

实验技术

一种高效克隆 PCR 产物的方法

张玉强

胡拥军 徐 钰

(第二军医大学长征医院 上海 200003) (中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

在分子生物学研究中,经常需要将 PCR 产物克隆到质粒载体中。通常的方法是直接进行平末端连接,或者利用 T_4 DNA 聚合酶将 PCR 产物 3' 突出端切平后,再进行平末端连接。但平末端连接的效率低,需要大量的外源片断和连接酶,载体需要去磷酸化,对连接反应缓冲液的要求也高^[1]。亦有作者在设计引物时,引入酶切位点,在 PCR 扩增后进行酶切纯化,再用相应的载体进行连接,使连接效率提高,该方法步骤较多,在扩增未知序列时,酶切位点的选择受到限制,具有盲目性。我们根据国外文献^[2-4],自制了带 T 载体,用于实验,取得了满意结果。本文对该方法作一介绍并进行讨论。

材 料 和 方 法

1. 材料

Taq DNA 聚合酶购自 Strategene 公司, T_4 DNA 连接酶及缓冲液购自 Bio-Lab 公司, SmaI 内切酶, dNTPs 购自华美公司, pBluescript II KS 为本室保存, DH5 α 感受态菌本室自制。

2. 方法

(1) 载体的制备 取 20 μ g pBluescript II KS 质粒,用 SmaI 内切酶彻底酶切,低熔点胶纯化回收后,溶于 ddH₂O 中,按下列参数进行反应:反应总体积 50 μ l, dTTP 20 μ mol, Mg²⁺ 2.5 μ mol, TaqDNA 聚合酶 8 U, 72 $^{\circ}$ C 45 分钟;用酚,酚:氯仿各抽提一次后,上清加 2 倍体积无水乙醇,0.1 体积 3 mol/L 醋酸钠, -20 $^{\circ}$ C 静置 1 小时以上。离心回收沉淀,重新溶于 ddH₂O 中,用微量法^[4]定量并配成 50 ng/ μ l, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

(2) 连接和转化 取上述产物 1 μ l,加 5 μ l PCR 产物(约 10 ng/ μ l), 2 μ l 5 \times 缓冲液, 2 U DNA 连接酶, 1.5 μ l ddH₂O, 16 $^{\circ}$ C 12—20 小时。按常规方法转化 DH5 α 感受态 100 μ l,培养平板加涂 IPTG/X-gal,

用蓝白斑法进行筛选,挑取白色透亮克隆酶切鉴定。反应同时设立对照组,用去磷酸化平末端载体代替上述载体进行反应。

结 果 与 讨 论

根据上述方法,利用不同的 PCR 产物作外源片断,共进行 18 次连接反应,平均阳性克隆率为 40%—70%,而对照组均小于 10%。挑选白色克隆进行酶切鉴定,95% 以上含有插入片段。

由于 TaqDNA 聚合酶具有非模板依赖性 3' 末端加碱基的特点,而且在 4 种 dNTPs 同时存在的情况下,优先加 A,因此 PCR 产物 3' 末端往往含有一个非配对的 A 碱基^[1,2]。利用 Taq 酶的这个特点,在只有 dTTP 底物的情况下,用 TaqDNA 聚合酶使平末端载体 3' 末端加 T 碱基^[3],从而与 PCR 产物互补,变平末端连接为粘末端连接,使连接效率大大提高。该方法与以往的方法相比具有几个较突出的优点:节省了大量的连接酶,减少了外源片断的需求量,载体不需要去磷酸化处理,制备的载体可供所有的 PCR 产物连接使用,免去了不同酶切位点需要不同的载体的麻烦。实验结果稳定,重复性好。

摘 要

利用 TaqDNA 聚合酶 3' 末端非模板依赖性加碱基的特性,制备了 3' 末端带 T 载体,与 18 种 PCR 产物进行连接反应。结果,阳性克隆率达 40%—70%,而对照组小于 10%。证明该方法是一种高效节省适用范围广的好方法。

本文得到中科院上海细胞所史燦副研究员的关心指导,特此致谢。

关键词: 克隆 带T载体 PCR产物

ques, 9: 304.

参 考 文 献

- [1] Clark, J. M. 1988, *Nucl Acids Res.*, 16: 9677.
[2] Karfman D. L et al. 1990, *Biotechni-*

- [3] Marchuk D. et al. 1991, *Nucl. Acids Res.*, 19: 1154.
[4] Sambrook J. et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

A HIGH EFFICIENT METHOD OF CLONING PCR PRODUCTS

ZHANG Yu Qiang HU Yong Jun XU Lian

(Shanghai Institute of Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, 200031)

ABSTRACT

A 3' T-tail pBluescript II KS plasmid vector was made according to the fact that Taq DNA Polymerase can add a single deoxynucleotide to double-stranded DNA fragments by a non-template-dependent extension reaction. It was then used to ligate 18 fragments of PCR products. 40%—70% positive clones was achieved vs less than 10% positive clones in control groups. The results shows that the method is high efficient, less cost and more useful.

Key words: Cloning T-tailed vector PCR products

研究简报

光和暗条件培养的眼虫藻(*Euglena gracilis*) 内 RuBP 羧化酶的免疫定位

王美琪 王伟君 高小彦

(中国科学院上海植物生理研究所 200032)

绿色植物中的双磷酸核酮糖羧化酶简称为 RuBP 羧化酶, 该酶是同化 CO₂ 的关键酶。我们曾用直接免疫荧光技术^[1]和免疫酶标技术^[2]研究 C₃、C₄ 植物叶片内 RuBP 羧化酶的分布特点, 但关于 RuBP 羧化酶在藻类细胞中的分布的工作很少。我们用菠菜叶绿体 RuBP 羧化酶的抗体 (AbRuBPCase) 以及蛋白 A-胶体金复合物 (PA-Au) 为探针的免疫电镜技术, 对在光和暗条件培养的眼虫藻中 RuBP 羧化酶的分布作了探讨。

材 料 和 方 法

1. 专一性抗体和 PA-Au 复合物的制备

参照王美琪等的方法^[1]制备菠菜叶绿体 RuBP 羧

化酶的抗体, Ab RuBPCase 以及正常兔血清均用 PA-Sephrose CL-4 B 纯化 IgG^[3]。参照王美琪等的方法^[4]制备 PA-Au 复合物(其直径为 17 nm) 作为免疫定位眼虫藻中的 RuBP 羧化酶的探针。

2. 组织处理程序

(1) 固定和包埋样品 参照文献^[5]Euglena(眼虫藻)培养液的成份配制眼虫藻液体培养液和固定培养基培养眼虫藻。取在 20℃ 恒温光照培养 21 天, 具有 CO₂ 同化活力^[6]的眼虫藻和在 20℃ 恒温暗培养的不具 CO₂ 同化活力的眼虫藻作为实验材料。参照王美琪等的方法^[7]固定和包埋, 以 2% 多聚甲醛和 0.1% 戊二醛的 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.2) 在 4℃ 固定样品 4 h, 在 0℃ 用不同浓度乙醇脱水; 在冰浴用 Lowicryl K₄M 树脂进行渗透, 以 K₄M 从 1/3 浓度逐增到 100%

* 本课题为国家自然科学基金资助项目