

经验交流

应用 T/A 策略克隆乙肝病毒 pC/C 及 C 基因

刘定燮 骆抗先

(第一军医大学南方医院感染内科实验室, 广州 510515)

摘要 以克隆乙型肝炎病毒 pC/C 及 C 基因为例, 报道了在 DNA 重组中, 当目的基因与载体末端不匹配时可采取的一新方法. 用内切酶切取的基因片段为平端时, 可在含 dATP 的反应体系中, 用 Taq 酶的末端转移酶活性在其 3' 末端加上单个碱基 (dA) 的突出尾; 基因片段为 3' 凹端时, 可在含 4 种 dNTP 的体系中, 利用 Taq 酶的聚合酶活性先将其末端补平, 再经末端转移酶活性在其 3' 末端加 dA 尾; 末端经此修饰的基因片段可亚克隆至 T 载体中, 再克隆于其他表达载体中.

关键词 DNA 重组, T 载体, Taq DNA 聚合酶, 乙型肝炎病毒

学科分类号 Q78

基因克隆中关键的一步在于用核酸外切酶、内切酶或 DNA 聚合酶等工具酶对外源 DNA 的末端作恰当的修饰, 使其能与质粒载体间形成匹配末端. 对于每一具体的基因克隆, 灵活应用这些工具酶并巧妙地优化 DNA 末端匹配策略, 常能取得事半功倍的效果. 本文介绍了我们在克隆乙肝病毒 (HBV) pC/C 及 C 基因过程中, 应用 Taq 聚合酶的末端转移酶及 DNA 聚合酶活性使 DNA 的非互补末端相互匹配的方法.

1 材料与方方法

1.1 含单拷贝 HBV DNA (adr 亚型) 的质粒 pADRI^[1] 由上海生物化学研究所惠赠. 载体 pcDNA-3 为 Invitrogen 公司构建. T easy vector、T4 DNA 连接酶与小牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP)

购自 Promega 公司, Taq 酶购自 Biostar 公司, 限制性内切酶为 NEB 公司产品.

1.2 用 V 型电泳槽电泳洗脱法纯化经内切酶消解后含 pC/C 或 C 基因的 DNA 片段. 在 PCR 的标准反应体系中 (50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris pH 8.3, 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 mg/L BSA, 0.2 mmol/L dATP、dTTP、dCTP、dGTP), 用每微克 DNA 中含有 2 U 的 Taq 酶对 *Sty* I 切取的 C 基因片段的 3' 凹端补平并加 dA 尾, 72 °C 反应 2 h. 在对 *Hinc* II 切取的 pC 基因片段 3' 平端加 dA 尾的反应体系中则仅含 0.2 mmol/L dATP, 其余条件不变.

1.3 DNA 的去磷酸化、连接及质粒的转化、提取均参照文献 [2]. 克隆流程如图 1 所示.

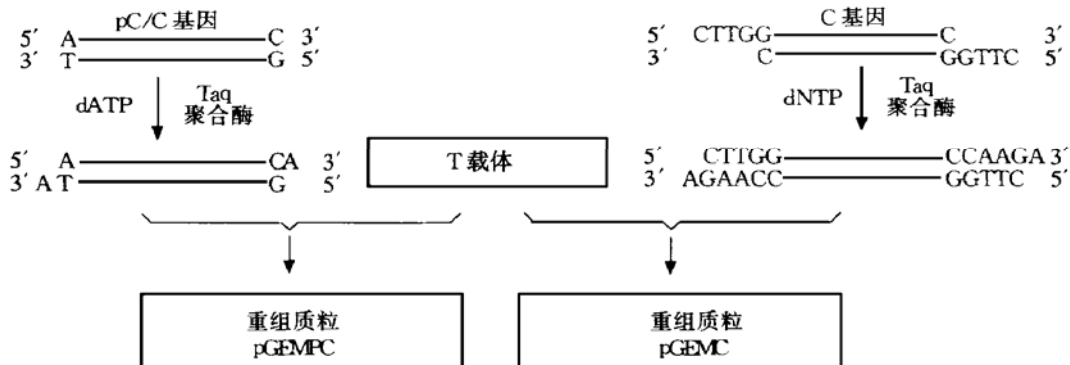


图 1 应用 T/A 策略克隆 pC/C 及 C 基因流程图

2 结果与讨论

本实验的目的在于将 HBV pC/C 及 C 基因克隆于真核表达载体 pcDNA-3 中. 通过 DNASIS 软件分析我们发现 *Hinc* II 可从质粒 pcADR-1 切下完整的 HBV pC/C 基因, *Sty* I 可切下完整的 C 基因, 但这两个酶切端均不能与载体 pcDNA-3 的多克隆位点区形成匹配粘端. 如何在目的基因末端加上一适当的酶切位点是本实验的关键所在.

T/A 克隆策略最初被用来克隆 PCR 产物, 这主要是基于 Taq 聚合酶具有不依赖模板的末端转移酶活性, 导致 PCR 产物的 3' 端加上额外一个核苷酸 (几乎总是 A)^[3], 而可使之与 3' 凸端为 T 的载体 (T 载体) 形成有效的粘端连接. Promega 公司出售的 T easy vector 的克隆位点两侧各含一 *Eco*R I 酶切位点, 这对于插入 DNA 片段的亚克隆较为方便. 我们即利用此特点, 先用 *Hinc* II 从 pcADR-1 切下末端为平端的 pC/C 基因片段, 其 3' 端经 Taq 酶作用加 dA 尾后, 利用 T/A 粘端匹配克隆到 T easy vector 中, 获得阳性重组子 pGEMPC (图 1).

经 *Sty* I 线性化的 575 bp C 基因片段的克隆同样如此, 只不过 *Sty* I 切口为 3' 凹端, 我们在反应体系中加入四种 dNTP, 利用 Taq 的聚合酶功能先补平其末端, 再利用其末端转移酶活性加 dA 尾, 然后克隆至 T easy vector (图 1), 筛选出阳性重组子 pGEMC. 重组质粒 pGEMC、pGEMPC 的酶切分析鉴定均与预期的一致 (未显示). 这样, C 基因及 pC/C 基因可用 *Eco*R I 分别从质粒 pGEMC、pGEMPC 中切出, 再克隆于 pcDNA3 的 *Eco*R I 位点间.

我们认为, 在目的基因片段与载体末端不匹配时, 应用上述方法是一简单快捷的途径. 除 3' 端为凹端或平端的 DNA 可用 Taq 酶在其 3' 端加 dA 尾外, 3' 突出端的 DNA 片段, 亦可先用 T4 DNA 聚合酶或绿豆芽核酸酶切平其凸端, 再用 Taq 酶在其末端加尾. 因此, T/A 克隆策略可适用于任何基因片段的克隆, 非常具实用性. 值得指出的是, 也可用 Taq 酶在目的载体 (如本文的 pcDNA-3 的 *Eco*R V 位点) 3' 端加 dT 尾, 而使目的基因片

段在加 dA 尾后能一步克隆至目的载体中, 而不需经过图 1 中的亚克隆步骤. 这一方法我们也曾试过, 但未能成功. 这可能是 Taq 酶在 DNA 末端加 dT 尾的效率很低, 而载体 pcDNA-3 无 α 互补功能, 对重组子不能作蓝白斑筛选, 很难从菌落中筛出阳性克隆. 因此我们认为, 如果目的载体具有 α 互补功能, 这一方法可值得一试.

参 考 文 献

- 1 甘人宝, 储美瑾, 沈绿萍, 等. 克隆的 adr 亚型乙型肝炎病毒 (pADR-1) DNA 的全顺序. 中国科学 (B 辑), 1986, 16 (1): 55~65
Gan R B, Chu M J, Shen L P, *et al.* Science in China (Part B), 1986, 16 (1): 55~65
- 2 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 332
- 3 Clark J M. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. Nucl Acids Res, 1988, 16 (2): 9677~9686

Cloning of pC/C and C Gene of Hepatitis B Virus by T/A Strategy. LIU Ding-Xie, LUO Kan-Xian (*Department of Infectious Diseases, Nangfang Hospital, Guangzhou 510515, China*).

Abstract A new strategy of cloning incompatible DNA ends was reported here with the example of cloning of pC/C and C gene of hepatitis B virus. When the terminals of DNA fragments digested by restriction enzymes are blunt ends, they can be formed into tails with a single 3' adenosine overhanged by modified with template-independent terminal transferase activity of Taq polymerase in reaction buffer containing dATP. Furthermore, if the DNA fragments have 5'-protruding sticky ends, these terminus can be filled into blunt ends with 5' to 3' Taq polymerase activity in the existence of dNTP, and then again added a single adenosine at their 3' ends by the transferase activity of Taq polymerase. The fragments modified as such above-mentioned can be easily subcloned into T vector.

Key words gene recombinant, T vector, Taq polymerase, hepatitis B virus