DNA 片段经过必需的末端酶切处理和切胶纯化后, 通常损失殆尽, 难以回收足够量的末端修饰的 DNA 片段与载体连接。并且, 由于插入片段很短, 故重组体与空载体“背景”分子量几乎相同, 导致重组体的鉴别很困难。

本研究在构建人  $\beta$ -防御素-2 (Human  $\beta$ -defensin 2, HBD2) 表达载体的过程中, 探索出一种基于抗性恢复的表达质粒构建方法, 比较圆满地解决了上述难题。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 载体和宿主菌

真核载体 pCB, 宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  由本实验室保存。

#### 1.1.2 主要试剂

DNA marker 购自北京全式金生物技术有限公司。T4 DNA 连接酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司。实验中所使用的限制性内切酶购自 NEB 公司。DNA 纯化回收试剂盒、PCR 试剂盒、质粒提取试剂盒及琼脂糖均购自上海生工生物工程股份有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 人 $\beta$ -防御素-2 (HBD2) 引物设计与合成

根据人  $\beta$ -防御素-2 (HBD2) 的基因序列 (GenBank 登录号 AF040153.1), 采用 Vector NTI 软件设计一对 PCR 引物 (表 1), 由上海生工合成。以含人工合成 HBD2 基因片段的质粒

表 1 PCR 引物序列与预期产物长度

Table 1 PCR primers

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)
HBD2-Bm	CGCGGATCCATGAGAGTATTATATTTATTATTTTC	214
Spe-HBD2	CGGACTAGTATTATGGTTTTTTTACAACATTTAG	214
Amp-Sc	CTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTC	1 931

pMD-HBD2(另文报告)为模板,用上述引物及 *pfu* 酶进行 PCR 扩增。扩增条件:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 40 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳后,用 DNA 纯化回收试剂盒回收约 200 bp 的 HBD2 目的片段。

### 1.2.2 重组表达质粒的构建与鉴定

将真核载体 pCB 用 *Sca* I 和 *Stu* I 进行双酶切,37 °C 反应 3 h 后,取酶切产物电泳,在显像仪下观察,得两条目的条带,其中 1.7 kb 片段的两端分别包含 pCB 质粒的氨苄青霉素抗性基因 (Ap-r) 的半侧及多克隆位点,而 3.2 kb 片段则包含 Ap-r 抗性基因的另外半侧及质粒骨架(图 6),然后用 DNA 纯化回收试剂盒分别回收上述 DNA 片段。

将 HBD2 与 1.7 kb 的纯化产物等摩尔比混合,用 T4 DNA 连接酶连接。连接条件:25 °C 60 min, 60 °C 10 min。

以上述连接产物为模板,用 *pfu* 酶和引物 Amp-Sc 及 HBD2-Bm(表 1)进行 PCR 扩增,得到约 1.9 kb 的片段。扩增条件:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 40 s, 55 °C 30 s, 72 °C 4 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳后,用 DNA 纯化回收试剂盒回收目的片段。

用 *Sca* I 酶将回收的 1.9 kb 片段及之前的 3.2 kb 片段分别进行酶切,37 °C 反应 3 h。酶切产物用 1%琼脂糖凝胶电泳后,用 DNA 纯化回收试剂盒回收目的片段。将二者回收的片段等摩尔比混合,用 T4 DNA 连接酶连接,连接条件:25 °C 60 min, 60 °C 10 min。

将上述连接产物转化大肠杆菌感受态,接种于含氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 培养板,过夜后挑菌落进行 PCR 扩增鉴定,选取其中 1 个阳性菌落提取质粒。

### 1.2.3 重组质粒测序

构建好的质粒由上海生工生物工程股份有限公司进行序列测定。

### 1.2.4 PCB-HBD2 转染后的表达

重组质粒根据说明书与脂质体混合后转染 293 细胞,转染 4 h 后加入野生型痘苗病毒感染 2 h,然后加入含 2%新生牛血清的细胞培养液,48 h 后收集细胞和培养上清,在-80 °C/37 °C 反复冻融 3 次,离心取上清,得到重组病毒。载体质粒作为阴性对照进行相同处理。用病毒 RNA 抽提纯化试剂盒提取病毒 RNA,对其进行 RT-PCR 鉴定。

根据 TaKaRa 公司 PrimeScript™ RT Resgent Kit 试剂盒操作说明书合成 cDNA,以 cDNA 为模板,以 HBD2-Bm 和 Spe-HBD2 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 40 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

## 2 结果

### 2.1 HBD2 的 PCR 扩增

PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳,可看到在 200 bp 附近有一特异性的 DNA 条带,与预期目的条带 196 bp 相符(图 1)。

### 2.2 酶切载体

将真核载体 pCB 用 *Sca* I 和 *Stu* I 进行双酶切,在约 1.7 kb 和 3.2 kb 处有特异性条带(图 2)。

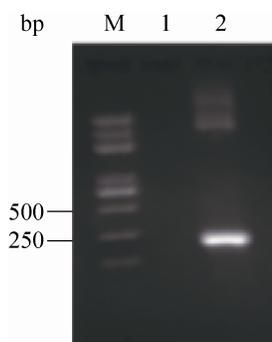


图1 HBD2 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification products of HBD2. M: DNA marker; 1: control; 2: HBD2 PCR products.

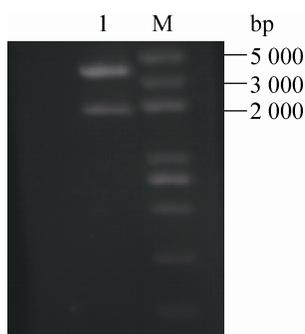


图2 pCB 质粒双酶切凝胶电泳结果

Fig. 2 Dual-restriction digestion of pCB plasmid. M: DNA marker; 1: pCB digested with *Sca* I and *Stu* I.

### 2.3 构建融合片段

将上述纯化后的 HBD2 PCR 产物与 pCB 酶切后 1.7 kb 片段连接, 并以连接产物为模板, 以 HBD2-Bm、Amp-Sc 为引物进行 PCR 扩增, 得到约 1.9 kb 片段 (图 3)。

### 2.4 重组质粒转化鉴定

用 *Sca* I 将回收的 1.9 kb 片段及之前的 3.2 kb 片段分别进行酶切, 酶切产物用 T4 DNA 连接酶连接, 连接产物转化大肠杆菌感受态, 接种于含 Amp 的 LB 培养板, 过夜后挑菌落进行 PCR 扩增鉴定, 结果见图 4, 有 6 个阳性菌落, 选其中 1 个测序鉴定。

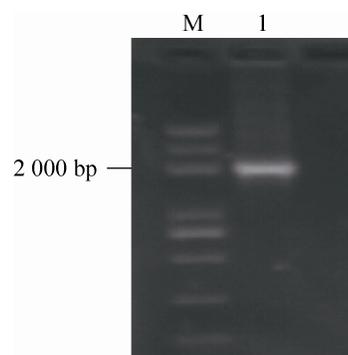


图3 HBD2 与 1.7 kb 融合片段

Fig. 3 Fusion segments of HBD2 and 1.7 kb fragments. M: DNA marker; 1: HBD2 fusion segments.

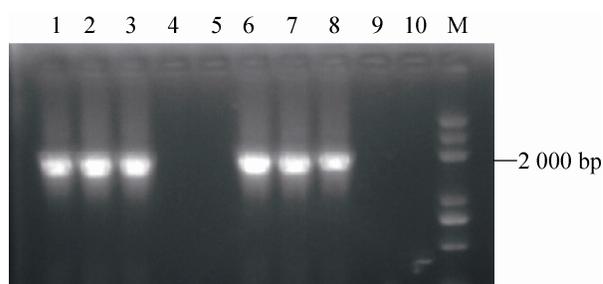


图4 菌液 PCR 鉴定结果

Fig. 4 Bacterial PCR identification results of recombinant plasmid. M: DNA marker; 1-9: PCR amplification products; 10: control.

### 2.5 重组质粒测序鉴定

重组质粒测序结果经过比对, 目的片段与人  $\beta$ -防御素-2 (HBD2, GenBank 登录号 AF040153.1) 完全一致, 表明重组质粒构建成功。

### 2.6 RT-PCR 结果

重组质粒经转染感染后得到的产物进行 RT-PCR 鉴定, 在 200 bp 左右出现条带 (图 5), 与预期相符。

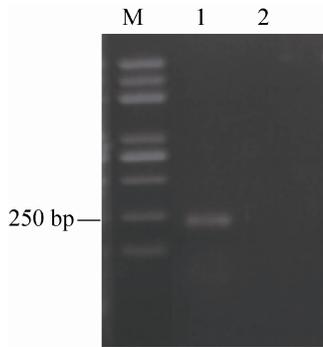


图 5 RT-PCR 鉴定结果

Fig. 5 RT-PCR identification results. M: DNA marker; 1: pCB-HBD2 RT-PCR amplification products; 2: control.

### 3 讨论

本文介绍了一种新的利用质粒抗性恢复进行克隆的方法，实验流程如图 6 所示。

真核载体 PCB 具有氨基青霉素抗性基因 (Ap-r)，而 Ap-r 片段中包含 *Sca* I 单酶切位点，因此设计 PCR 引物 Amp-Sc，涵盖 Ap-r 的 *Sca* I 识别位点。再用 *Sca* I 和载体多克隆位点 (MCS) 中的平端酶 *Stu* I 双酶切载体，产生含载体骨架的 3.2 kb 大片段和另外一条约 1.7 kb 的小片段，二者分别带有 Ap-r 基因的半侧，将这两个载体

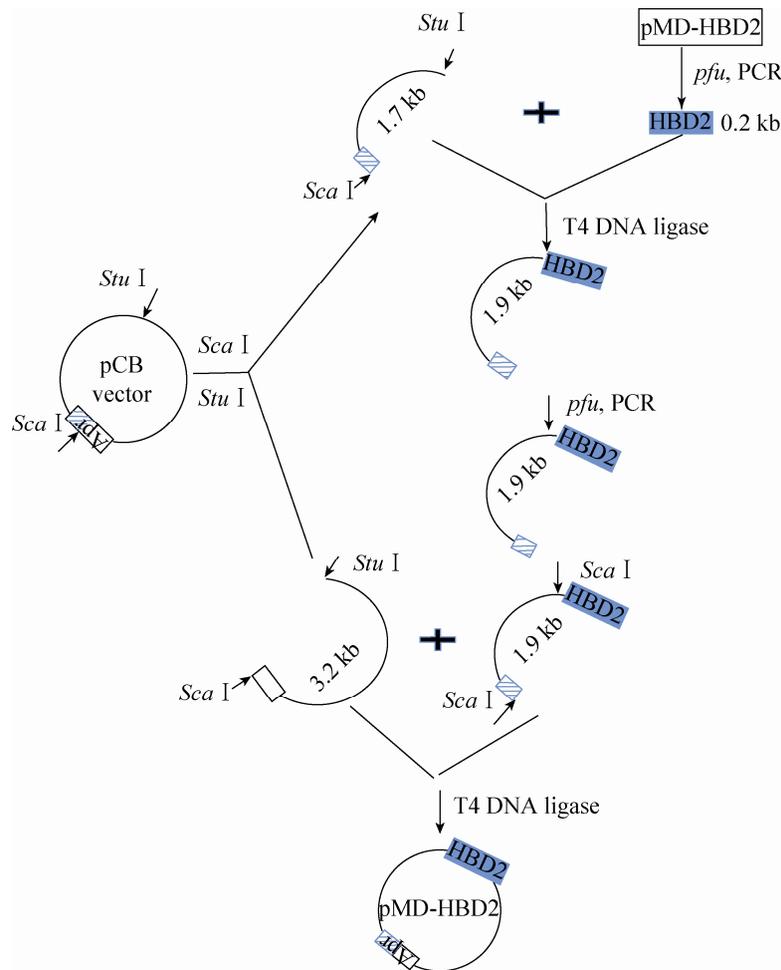


图 6 基于质粒抗性恢复的克隆方法图解

Fig. 6 Schematic diagram of cloning strategy based on restoration of antibiotic resistance in plasmid.

片段切胶纯化备用。接着将 1.7 kb 的小片段与 *pfu* 酶扩增的 HBD2 用 T4 DNA 连接酶连接, 然后以此连接产物为模板, 用涵盖 Ap-r 的 *Sca* I 识别位点的引物 Amp-Sc 和 HBD2 的上游引物 HBD<sub>2</sub>-Bm 进行 PCR, 即可成功将短片 HBD2 融合进载体小片段。最后, 将此融合片段用 *Sca* I 酶切后, 与载体大片段连接, 转化感受态大肠杆菌后, 筛选 Ap-r 阳性菌落即可得到所需克隆。

由于 *Sca* I 和 *Stu* I 均为平端酶, 用这两个酶双酶切处理的片段为平末端, 所以两个平末端片段连接后, 理论上连接方向正确的几率为 50%, 但在本方法中, 不用担心克隆连接方向错误的另外 50%可能性, 因为连接方向错误的克隆将导致 Ap-r 抗性基因的完整性缺损, 致使连接产物在转化细菌后丧失 Ap-r 抗性, 转化菌在含 Amp 抗生素的 LB 平板上不能生长, 藉此原理强力淘汰错误克隆。从原理上说, 本方法可达成“零背景”克隆的效率, 但实验中仍发现少数转化菌不含预期的重组体但在 Amp 抗生素的 LB 平板上也能生长 (图 4, 泳道 4 和 5), 其原因尚不明, 但不排除酶切处理质粒载体母体不完全导致 Ap-r 抗性基因“污染”的可能性。

将超长或超短基因片段插入表达载体是分子克隆技术中的难点, 尤其是后者。杨艳等<sup>[21]</sup>曾利用抗性恢复的策略克隆染色体上大片段 DNA (48 kb), 但对于超短片段的克隆却鲜有报道。防御素是一类小分子抗菌多肽, 广泛存在于昆虫、植物和动物体内, 其中人  $\beta$ -防御素-2 (Human  $\beta$ -defensin 2, HBD2) 是人体中第一个被发现的可诱导性防御素, 它具有抗微生物<sup>[22-23]</sup>、抗肿瘤及免疫调节<sup>[24-25]</sup>等广泛生物活性, 在基因治疗和重组疫苗等领域具有重要用途。

但是由于 HBD2 是仅有 192 bp 的短基因片

段, 用常规的“酶切处理后切胶纯化”的方法, 回收的目的片段量非常少, 克隆效率极低。因此在本研究中我们采用了上述基于抗性恢复的克隆方法: 由于载体的大、小片段各含有氨苄青霉素抗性基因 (Ap-r) 的半侧, 只有连接方向正确的质粒, 才能恢复 Ap-r 抗性。

和传统方法相比, “基于抗性恢复”的克隆方法具有以下优点: 1) 高效性: 短基因片段通过 PCR 与载体片段的一部分融合, 大大提高了插入载体的效率; 2) 通用性: 任何克隆困难的短基因片段, 都可用该方法克隆进任何具有 Amp 筛选标记的表达载体, 为短基因片段的克隆提供了一种有效方法; 3) 价格低廉: 不需要任何商品化的克隆试剂盒, 也不需要价格昂贵的酶, 在提高效率的前提下并未增加成本, 具有良好的应用前景。

## REFERENCES

- [1] Huang Y, Tao Y, Zhang WL, et al. A new method for DNA molecular cloning. *Sci Sin Vitae*, 2011, 41(9): 722-729 (in Chinese).  
黄媛, 陶颖, 张文露, 等. 一种新的 DNA 分子克隆方法. *中国科学: 生命科学*, 2011, 41(9): 722-729.
- [2] Xu PS, Bai JF, Liu JW, et al. Construction of LSV and LMoV binary virus resistant RNAi vector using gateway technology. *Chin Agric Sci Bull*, 2011, 27(4): 144-147 (in Chinese).  
徐品三, 白建芳, 刘纪文, 等. Gateway 技术快速构建百合双价抗病毒 RNAi 表达载体. *中国农学通报*, 2011, 27(4): 144-147.
- [3] Atanassov II, Atanassov II, EtcHELLS JP, et al. A simple, flexible and efficient PCR-fusion/Gate way cloning procedure for gene fusion, site-directed mutagenesis, short sequence insertion and domain deletions and swaps. *Plant Methods*, 2009, 5: 14.

- [4] Walhout AJM, Temple GF, Brasch MA, et al. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol*, 2000, 328: 579–592.
- [5] Berrow NS, Alderton D, Owens RJ. The precise engineering of expression vectors using high-throughput in-Fusion™ PCR cloning//Doyle SA, Ed. *High Throughput Protein Expression and Purification: Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Humana Press, 2009, 498: 75–90.
- [6] Zhu BG, Cai GF, Hall EO, et al. In-fusion™ assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations. *BioTechniques*, 2007, 43(3): 354–359.
- [7] Zhang XY, Yang GP, Shi LY, et al. Mouse Gtf2h2 gene cloning and expression in eukaryotic cells. *Acta Univ Med Nanjing: Nat Sci*, 2015, 35(8): 1049–1054 (in Chinese).  
张心悦, 杨光平, 时兰英, 等. 小鼠 Gtf2h2 基因的克隆及其在真核细胞中的表达. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2015, 35(8): 1049–1054.
- [8] Bitinaite J, Rubino M, Varma KH, et al. USER™ friendly DNA engineering and cloning method by uracil excision. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(6): 1992–2002.
- [9] Geu-Flores F, Nour-Eldin HH, Nielsen MT, et al. USER fusion: a rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(7): e55.
- [10] Nour-Eldin HH, Hansen BG, Norholm MHH, et al. Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(18): e122.
- [11] Tachibana A, Tohiguchi K, Ueno T, et al. Preparation of long sticky ends for universal ligation-independent cloning: sequential T4 DNA polymerase treatments. *J Biosci Bioeng*, 2009, 107(6): 668–669.
- [12] Eschenfeldt WH, Lucy S, Millard CS, et al. A family of LIC vectors for high-throughput cloning and purification of proteins//Doyle SA, Ed. *High Throughput Protein Expression and Purification: Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Humana Press, 2009, 498: 105–115.
- [13] Li HQ, Lin CS, Zhang WQ. Methods for high-throughput cloning without ligation reaction. *Amino Acids & Biotic Res*, 2013, 35(4): 43–46 (in Chinese).  
李华琴, 林陈水, 张文倩. 不依赖连接反应的高通量克隆方法. *氨基酸和生物资源*, 2013, 35(4): 43–46.
- [14] Weeks SD, Drinker M, Loll PJ. Ligation independent cloning vectors for expression of SUMO fusions. *Protein Exp Purif*, 2007, 53(1): 40–50.
- [15] Li XB, Zhao XS, Tian DZ, et al. A new method for PCR products cloning—T-A clone technique. *Prog Biochem Biophys*, 1999, 26(2): 187–189 (in Chinese).  
李新波, 赵小松, 田德志, 等. 一种 PCR 产物克隆的新方法——T-A 克隆法. *生物化学与生物物理进展*, 1999, 26(2): 187–189.
- [16] Andres DA, Sesbra MC, Brown MS, et al. cDNA cloning of component A of Rab geranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell*, 1993, 73(6): 1091–1099.
- [17] Kuang FT, Yuan DY, Li L, et al. A novel method for vector making: recombination-fusion PCR. *Genomics Appl Biol*, 2012, 31(6): 634–639 (in Chinese).  
邝翡婷, 袁定阳, 李莉, 等. 一种载体构建的新方法: 重组融合 PCR 法. *基因组学与应用生物学*, 2012, 31(6): 634–639.
- [18] Cha-Aim K, Hoshida H, Fukunaga T, et al. Fusion PCR via novel overlap sequence. *Methods Mol Biol*, 2012, 852: 97–110.
- [19] Li M, Yang Q. A rapid method for generation of homologous recombinant fragments—fusion PCR. *Chin Biol*, 2007, 27(8): 53–58 (in Chinese).  
李敏, 杨谦. 一种高效构建同源重组 DNA 片段的方法——融合 PCR. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(8): 53–58.
- [20] Zhao L, Cai JY, Zheng WL, et al. Construction and

- stability of fission yeast expression vector of the M gene of SARS-CoV by TOPO cloning. *Herald Med*, 2007, 26(7): 709–713 (in Chinese).
- 赵林, 蔡金艳, 郑文岭, 等. TOPO 克隆构建 SARS-CoV M 蛋白基因裂殖酵母表达载体及其稳定性. *医药导报*, 2007, 26(7): 709–713.
- [21] Yang Y, Zhu Y, Zhu MQ, et al. Complementary resistance strategy for direct cloning of large DNA fragments from chromosome. *Lett Biotechnol*, 2015, 26(4): 565–569 (in Chinese).
- 杨艳, 朱莹, 朱美勤, 等. 利用抗性互补策略直接克隆染色体上大片段 DNA. *生物技术通讯*, 2015, 26(4): 565–569.
- [22] Landon C, Barbault F, Legrain M, et al. Rational design of peptides active against the gram positive bacteria *Staphylococcus aureus*. *Proteins*, 2008, 72(1): 229–239.
- [23] Chen HX, Mao RY, Teng D, et al. Review on effects of disulfide bond and its connection on antimicrobial activity in defensins. *Biotechnol Bull*, 2016, 32(9): 32–37 (in Chinese).
- 陈惠娴, 毛若雨, 滕达, 等. 二硫键及其连接方式对防御素抗菌功能的影响研究进展. *生物技术通报*, 2016, 32(9): 32–37.
- [24] Chuang TH, Ulevitch RJ. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1518(1/2): 157–161.
- [25] Meng Y, Si LG. The relationship between  $\beta$ -defensin-2 and the immune regulation of respiratory system and respiratory allergic disease. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2012, 28(12): 1335–1337 (in Chinese).
- 孟颜, 司利钢.  $\beta$ -防御素-2 与呼吸系统的免疫调节及呼吸道过敏性疾病. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(12): 1335–1337.

(本文责编 郝丽芳)