

核酸外切酶 Ⅷ 截短体的重组表达及其在体外 DNA 重组反应中的应用

朱燕, 韩小韦, 牛毅男, 郑蓓, 李学俊, 徐全乐, 陈鹏

西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100

朱燕, 韩小韦, 牛毅男, 等. 核酸外切酶Ⅷ截短体的重组表达及其在体外 DNA 重组反应中的应用. 生物工程学报, 2019, 35(5): 827-836.

Zhu Y, Han XW, Niu YN, et al. Recombinant expression of truncated exonuclease Ⅷ and its application in *in vitro* DNA recombination. Chin J Biotech, 2019, 35(5): 827-836.

摘要: 核酸外切酶Ⅷ (Exonuclease Ⅷ, Exo Ⅷ) 是一种不依赖于 ATP 的 dsDNA 5'-3'核酸外切酶, 可作为体外 DNA 重组反应极具应用价值的候选蛋白。目前关于 Exo Ⅷ在体外 DNA 重组反应中的应用尚未有文献报道。本研究构建了保留完整外切活性的截短 Exo Ⅷ (Truncated exonuclease Ⅷ, tExo Ⅷ) 的重组表达载体 pET28a-tExo Ⅷ, 实现了 tExo Ⅷ在大肠杆菌中的高效表达, 在纯化获得高纯度蛋白的基础上, 对体外重组反应的温度、反应时间、同源臂长度等因素进行了优化分析。研究结果表明, tExo Ⅷ在大肠杆菌中以可溶性形式高效表达, 每升可纯化 92.40 mg tExo Ⅷ, 比活力为 1.21×10^5 U/mg; 在 10 μ L 的重组体系中, 2.5 U 的 tExo Ⅷ于 25 $^{\circ}$ C 反应 12.5 min 随后 50 $^{\circ}$ C 保温 50 min 时重组效率最高。添加 Pfu DNA 聚合酶的体外同源臂延伸策略可以有效提高重组克隆的效率。以转化效率为 2.2×10^6 CFU/ μ g 的 Mach1T1 为受体细胞, 对于含有 21 bp 同源臂的 1 kb 片段与 5.8 kb 线性化载体的重组, 每微克载体可形成 1.1×10^4 个重组克隆, 且阳性率大于 80%。同源臂长度在 8-21 bp 范围内, 重组反应效率随着同源臂长度增加而提高。在最佳反应条件下, 同源臂长度仅为 8 bp 仍可实现有效的重组反应。Exo Ⅷ介导的体外重组体系具有酶制备方法简单、对 DNA 的克隆无酶切位点限制及高重组克隆效率等显著优点, 是分子生物学领域具有潜在应用价值的高效基因克隆新体系。

关键词: 核酸外切酶Ⅷ截短体, 表达纯化, 体外同源重组

Received: November 29, 2018; **Accepted:** January 9, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 30400282, 31171606), Key Research and Development Program of Shaanxi Province (No. 2017NY-033).

Corresponding authors: Peng Chen. Tel/Fax: +86-29-87091637; E-mail: pengchen@nwsuaf.edu.cn

Quanle Xu. Tel/Fax: +86-29-87091637; E-mail: xuquanle@nwsuaf.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 30400282, 31171606), 陕西省重点研发计划 (No. 2017NY-033) 资助。

网络出版时间: 2019-02-18

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190215.1810.001.html>

Recombinant expression of truncated exonuclease VIII and its application in *in vitro* DNA recombination

Yan Zhu, Xiaowei Han, Yinan Niu, Bei Zheng, Xuejun Li, Quanle Xu, and Peng Chen

College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: Exonuclease VIII (Exo VIII), an ATP-independent dsDNA 5'-3' exonuclease, is a candidate protein with great application value for *in vitro* DNA recombination. However, the application of Exo VIII in DNA recombination *in vitro* has not been reported. In this study, the recombinant expression vector of the truncated Exo VIII (tExo VIII) with the full exonuclease activity was built and used to achieve the overexpression of tExo VIII in *Escherichia coli*. Based on the purified tExo VIII protein with high-purity, the feasibility of tExo VIII applied *in vitro* DNA recombination and effects of the reaction temperatures, reaction duration, and homology arm lengths were examined. The results showed that tExo VIII was highly expressed in soluble form in *E. coli*. One liter of bacterial culture yielded 92.40 mg of purified tExo VIII with the specific activity of 1.21×10^5 U/mg. In a 10 μ L recombination system containing 2.5 U tExo VIII, the highest cloning efficiency was achieved in a reaction at 25 °C for 12.5 min and followed by incubation at 50 °C for 50 min. With addition of *Pfu* DNA polymerase, the homology arm extension strategy can effectively improve the recombination efficiency. Using competent *E. coli* Mach1 T1 with 2.2×10^6 cfu/ μ g transformation efficiency as recipient cell, the recombination of a 1 kb fragment with a 21 bp homology arm and a 5.8 kb linearized vector can form about 1.1×10^4 recombinant clones per μ g vector, and the positive rates was over 80%. The recombination efficiency was increased with the increasing length of homology arm ranged from 8 to 21 bp. Under the optimal reaction condition, only 8 bp homology arm can still achieve valid DNA recombination. This novel *in vitro* DNA recombination system mediated by tExo VIII was particularly characterized by its easy preparation, no limitation on restriction sites and high recombination cloning efficiency. All results revealed that the new efficient gene cloning system has potential application in the field of molecular biology.

Keywords: truncated exonuclease VIII, expression and purification, homologous recombination *in vitro*

分子克隆技术通常使用限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶实现 DNA 的体外克隆, 载体多克隆位点有限的酶切位点和 DNA 分子内部存在的酶切位点限制了该方法的通用性和可操作性^[1-2]。不依赖连接酶的克隆方法 (Ligase independent cloning, LIC) 即无缝克隆技术的出现大大提高了体外 DNA 重组克隆的效率。LIC 通过特定的 DNA 外切酶使两个 DNA 分子产生可互补的单链末端, 单链末端的退火推进 DNA 发生重组, 这种重组克隆的方式不受限制性内切酶酶切位点的限制, 使基因克隆的操作更灵活, 可满足高通量 DNA 克隆的需求^[3-5]。

目前不依赖连接酶克隆系统用于形成 DNA 单链末端的酶主要有核酸外切酶 III、T4 DNA 聚合酶、 λ 核酸外切酶等。核酸外切酶 III 具有 3'-5'核酸外切酶活性, 已有的研究显示, 使用适量的核酸外切酶 III 处理载体和片段 30-60 s 即可产生有效的末端同

源臂^[6]。核酸外切酶 III 对存在 3'单链末端的 dsDNA 无外切活性, 因此由形成 3'单链末端的限制性内切酶 (如 *Pst* I) 制备的 DNA 无法选择该体系进行克隆^[7]。T4 DNA 聚合酶具有 3'-5'核酸外切酶活性, 且在 dNTPs 存在条件下可以催化 DNA 的合成, 使用该酶处理目的片段和载体可产生 5'单链末端, 经退火复性即可实现重组^[8]。然而由于 T4 DNA 聚合酶外切活性强且具有持续性, 因此容易对双链 DNA 造成过度外切而产生过长的单链末端, 长的末端容易形成二级结构而抑制有效的重组反应^[9-10]。 λ 核酸外切酶是一种噬菌体来源的 5'-3'核酸外切酶, 可使载体和目的片段产生 3'单链末端促进重组反应^[11], 然而 λ 核酸外切酶的最适底物是 5'磷酸化的 dsDNA, 对于通过 PCR 制备的载体和 PCR 产物外切效率极低, 因此 λ 核酸外切酶用于体外的重组反应时存在作用底物上的巨大局限^[12-13]。除了上述酶系统外,

大肠杆菌 RecA 重组系统也被用于体外的重组反应,该系统利用 RecBCD 的解旋酶和 5'-3'外切酶活性产生 3'单链末端,在 RecA 的作用下完成重组。但该体系不仅需要较为复杂的蛋白因子和辅因子(如 ATP 等),而且需要 151 bp 以上的同源区才能实现有效的重组,体外条件下超长的同源区不仅增加单链末端自身形成二级结构的概率,同时增加引物合成的成本和出错率^[14-16]。

大肠杆菌核酸外切酶Ⅷ(Exonuclease Ⅷ, Exo Ⅷ)是一种不依赖 ATP 的 dsDNA 5'-3'核酸外切酶,在 37 °C 的反应条件下表现为持续性的底物外切活性,即造成所结合的特定 DNA 链的连续外切,而在 10 °C 的反应条件下对线性双链 DNA 外切表现为分配性,即反应体系中形成具有较为均一长度 3'单链的 DNA。Exo Ⅷ对 5'磷酸化和非磷酸化的双链 DNA 具有相同的外切效率^[17-18]。Chang 等报道大肠杆菌 Exo Ⅷ C 端分子量约为 34 kDa 的截短体保留了完整的 5'-3'外切酶活性,且具有与 98 kDa 完整酶相同的催化特性^[19]。Zhang 等报道在大肠杆菌中诱导表达 Rac 噬菌体 Exo Ⅷ和 RecT 蛋白可以实现外源线性化的 DNA 和环状载体在大肠杆菌体内的高效重组,反应需要 35-60 bp 的同源臂^[20-21]。目前 Exo Ⅷ主要用于去除环状双链 DNA 或环状 ssDNA 中的线性 dsDNA,而利用 Exo Ⅷ外切活性介导体外 DNA 重组的研究至今尚未见报道。

本研究在重组表达和纯化具完整外切活性的 Exo Ⅷ截短体(Truncated exonuclease Ⅷ, tExo Ⅷ)的基础上,对 tExo Ⅷ介导体外重组的可行性及反应体系进行优化,为建立基于 tExo Ⅷ的高效体外重组体系奠定基础工作。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体

本研究采用的菌株大肠杆菌 *Escherichia coli* Mach1 T1、BL21 Star (DE3) 以及质粒 pET28a、pYES2 等均为实验室保存。

1.1.2 培养基

LB 培养基(1%蛋白胨,0.5%酵母提取物,1% NaCl,固体培养基添加 1.5%琼脂,pH 7.0)用于培养大肠杆菌。

1.1.3 酶和试剂

2× IProof DNA polymerase Mix 购自 Bio-Rad 公司;Taq DNA 聚合酶、Pfu DNA polymerase 购自 Promega 公司;Nde I、Xho I、Hind III、Xba I、T4 DNA Ligase 购自 Thermo Scientific 公司;dNTPs 购自 Roche 公司;Talon resin 购自 Clontech 公司。

1.1.4 感受态细胞

参考 Chung 等的方法采用 TSS 法大量制备 Mach1 T1 感受态细胞^[22]。采用 KCM 法转化质粒 pUC18 检测感受态细胞的转化效率为 2.2×10^6 CFU/ μg ^[23]。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的扩增

根据 tExo Ⅷ序列利用 Primer Premier 5.0 设计并合成引物序列 EXO8-1 和 EXO8-2(表 1),并以大肠杆菌 TOP10 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 10 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 32 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。

1.2.2 重组表达载体的构建

tExo Ⅷ的 PCR 扩增产物和质粒 pET28a 分别用 Nde I 和 Xho I 双酶切后回收纯化,经 T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 Mach1 T1 感受态细胞,利用 Taq DNA 聚合酶,并以 EXO8-1 和 EXO8-2 为引物进行菌落 PCR 鉴定阳性克隆并测序,测序正确的重组质粒命名为 pET28a-tExo Ⅷ。

1.2.3 tExo Ⅷ的表达与纯化

将重组质粒 pET28a-tExo Ⅷ转入表达菌株 *E. coli* BL21 Star (DE3) 中,挑取单菌落接种于 5 mL 含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素(Kana)的 LB 液体培养基中,于 37 °C、180 r/min 培养过夜。按 1:100 的比例接种菌液于 200 mL LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养至菌液 OD_{600} 值为 1.0,加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG,30 °C 诱导表达 8 h。取 1 mL 菌液,10 000 r/min

离心 5 min, 弃上清, 同时以未加入 IPTG 的菌体作为对照。将菌体悬浮于 100 μ L SDS-PAGE 上样缓冲液中, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min, 离心取上清, 使用 SDS-PAGE (分离胶浓度为 12.5%, 浓缩胶浓度为 4%) 检测 tExo VIII 重组蛋白的表达。

将诱导的菌体悬浮于破菌缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, pH 7.5) 中进行超声波破碎, 裂解液在 12 000 r/min 离心 10 min, 分别取上清和沉淀按上述方法进行 SDS-PAGE 分析, 以检测表达蛋白的可溶性^[24]。

参考 Mitsudome 等的方法用钴离子螯合层析柱 (Talon Resin, Clontech) 对目的蛋白进行分离纯化^[25]。洗脱的目的蛋白用截留分子量为 10 kDa 的超滤管进行浓缩, SDS-PAGE 检测纯化蛋白的纯度。蛋白浓度的测定采用考马斯亮蓝 G250 法, 用牛血清白蛋白制作标准曲线。

1.2.4. tExo VIII 活性的测定

参照 Ko 等的方法^[26], 酶活力单位定义为 50 μ L 反应体系, 37 $^{\circ}$ C、30 min 生成 1 nmol 核苷酸所需的酶量。以线性化 pGEX-6P-1 质粒 DNA 为底物。反应体系为: 冰浴条件下在 PCR 管中加入 5 μ L 10 \times 反应缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L KCl, 100 mmol/L MgSO₄, 10 mmol/L DTT, pH 8.0), 10 μ g 线性化 pGEX-6P-1 质粒及纯化的 tExo VIII 并用 ddH₂O 补充体积

至 50 μ L, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 保温 30 min。反应结束后, 加 1/4 体积 1 mol/L HCl, 并用 25% TCA 终止反应。上清用灭菌 ddH₂O 稀释, 测定 260 nm 处光吸收值。

1.2.5 tExo VIII 介导的体外重组反应的可行性

为验证 tExo VIII 进行体外重组的可行性, 以经 *Hind* III/*Xba* I 双酶切线性化的 pYES2 质粒为载体, 苦荞抗性相关巨噬细胞蛋白 3 (Natural resistance-associated macrophage protein 3, Nramp3)、ABC (ATP-binding cassette, ABC) 家族 G11 蛋白、ABC 家族 B1 蛋白的基因片段 *nramp3* (1 000 bp)、*g11* (2 200 bp)、*b1* (4 000 bp) 为克隆目标进行 tExo VIII 介导的体外重组反应。

pYES2 质粒的制备及目的基因的 PCR 扩增: 使用质粒抽提试剂盒 (TIANprep Mini Plasmid Kit) 提取 pYES2 质粒, 经 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切后回收。用引物 pYES2-Nramp3-F 和 pYES2-Nramp3-R 扩增 *nramp3* 目的片段 (同源臂长度为 21 bp), pYES2-B1-F 和 pYES2-B1-R 扩增 *b1* 目的片段 (同源臂长度为 21 bp), 分别用 pYES2-G11(21)-F 和 pYES2-G11(21)-R、pYES2-G11(17)-F 和 pYES2-G11(17)-R、pYES2-G11(13)-F 和 pYES2-G11(13)-R、pYES2-G11(8)-F 和 pYES2-G11(8)-R 扩增同源臂长度分别为 21、17、13、8 bp 的 *g11* 目的片段。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
EXO8-1	CAGAGAACATATGGATAACTGCCCTGACTGTGGTG
EXO8-2	GGGGTCTCGAGTTAGTCATTTGCATATTCCTTAGCCCAG
pYES2-Nramp3-F	<u>ACTATAGGGAATATTAAGCTT</u> ATGGCTGAGCTCGCTTTGATC
pYES2-Nramp3-R	TACATGATGCGGCCCTCTAGATCAATTTACTAATCTTTTCATCATTCTTGG
pYES2-B1-F	<u>ACTATAGGGAATATTAAGCTT</u> ATGTCACAAGATTTGAAGGAAATAAACACAG
pYES2-B1-R	TACATGATGCGGCCCTCTAGATCAGTCATCTTCTCTTGGTTTCCCTG
pYES2-G11(21)-F	<u>ACTATAGGGAATATTAAGCTT</u> ATGTCGGATCATCTCGCCATGGA
pYES2-G11(21)-R	TACATGATGCGGCCCTCTAGATTACCTTCTACCAGGGGCAACATACC
pYES2-G11(17)-F	<u>TAGGGAATATTAAGCTT</u> ATGTCGGATCATCTCGCCATGGA
pYES2-G11(17)-R	TGATGCGGCCCTCTAGATTACCTTCTACCAGGGGCAACATACC
pYES2-G11(13)-F	<u>GAATATTAAGCTT</u> ATGTCGGATCATCTCGCCATGGA
pYES2-G11(13)-R	GCGGCCCTCTAGATTACCTTCTACCAGGGGCAACATACC
pYES2-G11(8)-F	<u>TTAAGCTT</u> ATGTCGGATCATCTCGCCATGGA
pYES2-G11(8)-R	CCTCTAGATTACCTTCTACCAGGGGCAACATACC

Underlined letters indicate homologous sequences for pYES2 vector.

tExo VIII介导的体外重组反应的可行性: 基于前期预实验的结果, 在 10 μ L 的重组体系中加入 2.5 U 的 tExo VIII即可完成有效的重组。按照载体和重组基因片段摩尔比值 1:3 的比例取对应量的线性化载体 pYES2 (5 856 bp) 和 *nramp3* (1 000 bp), 加入 5 μ L 含有 tExo VIII 的重组反应液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5, 40 mmol/L KCl, 1 mmol/L DTT, 5 mmol/L MgCl₂, 2.5 U tExo VIII), 用 ddH₂O 补足体系至 10 μ L 后进行重组反应。分别在 25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 外切反应 10 min, 重组反应液冰浴后用 KCM 法转化至大肠杆菌 Mach1 T1 感受态细胞^[23], 根据平板的克隆数、PCR 及双酶切鉴定评价重组的可行性。PCR 鉴定采用基因特异性引物进行。每个重组反应至少重复 3 次。

1.2.6 体外同源臂延伸对于重组效率的影响

参考 1.2.5 的方法和体系, 在重组反应体系中添加 dNTPs 和 *Pfu* DNA 聚合酶, 形成在体外条件下单链同源臂区的延伸, 即按照载体和重组基因片段摩尔比值 1:3 的比例取对应量的线性化载体 pYES2 (5 856 bp) 和 *nramp3* (1 000 bp), 加入 5 μ L 含有 tExo VIII 的重组反应液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5, 40 mmol/L KCl, 500 μ mol/L dNTPs, 1 mmol/L DTT, 5 mmol/L MgCl₂, 2.5 U tExo VIII, 1 U *Pfu* DNA 聚合酶), 用 ddH₂O 补足体系至 10 μ L 后进行重组反应。分别在 25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 外切反应 10 min 后, 50 $^{\circ}$ C 保温 50 min 延伸同源臂。重组反应液冰浴后使用 KCM 法转化至大肠杆菌 Mach1 T1 感受态细胞^[23], 根据平板的克隆数、PCR 及双酶切鉴定评价重组效率, 每个重组反应至少重复 3 次。

1.2.7 外切反应温度对重组效率的影响

参考 1.2.6 的重组反应体系, 分别在 0 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 外切反应 10 min 后, 50 $^{\circ}$ C 保温 50 min 延伸同源臂。重组反应液冰浴后使用 KCM 法转化至大肠杆菌 Mach1 T1 感受态细胞^[23], 根据平板的克隆数、PCR 及双酶切鉴定评价重组效率, 每个重组反应至少重复 3 次。

1.2.8 外切反应时间对重组效率的影响

参考 1.2.6 的反应体系, 分别在 25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 外切反应 5、7.5、10、12.5 min, 转化至大肠杆菌 Mach1 T1 感受态细胞, 根据平板的克隆数、PCR 及双酶切鉴定评价重组效率。

1.2.9 基因片段大小对体外重组反应效率的影响

参考 1.2.6 的反应体系, 在 25 $^{\circ}$ C、12.5 min 和 50 $^{\circ}$ C、50 min 的反应条件下将载体和目的片段按摩尔比值 1:3 的比例取对应量的线性化载体 pYES2 (5 856 bp), 分别与 *nramp3* (1 000 bp)、*g11* (2 200 bp)、*b1* (4 000 bp) 基因片段进行重组反应, 重组产物转化至大肠杆菌 Mach1 T1 感受态细胞, 根据平板的克隆数、PCR 及双酶切鉴定评价重组效率。每个重组反应至少重复 3 次。

1.2.10 同源臂长度对重组效率的影响

将载体和目的片段按摩尔比值 1:3 的比例取对应量的线性化载体 pYES2 和纯化的同源臂长度分别为 21、17、13、8 bp 的 *g11* 目的片段, 参考 1.2.6 的反应体系和条件进行重组反应, 重组产物转化至大肠杆菌 Mach1 T1 感受态细胞, 根据平板的克隆数、PCR 及双酶切鉴定评价重组效率。

2 结果与分析

2.1 Exo VIII 截短体基因的扩增和重组表达载体的构建

以 EXO8-1 和 EXO8-2 为引物扩增目的基因 *tExo VIII*, 电泳结果显示约为 900 bp 的单一一条带 (图 1A), 大小与预期基因片段大小相符。

使用 *Nde* I、*Xho* I 对重组质粒进行双酶切鉴定, 电泳结果显示分别为约 5 300 bp 的载体及约 900 bp 的目的基因条带 (图 1B), 与预期结果相符。测序结果显示构建的表达载体正确, 将其命名为 pET28a-tExo VIII。

2.2 tExo VIII 表达与纯化

重组质粒 pET28a-tExo VIII 转化大肠杆菌 BL21 Star (DE3), 0.8 mmol/L IPTG 诱导 8 h 的菌体经超声

细胞破碎，上清液通过钴离子螯合层析进行纯化。SDS-PAGE 检测诱导的菌体及纯化蛋白，如图 2 所示，诱导的菌体较未诱导的样品在约 38 kDa 位置出现一条明显的蛋白条带，与 tExo VIII 蛋白的理论分子量大小一致，经钴离子柱纯化获得与之分子量一致的单一蛋白条带。每升诱导的菌液可纯化 92.40 mg 的 tExo VIII，比活力为 1.21×10^5 U/mg。

2.3 tExo VIII 介导体外重组反应的可行性

以同源臂长度为 21 bp，1 kb *nramp3* 基因为插

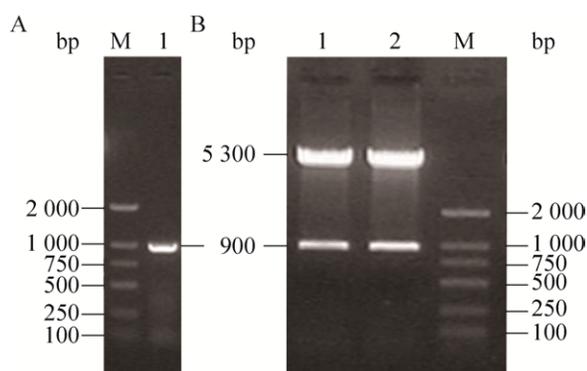


图 1 Exo VIII 截短体基因的克隆(A)及 pET28a-tExo VIII 重组载体的双酶切鉴定(B)

Fig. 1 PCR amplification of truncated Exo VIII gene (A) and double digestion of pET28a-tExo VIII (B). (A) M: DL2000 DNA marker; 1: PCR product of *tExo VIII*. (B) M: DL2000 DNA marker; 1, 2: double digested pET28a-tExo VIII.

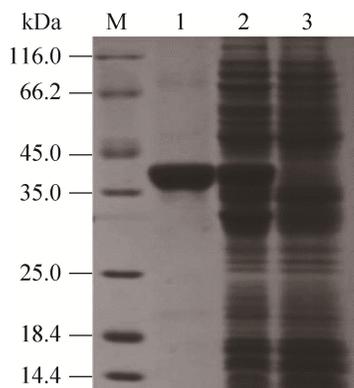


图 2 tExo VIII 表达与纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Expression and purification of tExo VIII analyzed by SDS-PAGE. M: protein marker; 1: purified tExo VIII; 2: induced cells containing pET28a-tExo VIII; 3: non-induced cells containing pET28a-tExo VIII.

入片段，25 °C、30 °C 外切反应 10 min，每微克载体可分别形成 2 640、5 181 个克隆，阳性率检测显示均达到 80%。结果表明 tExo VIII 介导的体外重组反应存在有效性和可行性。

2.4 体外同源臂延伸及反应温度和时间对重组效率的影响

2.4.1 体外同源臂延伸对 tExo VIII 重组效率的影响

以同源臂长度为 21 bp，1 kb *nramp3* 基因为插入片段，25 °C、30 °C 外切反应 10 min 后，利用 Pfu DNA 聚合酶的聚合活性，50 °C 反应 50 min 进行同源臂同源匹配区的延伸，每微克载体可分别形成 10 164、8 346 个克隆，阳性率检测显示均大于 80%。结果说明添加 Pfu DNA 聚合酶可以有效提高 tExo VIII 介导体外重组的效率。基于此结果，后续仅对于 tExo VIII 外切反应的时间和温度进行优化。

2.4.2 tExo VIII 外切反应温度对重组效率的影响

使用 0–37 °C 的外切反应温度及后续 50 °C、50 min 的保温进行重组反应，结果显示各重组条件下均具有较高的阳性率，进一步说明利用 tExo VIII 进行体外 DNA 重组反应的可行性。在 0–30 °C 范围内，随着外切反应温度的升高重组效率持续增加，并且均具有较高的阳性率 (表 2)。而在 37 °C 外切反应 10 min，重组反应的效率明显下降。结果表明 tExo VIII 用于重组反应时适宜的外切反应温度范围为 25–30 °C。

2.4.3 外切反应时间对重组效率的影响

在 25 °C、30 °C 温度下使用不同外切反应时间进行重组转化，结果显示在不加入 50 °C 退火反应的快速重组中，反应条件为 25 °C 12.5 min、30 °C 10 min 时重组效率最高 (表 3)。在这两种条件下后续进行 50 °C、50 min 的同源臂延伸，结果显示外切反应条件为 25 °C 12.5 min 时重组效率最高，说明 tExo VIII 介导的体外重组体系较为适宜的反应条件为在 25 °C 下反应 10–12.5 min。

表 2 不同外切反应温度对 tExo VIII 介导的重组克隆效率的影响

Table 2 Effect of different reaction temperatures on tExo VIII-mediated recombinant cloning efficiency (per μg of vector)

Reaction conditions	Number of clones	Cloning efficiency (%)
0 °C, 10 min; 50 °C, 50 min	297±96.03	80
20 °C, 10 min; 50 °C, 50 min	1 155±432.30	90
25 °C, 10 min; 50 °C, 50 min	3 927±679.14	90
30 °C, 10 min; 50 °C, 50 min	8 877±1 254.99	100
37 °C, 10 min; 50 °C, 50 min	996±179.33	90

The number of clones indicates the number of clones formed per reaction. Each value of “number of clones” is the $\bar{x} \pm s$ deviation of three independent experiments. Cloning efficiency indicates the number of clones inserted into the correct fragment/the number of all clones.

表 3 不同外切反应时间对 tExo VIII 介导的重组克隆效率的影响

Table 3 Effect of different reaction duration on tExo VIII-mediated recombinant cloning efficiency (per μg of vector)

Reaction conditions	Number of clones		Cloning efficiency (%)	
	25 °C	30 °C	25 °C	30 °C
5 min	528±107.91	924±234.96	100	100
7.5 min	594±189.42	792±203.94	90	90
10 min	2 640±367.95	5 181±779.40	80	80
12.5 min	4 026±964.59	2 574±729.30	100	70
15 min	1 914±364.59	1 322±329.30	100	90
25 °C, 10 min ;50 °C, 50 min		9 316±277.95		90
25 °C, 12.5 min;50 °C, 50 min		10 164±665.94		90
30 °C, 10 min; 50 °C, 50 min		5 214±679.80		80

2.4.4 基因片段大小对体外重组反应效率的影响

为了分析基于 tExo VIII 的体外重组体系对不同长度基因片段重组效率的差异, 在 25 °C、12.5 min 和 50 °C、50 min 的反应条件下使用 *nramp3* (1 000 bp)、*g11* (2 200 bp)、*b1* (4 000 bp) 三种不同大小的基因片段进行重组克隆。结果显示 tExo VIII 介导的体外重组体系对于上述基因均可实现有效克隆, 且体系对于 *nramp3* 及 *g11* 的重组效率较 *b1* 基因高, 表现出随着片段长度的增加克隆效率下降的趋势 (表 4)。

表 4 tExo VIII 介导的体外重组体系对不同长度 DNA 片段的克隆效率

Table 4 Cloning efficiency of tExo VIII mediated in vitro recombination for different DNA sizes (per μg of vector)

Genes	Number of clones	Cloning efficiency (%)
<i>nramp3</i> (1 000 bp)	9 834±659.34	90
<i>g11</i> (2 200 bp)	8 679±678.48	90
<i>b1</i> (4 000 bp)	5 148±581.79	80

2.4.5 同源臂长度对重组反应的影响

使用同源臂长度分别为 21、17、13、8 bp 的 *g11* 基因片段和 pYES2 线性化载体在 25 °C、12.5 min 和 50 °C、50 min 的反应条件下进行重组反应, 以探究同源臂长度对于重组克隆效率的影响。结果如表 5 所示, 随着同源臂长度的增加重组效率增加, 同源臂长度为 21、17 bp 时重组效率最高且无显著性差异。同源臂长度为 8 bp 时仍可形成有较高阳性率的克隆, 降低后续同源臂延伸的反应温度至 40 °C 可提高重组效率 (表 5)。

3 讨论

不依赖于连接酶的无缝克隆技术的发展大大加速了基因克隆的效率和操作通量。现有的体外重组系统依赖于核酸外切酶 III、T4 DNA 聚合酶、 λ 核酸外切酶等形成单链的同源重组臂^[6-9,11-13]。其中, 核

表 5 同源臂长度对 *g11* 重组克隆效率的影响Table 5 Effect of homology arm lengths on the recombinant cloning efficiency of *g11* (per μg of vector)

Gene	Number of clones		Cloning efficiency (%)	
	50 °C, 50 min	40 °C, 50 min	50 °C, 50 min	40 °C, 50 min
<i>g11</i> (8)	330±99.33	957±137.61	100	90
<i>g11</i> (13)	4 488±648.78	4 653±707.19	90	80
<i>g11</i> (17)	7 161±663.30		90	
<i>g11</i> (21)	8 679±678.48		90	

酸外切酶 III 是 3'-5' 核酸外切酶, 其优选底物是平末端或 3' 凹陷末端, 而对于存在四碱基或更长的 3' 单链末端的 DNA 分子无活性^[7], λ 核酸外切酶对 5' 去磷酸化的双链 DNA 表现出低的外切效率 (约为 5' 磷酸化底物的 20%)^[27], T4 DNA 聚合酶具有超强外切酶活性, 在形成单链的同源重组臂时必须精确控制反应温度和时间等以防止酶切过度。鉴于上述原因导致现有的体外重组体系不同批次的克隆操作效率存在巨大差异, 因此拓展新的外切酶种类用于体外重组反应中单链同源臂的形成具有重要的实践价值。

Exo VIII 是一种不依赖于 ATP 的 5'-3' 核酸外切酶, 在 10 °C 的反应条件下对线性双链 DNA 的外切呈分配性, 能有效外切具有长达 250 个核苷酸的 5' 单链末端的 DNA 分子, 其对底物的识别不依赖于双

链 DNA 的 5' 磷酸基团, 且对具 5' 单链末端、平末端、3' 单链末端的双链底物能以较为一致的效率进行外切, 这些特性使 Exo VIII 非常适合于体外 DNA 重组中均一单链同源臂的形成^[18]。Exo VIII 是体外 DNA 重组反应极具应用价值的候选蛋白, 但迄今为止关于 Exo VIII 用于体外重组的研究尚未有文献报道。已有文献报道 Exo VIII 的 C 末端结构域有着完整的核酸外切酶活性^[19], 本研究克隆了保留完整外切活性的 Exo VIII 截短基因 (tExo VIII), 并实现了其在大肠杆菌内的重组表达。tExo VIII 表达量可达 92.40 mg/L, 纯化酶的比活力可以达到 1.21×10^5 U/mg, 按照本研究建立的体系可以用于超过 300 万次的重组反应。

在本研究的重组体系中, 引入促进体外同源臂延伸的新策略 (图 7), 25 °C 保温条件下 Exo VIII 外切双链 DNA 可能形成长于设计的同源单链区, 不

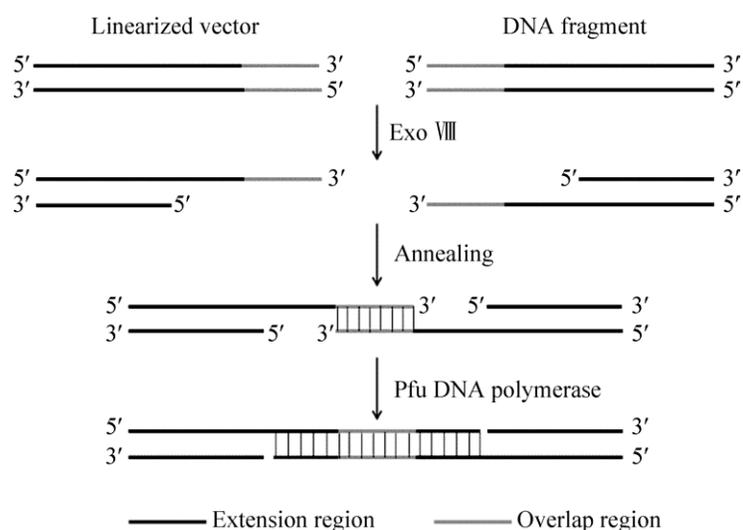


图 7 Exo VIII 介导的同源重组体系示意图

Fig. 7 Diagram of the homologous recombination system mediated by Exo VIII.

同来源的同源单链区退火形成局部的双链,在重组体系中含有的 *Pfu* DNA 聚合酶的作用下,50 °C、50 min 的保温可以使 *Pfu* DNA 聚合酶以互补区域存在的两个 3'端为起始点,催化两个片段同源重组互补区长度的增加,使后续转化大肠杆菌时同源双链区更加稳定,更有利于转入宿主细胞后进行缺刻质粒的修复。本研究结果证明促进同源臂稳定的匹配是提高重组效率的有效途径。在同源臂仅为 8 bp 的条件下进行重组反应,降低后续同源臂延伸的温度可以有效地提高克隆的效率,其主要原因是在 50 °C 条件下延伸时,8 bp 的同源区相互匹配的效率较低,造成同源臂的有效延伸下降,在保障充分的延伸时间条件下,降低延伸温度可以提升同源臂延伸的有效性。感受态细胞的转化效率是影响体外重组克隆的重要因素。本研究利用实验室自制的转化效率仅为 2.2×10^6 CFU/ μ g 的感受态细胞即可实现高效的克隆,充分说明本研究体系的有效性。利用商业化的转化效率为 1.0×10^8 CFU/ μ g 的感受态细胞进行重组转化,其形成的有效克隆数增加 5–13 倍(以同源臂长度为 21、17、13 bp 的 1 kb *nramp3* 基因为插入片段,每微克载体形成的平均克隆数分别为 127 842、75 233、51 036);另外研究中也尝试利用 Exo VIII 介导体外 DNA 重组克隆体系进行多种类型载体和不同基因的克隆,均显示出高效性(结果未显示)。

本研究首次报道和应用 Exo VIII 于体外的 DNA 重组克隆体系,具有简便高效的显著特征。

REFERENCES

- [1] Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA, 1973, 70(11): 3240–3244.
- [2] Liu C, Lin CS. Research Advance on ligation-independent cloning (LIC) method. Genom Appl Biol, 2011, 30(1): 1081–1085 (in Chinese). 刘超,林陈水.不依赖于连接反应克隆(LIC)的技术进展.基因组学与应用生物学,2011,30(1): 1081–1085.
- [3] Motohashi K. Evaluation of the efficiency and utility of recombinant enzyme-free seamless DNA cloning methods. Biochem Biophys Rep, 2017, 9(C): 310–315.
- [4] Jacobus AP, Gross J. Optimal cloning of PCR fragments by homologous recombination in *Escherichia coli*. PLoS ONE, 2015, 10(3): e0119221.
- [5] Doyle SA. High-throughput cloning for proteomics research. Methods Mol Biol, 2005, 310(310): 107–113.
- [6] Hsiao KC. Exonuclease III induced ligase-free directional subcloning of PCR products. Nucleic Acids Res, 1993, 21(23): 5528–5529.
- [7] Henikoff S. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene, 1984, 28(3): 351–359.
- [8] Aslanidis C, de Jong PJ. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). Nucleic Acids Res, 1990, 18(20): 6069–6074.
- [9] Islam MN, Lee KW, Yim HS, et al. Optimizing T4 DNA polymerase conditions enhances the efficiency of one-step sequence- and ligation-independent cloning. BioTechniques, 2017, 63(3): 125–130.
- [10] Li HQ, Lin CS, Zhang WQ. Methods for high-throughput cloning without ligation reaction. Amino Acid Biotic Resour, 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.
- [11] Tseng H. DNA cloning without restriction enzyme and ligase. Biotechniques, 1999, 27(6): 1240–1244.
- [12] Kovall R, Matthews BW. Toroidal structure of λ -exonuclease. Science, 1997, 277(5333): 1824–1827.
- [13] Wu TB, Yang YF, Chen W, et al. Noncanonical substrate preference of lambda exonuclease for 5'-nonphosphate-ended dsDNA and a mismatch-induced acceleration effect on the enzymatic reaction. Nucleic Acids Res, 2018, 46(6): 3119–3129.
- [14] Zhang YW. Single molecule study of the mechanism

- of homology recombination mediated by RecA[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Physics CAS), 2017 (in Chinese).
- 张宇微. RecA 蛋白所介导的同源重组机制的研究 [D]. 北京: 中国科学院大学(中国科学院物理研究所), 2017.
- [15] Gonda DK, Radding CM. By searching processively RecA protein pairs DNA molecules that share a limited stretch of homology. *Cell*, 1983, 34(2): 647–654.
- [16] Bell JC, Plank JL, Dombrowski CC, et al. Direct imaging of RecA nucleation and growth on single molecules of SSB-coated ssDNA. *Nature*, 2012, 491(7423): 274–278.
- [17] Joseph JW, Kolodner R. Exonuclease VIII of *Escherichia coli*. I. Purification and physical properties. *J Biol Chem*, 1983, 258(17): 10411–10417.
- [18] Joseph JW, Kolodner R. Exonuclease VIII of *Escherichia coli*. II. Mechanism of action. *J Biol Chem*, 1983, 258(17): 10418–10424.
- [19] Chang HW, Julin DA. Structure and function of the *Escherichia coli* Exo VIII protein, a member of the RecB nuclease domain family. *J Biol Chem*, 2001, 276(49): 46004–46010.
- [20] Zhang YM, Buchholz F, Muyrers JPP, et al. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet*, 1998, 20(2): 123–128.
- [21] Muyrers JPP, Zhang YM, Buchholz F, et al. RecE/RecT and Red α /Red β initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. *Genes Dev*, 2000, 14(15): 1971–1982.
- [22] Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(7): 2172–2175.
- [23] Halperin SO, Tou CJ, Wong EB, et al. CRISPR-guided DNA polymerases enable diversification of all nucleotides in a tunable window. *Nature*, 2018, 560(7717): 248–252.
- [24] Huang YN, Wu JR, Zheng B, et al. A recombinant expression and characterization of endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Enterococcus faecalis*. *Chin J Agric Biotechnol*, 2018, 26(4): 698–710 (in Chinese).
- 黄云娜, 吴今人, 郑蓓, 等. 粪肠球菌来源内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的重组表达及催化特性. *农业生物技术学报*, 2018, 26(4): 698–710.
- [25] Mitsudome T, Xu J, Nagata Y, et al. Expression, purification, and characterization of endo- β -N-acetylglucosaminidase H using baculovirus-mediated silkworm protein expression system. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 172(8): 3978–3988.
- [26] Ko CY, Lai YL, Liu WY, et al. Arabidopsis ENDO2: its catalytic role and requirement of N-glycosylation for function. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(20): 5169–5179.
- [27] Subramanian K, Rutvisuttinunt W, Scott W, et al. The enzymatic basis of processivity in lambda exonuclease. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(6): 1585–1596.

(本文责编 郝丽芳)