

T-载体的构建

马国达¹, 刘斯¹, 满朝来², 陈 亮¹

(1. 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江大庆 163319; 2. 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 黑龙江哈尔滨 150080)

摘要:以 pcDNA3.1/V5-His 为骨架载体, 利用限制性内切酶 EcoR V 得到平端化的线性载体, 在 dTTP 和 Taq 聚合酶作用下, 产生 3' 末端突出一个 T 碱基的 T-载体。目的基因与 T-载体连接, 大肠杆菌转化, 提取质粒进行酶切鉴定, 结果表明构建的 T-载体成功克隆了目的基因片段, T-载体构建成功。

关键词: T-载体; 构建; 克隆

中图分类号: Q782 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)03-0006-02

Construction of T-Vector

MA Guo-da¹, LIU Si-si¹, MAN Zhao-lai², CHEN Liang¹

(1. Biological Science and Technology College of Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing, Heilongjiang 163319; 2. Life Science and Technology College of Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150080)

Abstract: A method for construction of a cloning vector (T-vector) for direct ligation with PCR products was described in this passage. The T-vector derived from pcDNA3.1/V5-His was the skeleton vector which was a linear vector derived by restriction enzyme EcoR V and obtained a single T with 3' overhanging by dTTP and Taq polymerase. After the ligation with destination gene and T-vector, the transformation of *E. coli* plasmids extracted were confirmed by restriction endonuclease digestion, the results showed that the constructed T-vector successfully cloned the destination gene fragment, and the construction of T-vector was successful.

Key words: T-vector; construction; cloning

耐热 DNA 聚合酶引入 PCR 后, 使其操作大大简化, PCR 自动化成为现实, 这使 PCR 技术迅速而广泛地应用于生命科学的诸多领域。其中 Taq DNA 聚合酶应用最为广泛。但是, 由于其具有非模板依赖型末端转移酶活性, 用该酶进行 PCR 反应后, 所产生的片段 3' 末端大部分突出一个 A 碱基^[1-2]。T 载体克隆 PCR 产物的方法^[3-4]得到广泛应用。T 载体是一种很方便的克隆载体, 因其 3' 末端带有突出的 T 碱基, 可直接与 PCR 扩增产物 3' 末端突出 A 碱基配对, 因此大大提高了 PCR 产物与载体的连接效率^[5]。然而, 常规商业化 T 载体造价昂贵, 实验成本高。基于构建 T 载体的原理及方法简单, 且常规实验室均有条件构建, 因此可以实验室自制 T 载体, 以降低使用成本。本文利用限制性内切酶 EcoRV 酶切质粒 pcDNA3.1/V5-His 产生一个平末端, 在 Taq DNA 聚合酶和 dTTP 的作用

下, 得到 3' 末端突出一个 T 碱基的载体, 即 T-vector。由于在 pcDNA3.1/V5-His 的多克隆位点 EcoR V 上游和下游分别具有 BamHI 与 XhoI 酶切位点, 可用这两个限制性内切酶来鉴定改造的 T 载体的连接效率。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒 大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 α , 载体 pcDNA3.1/V5-His, 均由本实验室保存。

1.1.2 酶与试剂 限制性内切酶 EcoR V、Hind III、XhoI, Taq DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、dTTP、胶回收试剂盒均购自宝生物工程公司, 引物自行设计并交由上海生工公司合成。

1.2 实验方法

(1) 用 EcoR V 酶切质粒 pcDNA3.1/V5-His 20 μ L 酶切体系 (EcoR V 1 μ L, Buffer 2 μ L, pcDNA3.1/V5-His 5 μ L, ddH₂O 12 μ L), 在 37℃ 水浴酶切 2~4 h。
(2) 胶回收纯化酶切后的线性载体从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段采用宝生物工程公司胶回收试剂盒进行, 具体方法如试剂盒说明书。
(3) 载体 DNA 3' 末端 T

收稿日期: 2009-01-07
第一作者简介: 马国达(1974-), 男, 辽宁省建昌县人, 讲师, 博士, 从事肌肉发育相关基因功能研究。Tel: 13936798236; E-mail: sihan1107@126.com.

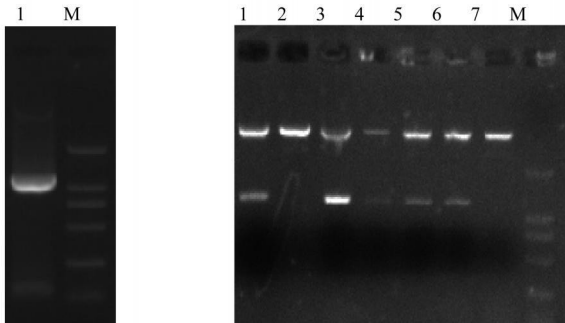
连接。在酶切的 pcDNA3.1/V5-His DNA 3' 末端连上 T 构建反应体系 (50 μ L): 10 \times PCR buffer 5 μ L、MgCl₂ 1.5 mM (终浓度)、dTTP 2mM (终浓度)、Taq 酶 1 μ L、最后加 ddH₂O 至 50 μ L, 在 72 $^{\circ}$ C 反应 2 h。(4)载体 DNA 片段的纯化。加入等体积酚/氯仿混匀, 放置数分钟, 5 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min, 使液体分层, 吸去酚/氯仿抽提水相至另一 1.5 mL 离心管中, 加入 1/10 体积的乙酸钠, 加 2 倍体积冷无水乙醇, 混匀。-20 $^{\circ}$ C 冰箱放置 2 h, 15 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min。倾去乙醇, 加入 70% 冷乙醇淋洗。倾去乙醇, 滤纸吸干, 真空抽吸 2~3 min。加入 30 μ L ddH₂O, 溶解 DNA。所得 DNA 即为改建的 T 载体。

1.3 改建的 T 载体连接效率鉴定

以本试验室保存的心肌锚定重复序列蛋白 CARP cDNA 为模板, PCR 扩增基因片段 (约 1 kb), 取 3 μ L PCR 产物和 1 μ L 上述改建的 T 载体 DNA 建立 10 μ L 的连接体系, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 连接产物转化感受态 DH5 α , 涂布于含有氨苄青霉素的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 长出的菌落中随机挑取 7 个菌落, 培养后提取质粒后用 Hind III 和 XhoI 进行双酶切鉴定。

2 结果与讨论

以 pcDNA3.1/V5-His 为骨架载体, 利用限制性内切酶 EcoRV 得到平端化的线性载体, 在 dTTP 和 Taq 聚合酶作用下, 产生 3' 末端突出一个 T 碱基的 T-载体。PCR 产物直接和 T 载体连接, 用常规氯化钙法制备的感受态菌转化, 对转化细胞提取质粒进行酶切鉴定。图 1 为目的基因 PCR 扩增, 目的基因 PCR 扩增的片段大小约 1 kb, 与我们给定的基因大小相一致。图 2 为重组质粒双酶切凝胶电泳, 重组质粒 DNA 经双酶切得到大、小两个片断, 小 DNA 片断为扩增的目的基因片段大小与图 1 PCR 产物一致, 大片段即为经质粒 pcDNA3.1/V5-His 改建后的 T 克隆载体与试验给定



1: PCR 产物 M: Marker DL2000 1~7: 质粒双酶切, M: Marker DL2000

图1 PCR 扩增插入片断电泳图 图2 质粒酶切鉴定电泳图

的质粒大小相一致, 因此证明构建的 T 载体成功克隆了目的基因片断。构建的 T-载体对 PCR 扩增的片段进行克隆, 在转化培养后长出的菌落随机挑取 7 个, 经酶切鉴定证实有 5 个为重重组子, T-载体连接效率约达 71%, 克隆效率较高, 说明此法构建 T-载体简单有效。

TA 克隆是一种快速的, 一步到位地把 PCR 产物直接插入到质粒载体的方法。本实验进行了一种简单、高效, 可在普通实验室中制备并可反复扩增的 T 载体制备方法, 并经 PCR 产物克隆 酶切鉴定, 得到了非常理想的结果。

参考文献:

[1] Zhou M Y, Clark S E, Gomez-Sanchez C E. Universal cloning method by TA Strategy [J]. Biotechniques, 1995, 19(1): 34-35.
[2] Marchurd D, Drumm M, Saulino A, et al. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products [J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19: 1154.
[3] Cha J, Bishail W, Chandrasegaran S. New vectors for direct cloning of PCR products [J]. Gene, 1993, 136: 369-370.
[4] Ichihara Y, Kurosawa Y. Construction of new T vectors for direct cloning of PCR products [J]. Gene, 1993, 130: 153-154.
[5] Ausubel F, Brent R, Kingston R. Short Protocols in Molecular Biology third edition [J]. John Wiley and Sons, 1995, 1: 13-14.

绿色食品

“绿色食品”是特指遵循可持续发展原则, 按照特定生产方式生产, 经专门机构认证, 许可使用绿色食品标志的无污染的安全、优质、营养类食品。之所以称为“绿色”, 是因为自然资源和生态环境是食品生产的基本条件, 由于与生命、资源、环境保护相关的事物国际上通常冠之以“绿色”, 为了突出这类食品出自良好的生态环境, 并能给人们带来旺盛的生命活力, 因此将其定名为“绿色食品”。

绿色食品必须同时具备 4 个条件: 1. 产品或产品原料地必须符合绿色食品生态环境质量标准; 2. 农作物种植、畜禽饲养、水产养殖及食品加工必须符合绿色食品的生产操作规程; 3. 产品必须符合绿色食品质量和卫生标准; 4. 产品外包装必须符合国家食品标签通用标准, 符合绿色食品特定的包装、装潢和标签规定。

绿色食品标准分为两个技术等级, 即 AA 级绿色食品标准和 A 级绿色食品标准。

AA 级绿色食品标准要求生产地的环境质量符合《绿色食品产地环境质量标准》, 生产过程中不使用化学合成的农药、肥料、食品添加剂、饲养添加剂、兽药及有害于环境和人体健康的生产资料, 而是通过使用有机肥、种植绿肥、作物轮作、生物或物理方法等技术, 培肥土壤、控制病虫草害, 保护或提高产品品质, 从而保证产品质量符合绿色食品产品标准要求。

A 级绿色食品标准要求产地的环境量符合《绿色食品产地环境质量标准》, 生产过程中严格按绿色食品生产资料准则和生产操作规程要求, 限量使用限定的化学合成生产资料, 并积极采用生物方法, 保证产品质量符合绿色食品产品标准要求。