

苦瓜 *MAP30* 基因原核表达载体的构建和 PCR 快速检测重组子的研究

庄东红, 欧阳永长, 胡 忠

(广东省汕头大学生物系, 汕头 515063)

摘要: 根据已报道的序列, 把苦瓜 (*Momordica charantia*) *MAP30* 基因成功克隆到原核表达载体 pET28a(+) 中, 并对 PCR 快速检测阳性克隆进行了研究。结果表明, 直接用菌落、菌液、酚氯仿处理过的菌液, 以及提取的质粒进行 PCR 都可以成功地筛选阳性菌落。其中, 酚氯仿处理过的菌液 PCR 与质粒 PCR 的结果最接近, 而且比质粒 PCR 简单, 因此可作为方便可靠的阳性克隆筛选的新方法。

关键词: *MAP30*; PCR; 克隆子筛选; 苦瓜

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2004)05-0701-04

Construction of Prokaryotic Expression Vector for *MAP30* Gene and Study of PCR Methods for Rapid Identification of Recombinant

ZHUANG Dong-Hong, OUYANG Yong-Chang, HU Zhong

(Department of Biology, Shantou University, Shantou, Guangdong Province 515063, China)

Abstract: Based on the sequence reported by Lee-Huang, S, we cloned the *MAP30* gene of *Momordica charantia* (balsam pear) into a prokaryotic expression vector pET28a(+). A method by using PCR for rapid identification of positive clone was developed. Result showed this screening method can be used to detect positive colonies from samples of bacterial, purified plasmid, liquid culture, and liquid culture treated with mixture of phenol/Chloroform. The result from liquid-culture-treated-PCR (LCT-PCR) is very close to that of by plasmid-PCR. LCT-PCR is reliable and much easier to used than plasmid-PCR, therefore the LCT-PCR can be used for clone screening during the molecular cloning.

Key words: *MAP30*; PCR; identification cloning; balsam pear

MAP30 是苦瓜中的一种单链核失活蛋白, 在体外具有 N-糖苷酶活性^[1,2], 破坏 DNA 拓扑结构的活性^[3], 以及具有抑制 HIV-1 整合酶的活性^[4,5]。天然的和重组的 *MAP30* 都具有抗病毒、抗肿瘤和抗 HIV 的功能^[6], 在临床和农业上有着诱人的前景^[7]。但国内关于重组 *MAP30* 的研究鲜有报道。克隆 *MAP30*, 构建其表达载体是进一步研究重组 *MAP30* 的功能的基础, 也是其转基因等分子操作

的前提。

在构件建重组子的过程中, 对含有重组质粒菌落的鉴定是判断克隆是否成功的一步。一般常用的方法有: 抽提质粒酶切鉴定、 α 互补、插入失活、杂交筛选等^[8]。不论采用以上哪种方法, 都要经过挑取一些独立的菌落进行培养, 然后小量抽提质粒。再用限制酶进行消化, 通过凝胶电泳来鉴定出阳性克隆。这些操作花费时间长, 步骤复杂繁琐费力气; 而

收稿日期: 2003-12-09; 修回日期: 2004-03-16

基金项目: 广东省高校自然科学基金项目 (Z 02036) [Supported by Guangdong high-education University Nature Science Research Foundation. (Z 02036)]

作者简介: 庄东红 (1955—), 女, 广东人, 博士, 副教授, 研究方向: 植物遗传学。0754-2902083, dhzhuang@stu.edu.cn

且许多限制性内切核酸酶都很昂贵,做一次鉴定的费用也高。近来利用 PCR 灵敏的特点,出现了直接用菌落或处理的菌液,以及提取的质粒进行 PCR 扩增来筛选阳性克隆的方法^[9~13]。本实验室在构建苦瓜基因组 MAP30 基因重组表达载体时,摸索和改良了 PCR 快速检测的方法,使其更加简便可靠。本文以苦瓜基因组 MAP30 基因向载体 pET28a(+)中克隆为例,报道用 PCR 快速检测的方法筛选阳性克隆的实验结果。

1 材料和方法

1.1 材料

实验试剂中 TAQ 酶、DNA 限制酶等药品均购自上海生工公司;PCR 引物由上海生工公司合成纯化。原核表达载体 pET28a(+),DH5 α 为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取

用 CTAB 法从苦瓜中微量分离总 DNA^[14],SDS 裂解法小量制备质粒 DNA^[15]。

1.2.2 引物设计

根据 MAP30 基因^[6]的序列设计:

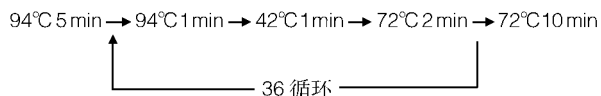
引物 1 5' CGG ACT CGA GTG TCA TGA ACA TGC CTT A 引入 XhoI 酶切位点(划线部分)

引物 2 5' GCG GGG ATC CAA AAT GGT GAA ATG CTT A 引入 BamHI 酶切位点(划线部分)

1.2.3 PCR 反应条件

PCR 条件为:引物:1 μ mol/L,dNTP 200 μ mol/L,Taq 1u,DNA 模板:1 μ L,10 \times PCR 缓冲液 0.2 μ L,灭菌双蒸水补齐至 20 μ L。

反应循环为:



1.2.4 感受态 DH5 α 细胞的制备

按照《分子克隆》指导的方法^[8]

1.2.5 克隆

从苦瓜基因组中克隆 MAP30 基因。以苦瓜 DNA 为模板,PCR 产物为单一特异的大小为 929bp 的条带(未附照片)。此产物先后经酶 Xho I 和酶 BamH I 切割后与经过同样处理的 pET28a(+)载体连接(14 $^{\circ}$ C,12h),其混合物转化感受态的 DH5 α 。

转化筛选平板为卡那板,37 $^{\circ}$ C 培养 15 h。

1.2.6 转化子的鉴定

1.2.6.1 菌落 PCR

先取一个空白的卡那 LB 固体培养基皿,在背面划上许多方格作记号,同时在有转化菌生长的培养皿背面也划上相同的方格子。用无菌牙签挑取转化的单菌落,在空白培养皿对应的小方格中触一下,然后,在 PCR 反应液中触一下。

1.2.6.2 菌液 PCR

挑取转化后在卡那抗生素 LB 固体培养基上生长的单菌落,分别接种到 2~3mL 的卡那抗生素 LB 液体培养基中,置 37 $^{\circ}$ C 摇床快速振摇(250 r/min),培养至对数生长期后期,静置 5~10min,然后取上层的菌液 1 μ L 直接作为 PCR 模板。

1.2.6.3 菌液处理 PCR

挑取转化后卡那 LB 固体培养基上生长的单菌落,分别接种到 2~3ml 的卡那 LB 液体培养基中,置 37 $^{\circ}$ C 摇床快速振摇(250 r/min)3~4h。取 100 μ L 菌液,加入等体积的酚氯仿溶液,12000r/min 离心 2 min,取 1 μ L 上清进行 PCR。

1.2.6.4 质粒 PCR

提取质粒(1.2.1 质粒提取方法),取 1 μ L 为模板。

2 结 果

在实验中,重组子转化 DH5 α 后,经卡那板筛选共长出 A、B、C、D、E、F 6 个白色菌落。对这 6 个单菌落分别进行菌落、菌液、菌液处理和质粒 PCR,其结果见图 1、图 2、图 3。从图示可以看出,4 种 PCR 方法鉴定的结果,都是 A、B、C 菌落出现了与阳性对照相同的 929bp 大小的条带,D、E、F 菌落则没有出现该条带,4 种方法得出的结论是一致的。对随机挑选的阳性克隆 B 菌落进行测序(上海生工),其序列与已公开发表的序列^[6](EMBL: S79450)的一致性为 99% (854/861),与另一序列(EMBL: AF284811)的一致为 100%,表明 MAP30 基因克隆成功并获得了相应的原核表达载体。

3 讨 论

筛选鉴定阳性克隆为 DNA 重组技术中关键的一步。它的结果在某种意义上决定了实验的成败。在向质粒载体中克隆外源基因时,如果克隆成功,以

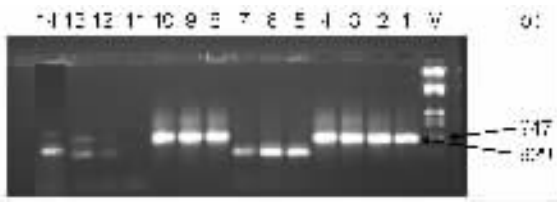


图 1 克隆载体转化菌液和菌液处理的 PCR 鉴定图

Fig. 1 The PCR results of liquid culture containing cloning vectortransfected bacteria and of that treated

Lane M: Lambda DNA/ EcoR I + Hind III;

1: *Momordica charantia* DNA;

2,3,4,5,6,7: are the PCR results with liquid culture of A, B,

C, D, E, F colonies respectively; 8, 9, 10, 11, 12, 13 are the

PCR results with liquid culture treated by phenol;

Chloroform of A, B, C, D, E, F colonies respectively,

14 pET28a(+)

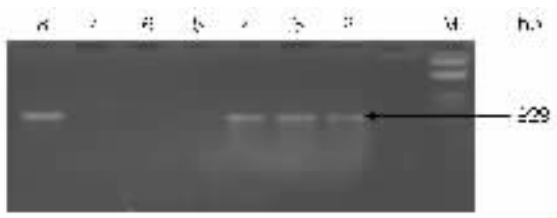


图 2 克隆载体质粒 PCR 鉴定图

Fig.2 Electrophoresis photo of cloning vectortransfected bacteria plasmid PCR products

Lane M: Lambda DNA/ EcoR I + Hind III;

1: Blank; 2: A colony; 3: B colony; 4: C colony;

5: D colony; 6: E colony; 7: F colony;

8: *Momordica charantia* DNA

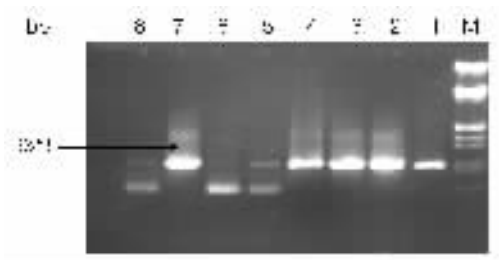


图 3 克隆载体转化菌落 PCR 鉴定图

Fig.3 Electrophoresis photo of cloning vectortransfected bacteria colonies PCR products

Lane M: Lambda DNA/ EcoR I + Hind III 1,7: *Momordica*

charantia DNA; 2,3,4,5,6,8 are the PCR results

with bacteria colonies of A, B, C, D, E, F

重组质粒做模板用外源基因的特异性引物进行 PCR 应能扩增出目的条带, 没有连接成功的质粒则不能扩增出来。这就是 PCR 方法及质粒快速鉴定法筛选阳性克隆的原理^[13]。本实验为了获得比质粒 PCR 更加简便而且可靠的筛选阳性克隆的方法, 进行了一些方法的摸索和改良, 结果表明几种不同方法都可成功地检测阳性重组子。

最方便的筛选莫过于菌落 PCR, 不必进行菌液培养就可直接进行检测。但是, 此方法有一定的不可靠性, 有出现假阴性的可能^[13]。本实验中多次重复, 虽未出现假阴性, 但是出现了非特异的扩增带和弱的假阳性条带(图 3)。因此在利用时应注意这些问题。

直接用菌液进行 PCR 的方法, 还未见相关报道。由于菌液的成分复杂, 含有多种离子和不确定物, 可能对 PCR 体系有干扰作用, 但本实验用对数期后期的上清液作为模板时, 未出现干扰现象。所以, 该方法不失为快速检测阳性克隆的又一种新方法。

近来, 有人对用 PCR 筛选阳性克隆的方法进行了改进, 用 Triton 或溶菌酶方法裂解细菌^[9,10,12], 使其释放的质粒作为模板, 以避免提取质粒的繁琐步骤。但受试验条件限制, 不仅需要溶菌酶等试剂, 而且要煮沸等多个步骤。本实验中, 通过菌液处理, 用酚氯仿来裂解细胞, 不但简化了实验, 并且其效果与质粒 PCR 相当, 表明利用酚氯仿使蛋白质变性具有同样的效果。此外, 在菌液 PCR(图 1)和菌落 PCR(图 3)中都出现了非特异的带, 而在菌液处理和质粒 PCR 中不明显(图 1, 图 2)。这可能由于酚氯仿抽提后, 细菌裂解释放模板质粒溶于菌液中。高速离心后沉淀了杂蛋白和某些成分, 减少了对 PCR 体系反应的干扰。

菌落、菌液, 以及菌液处理后的 PCR 在对阳性克隆的筛选中, 菌液处理 PCR 方法最接近质粒 PCR, 因此用菌液处理 PCR 筛选阳性克隆, 既避免了抽提质粒的繁琐, 又保证了结果的可靠性, 是一种快速简便筛选阳性克隆的好方法。

参 考 文 献(References):

- [1] Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, Tsurugi K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal

- RNA caused by the toxins. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(12): 5908~5912.
- [2] Endo, Y. Tsurugi. K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(17): 8128~8130.
- [3] Huang P L, Chen H C, Kung H F, Huang P L, Huang P, Huang H I, Lee-Huang S. Anti-HIV plant proteins catalyze topological changes of DNA into inactive forms. *Biofactors*, 1992, 4(1): 37~41.
- [4] Lee-Huang S, Huang P L, Nara P L, Chen H C, Kung H F, Huang P, Huang H I, Huang P L. MAP 30: a new inhibitor of HIV-1 infection and replication. *FEBS Lett*, 1990, 272: 12~18.
- [5] Lee-Huang S, Huang P L, Huang P L, Bourinbaier A S, Chen H C, Kung H F. Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plant proteins MAP30 and GAP31. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 8818~8822.
- [6] Lee-Huang S, Huang P L, Chen H C, Huang P L, Bourinbaier A, Huang H I, Kung H F. Anti-HIV and anti-tumor activities of recombinant MAP30 from bitter melon. *Gene*, 1995, 161(2): 151~156.
- [7] HOU Fa-Jian, LIU Wang-Yi. The progress on plant ribosome-inactivating proteins. *World Sci-Tech R & D*, 2000, 22(5): 68~72.
侯法建, 刘望夷. 植物核糖体失活蛋白的研究进展. *世界科技研究与发展*, 2000, 22(5): 68~72.
- [8] J Sambrook, E F Fritsch, T Manniatis (Translated by JIN Dong-Yan, LI Meng-Feng *et al.*). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. Beijing: Science Press, 1992, 56~62; 55~56.
J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯 (金冬雁, 黎孟枫等译). *分子克隆实验指南*, 第二版. 北京: 科学出版社, 1992, 56~62; 55~56.
- [9] WEI Hang-Dong, QU Cheng-Kui, HE Fu-Chu, WU Zu-Ze. Application of PCR technique in the screening of positive recombinants. *Bull Acad Mil Med Sci*, 1995, 19(1): 61~63.
魏汉东, 瞿成奎, 贺福初, 吴祖泽. PCR技术在鉴定阳性重组子中的应用. *军事医学科学院院刊*, 1995, 19(1): 61~63.
- [10] SHEN Guan-Xin, ZHU Hui-Fen, ZHANG Yue, WANG Shuo, ZHO Zhi-Gang, ZHOU Chun. Screening of transfected bacteria by bacteria colonies PCR and plasmid PCR. *Immunological Journal*, 2000, 16(2): 149~151.
沈关心, 朱慧芳, 张悦, 王硕, 朱志钢, 周春. 菌落PCR和质粒PCR对转化菌的筛选. *免疫学杂志*, 2000, 16(2): 149~151.
- [11] XUE You-Fang, LIU Xiao-Dong, WU He-Ling. PCR Detecting Homologous Recombinants from ES Cells. *Acta Genetica Sinica*, 1994, 21(2): 118~124.
薛左纺, 刘晓东, 吴鹤龄. PCR对ES细胞定位整合子的鉴定. *遗传学报*, 1994, 21(2): 118~124.
- [12] LIN Jun-Tang, LI Yu-Chang, ZHANG Hui-Yong, XING Zhi-Feng, XU Cun-Shuan. Study on a Method for scalping and identifying Positive Recombination Plasmid. *Journal of Henan Normal University (Natural Science)*, 2002, 30(3): 68~70.
林俊堂, 李玉昌, 张会勇, 邢智峰, 徐存栓. 结合PCR扩增快速筛选鉴定重组质粒. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2002, 30(3): 68~70.
- [13] XU Han-Mei, WANG Kai, LI Zhi-Guo. Two Rapid Screening Positive Colone Methods. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2001, 8(2): 72~74.
徐寒梅, 王凯, 李治国. 两种快速筛选重组阳性克隆的方法. *药物生物技术*, 2001, 8(2): 72~74.
- [14] Melody S. Clark (Translated by GU Hong-Ya, QU Li-Jia). *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*. Beijing: High Education Press, 1998, 6~7.
克拉克(英)(Clark, M S)主编(顾红雅, 瞿礼嘉主译). *植物分子生物学: 实验手册*. 北京: 高等教育出版社, 1998, 6~7.
- [15] Joseph Sambrook, David Russel (Translated by HUANG Pei-Tang *et al.*). *Molecular cloning a Laboratory manual*, 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002, 27~30.
J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔著(黄培堂等译). *分子克隆实验指南* 第三版. 北京: 科学出版社, 2002, 27~30.