

应用细菌内同源重组机制快速克隆腺病毒基因组的研究*

牛建强^{1,2}, 夏咸柱^{1**}, 扈荣良¹, 张守峰¹, 黄耕¹

(1. 解放军军需大学 军事兽医研究所解放军基因工程重点实验室, 吉林长春 130062; 2. 新疆军区卫生防疫大队, 新疆乌鲁木齐 830002)

A Rapid Method for Cloning the Adenoviral Genomes by Bacterial

Intermolecular Homologous Recombination

NIU Jian-qiang^{1,2}, XIA Xian-zhu^{1**}, HU Rong-liang¹, ZHANG Shou-feng¹, HUANG Geng¹

(1. Military Veterinary Institute, The Quartermaster University of PLA, Changchun Jilin 130062, China; 2. The Military Epidemic Prevention Unit in Xinjiang Military Area, Urumqi 830002, China)

Abstract: A novel procedure was used for cloning large adenovirus genome fragment by the homologous recombination in *E.coli* strain BJ5183. The 11.2Kb downstream fragment of the CAV-2 strain YCA18 genome was cloned by homologous recombination, the 1029bp left end and the 970bp right end of this fragment were separately amplified by PCR. They were then cloned into plasmid pPoly2 with direction from left fragment to right fragment, obtaining a "rescue" plasmid pT615. The pT615 was liberalized by *Hind* III and *Pst*I digestion and was cotransformed with the purified CAV-2 genome which was cut by *Bst*BI into competent *E.coli* strain BJ5183. Recombinant plasmids harboring the 11.2Kb downstream fragment of CAV-2 genome were obtained after bacterial intermolecular homologous recombination. The recombinant efficiency of all *E.coli* strains tested was 78.3%. One of the recombinant plasmids, pT618, was further identified by enzyme digestion analysis and PCR amplification. The results showed the plasmids contained the 11.2kb fragment downstream the genome of CAV-2.

Key words: Canine adenovirus type-2; *E.coli* BJ5183; Homologous recombination; Clone

关键词: 犬 2 型腺病毒; 大肠杆菌 BJ5183; 同源重组; 克隆

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2004)04-0407-03

以犬 2 型腺病毒为载体进行疫苗和基因治疗的研究, 是近年的研究热点。目前的焦点问题是新型载体的构建, 经典的方法是体外连接, 费时、费力。利用大肠杆菌分子间同源重组机制克隆目的基因, 是国外近年发展起来的新技术, 已经用于构建质粒^[1]、重组腺病毒^[2]、HSV 粘粒^[3]。但以犬 2 型腺病毒弱毒为载体还未见报道。本试验以大肠杆菌 BJ5183 为宿主菌, 应用其高效同源重组机制, 进行腺病毒大片段目的基因克隆的研究, 旨在建立一种快速克隆大片段腺病毒基因组的方法, 为以犬 2 型腺病毒自然弱毒为载体的狂犬病重组活疫苗的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

大肠杆菌 BJ5183 (recBC,sbcBC) 由上海第二医科大学人类基因治疗中心陈诗书教授惠赠, 克隆载体 pPoly2 由法国 TRANSGENE S.A 公司惠赠, *E. coli* C600 购自华美生物工程公司, pMD18-T、各种限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司, *Taq* Plus I DNA 聚合酶购自上海生工。CAV-2 自然弱毒 YCA18 株由本室分离并保存。

1.2 腺病毒组基因的制备

犬腺病毒培养及病毒全基因组的提取: 参照文

收稿日期: 2003-12-31, 回稿日期: 2004-02-24

* 基金项目: "十五" 全军医药卫生基金重点课题(01-Z-092)

作者简介: 牛建强 (1966-), 男, 山东省文登市籍, 博士, 副研究员, 主要从事腺病毒载体构建和活载体疫苗的研究。

** 通信作者。Corresponding author. Tel: 0431-6948799. E-mail: Xia-Xzh@yahoo.com.cn.

献^[6]中的方法进行。*Bst*BI 酶切腺病毒全基因组,以四馏水溶解核酸沉淀,定量、-20℃保存备用。

1.3 克隆载体(pT615)的构建

1.3.1 A1 和 A2 基因片段 PCR 扩增:从 GenBank 中查到 CAV-2 标准株 Toronto A26/61 (Acc.No. Nc001784)基因的全序列,片段 A1 大小为 1029bp,位于基因组第 20123bp-21144bp 位;片段 A2 大小为 970bp,位于基因组第 30359bp-31323bp 位。设计两对引物分别扩增 A₁ 和 A₂。

A₁: 5'-GGTGCCTAACTACAACTCAAT
5'-GCGGCCGCGCCTGCTGCTTGATTTTGTG
ATC
A₂: 5'-GCGGCCGCGCCTGCTGCTTGATTTTGTG
CCG
5'-CGGCCGCATCATCAATAATATACAGGAC
AAAG

为能将克隆基因从载体上完整的切下,引物中引入 *Not*I 酶切位点,为方便克隆,A2 片段下游引物 5'端引入 *Eag*I 位点。

以 50μL 体系进行 PCR 反应,用 DNA 回收试剂回收纯化 PCR 产物。

1.3.2 克隆载体的构建:将 PCR 扩增获得片段 A1、A2 分别克隆到 pMD18-T 载体中,得到 pMD18TA1 和 pMD18TA2 两亚克隆载体,用 *Not*I+*Xba*I 双酶切 pMD18TA1,回收目的片段 A1,定向克隆到经 *Not*I+*Xba*I 双酶切的 pPoly2 中,得到含 A1 的重组载体 pPolyA1。用 *Eag*I 分别酶切 pMD18TA2 和 pPolyA1,回收目的片段 A2,以 A2 与 A1 首尾相接的方式连入 pPolyA1 中,得到克隆载体 pT615。为了使载体充分线性化,用 *Pst* I+*Hind*III 双酶切 pT615,回收 3625bp 片段,即得到用于同源重组的线性化载体 DNA。

1.4 大肠杆菌 BJ5183 内同源重组与重组载体鉴定

1.4.1 BJ5183 内同源重组:取 100ng 酶切后纯化的腺病毒 DNA 和 100ng 线性化克隆载体,混合后总体积限制在 6μL 以下,共转化于 100μL 化学法制备 BJ5183 感受态中,冰浴 20min、42℃水浴 45s、冰浴 2min。每管加入 600μL 的室温 SOC,37℃、220r/min、震荡 45min。每管转化培养物平铺于两个预热的氨苄 LB 琼脂平板上,过夜培养,挑选的单菌落培养于 600μL 含 100μg/μL 氨苄的 SOC 中。

1.4.2 PCR 筛选阳性质粒:根据 CAV-2 Toronto A26/61 株 DNA 碱基序列,设计能扩增 CAV-2 基因组右端的一对引物 P₁ 和 P₂。

P₁: 5'-TTGGTACTTCCACTTGTGCG

P₂: 3'-TAGGCAAAGGTTAAGGGTGG

此对引物扩增片段长度为 948bp。记录三次重组获得菌落总数、PCR 阳性菌落总数。重组率=PCR 阳性菌落总数/菌落总数×100%。

1.4.3 从 BJ5183 中提取重组质粒:PCR 结果为阳性者,菌液离心去上清,按小提步骤提取质粒。

1.4.4 重组质粒再转化:取从 BJ5183 提取纯化的 DNA,转化 *E. coli* C600。按小提步骤提取质粒。

1.4.5 重组载体鉴定:根据 CAV-2 YCA18 株 DNA 的酶切位点和载体上的克隆位点,选 *Eco*R I、*Xba* I、*Hind* III、*Bgl* II 四种限制性内切酶对其中一个重组质粒(pT618)酶切,以确定克隆片段大小与酶切位点是否与预期结果相同。载体稳定性分析:用重组质粒(pT618)连续转化大肠杆菌 C60010 次后,用 *Eco*R I、*Xba* I、*Hind* III、*Bgl* II 四种限制性内切酶酶切,与第一次得到重组质粒(pT618)酶切图谱比较。

2 结果

2.1 克隆载体(pT615)鉴定

为了使载体充分线性化,减少背景,我们选择 *Hind* III 和 *Pst* I 对克隆载体双酶切,切去的片段大小为 459bp,剩余片段为 3625bp,酶切后电泳结果与预计相符。线性化载体两末端分别保留腺病毒 855bp 和 758bp 同源序列。

2.2 PCR 筛选阳性质粒

三次转化共获得抗氨苄青霉素菌落 83 个,其中 PCR 阳性菌落 65 个,重组率为 78.3%。阳性菌落均能扩增出大小为 948bp 左右目的片段(见图 1)。与设计一致。

2.3 重组载体(pT618)鉴定

重组载体(pT618)连续转化大肠杆菌 C600 10 次后,四种酶酶切图谱与第一次转化得到的重组载体一致,pT618 酶切片段大小、数目与预计结果完全一致(见图 2)。克隆片段大小约为 11.2Kb。

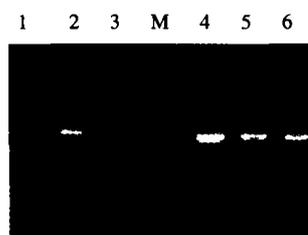


图 1 菌落 PCR 产物电泳图

Fig.1 The PCR amplification of CAV-2 gene from colonies M, DL2000; 2-6, positive colonies; 1, negative colony.

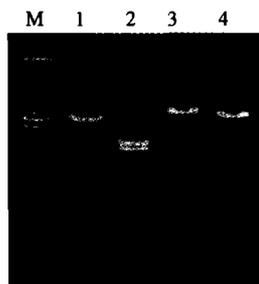


图2 重组载体(pT618)酶切鉴定图谱

Fig.2 Digestion of recombinant vector pT618 by restriction enzyme

M, DL15000; 1, pT618/*Xba*I; 2, pT618/*Hind* III; 3, pT618/*Eco*R I; 4, pT618/*Bgl* II.

3 讨论

经菌体内同源重组, 阳性菌落 PCR 扩增、多种限制性内切酶酶切分析证明克隆到了 CAV-2 YCA18 株基因组下游 11.2Kb 片段, 重组效率达 78.3%。本系统不需要对克隆载体脱磷处理, 重组时不使用连接酶, 具有快速、高效、稳定、省力的特点, 可以应用于腺病毒大片段目的基因的克隆, 证明采用细菌内同源重组机制克隆犬腺病毒弱毒株全基因是可行的, 本方法也可应用于其它双链 DNA 病毒基因的克隆。

1993 年 Jonathan^[4]首次在大肠杆菌 JC8679 和 XL-1 中, 以 PCR 产物为目的基因, 成功克隆长度为 608bp~2132bp 片段。1996 年 Chartier^[3]用大肠杆菌 BJ5183 进行人 5 型腺病毒全基因克隆, 克隆的基因组 DNA 具有感染性。其原理是: 两末端具有 100bp 以上同源序列的两链状双链 DNA, 在大肠杆菌 (*recBC, sbcBC*) 中, 通过 RecF 通路发生同源重组, 可产生环状质粒^[5]。

载体上腺病毒同源片段的长度是影响有效重组的重要因素之一, 左、右末端应不少于 100bp。

本实验设计的、左、右同源序列为 1029bp 和 970bp, 能使载体上的同源序列与病毒 DNA 发生有效同源重组。在这一体系中, 经常遇到的问题是: 筛选重组子的背景太高, 阳性率低。为降低筛选的背景, 载体必须充分线性化; 为提高重组效率, 可增加转化 DNA 的量。

细菌 BJ5183 同源重组效率较高, 但产生的质粒 DNA 量很低, 不足以进行快速鉴定、酶切分析, 必须再转化 C600 使重组质粒 DNA 大量扩增。PCR 呈阳性的菌落不一定含有 CAV-2 腺病毒完整目的基因, 可能是部分目的片段, 因此, 重组腺病毒的载体还必须进行多种酶切分析。从 PCR 阳性菌落重组质粒酶切结果来看, 酶切图谱都正确, 说明该体系中有有效重组率很高。

参考文献

- [1] Raymng C K, Pownder T R, Sexson S L. General method for plasmid construction using homologous recombination[J]. *Biotechniques*, 1999, 26: 134-141.
- [2] Chartier C, Degryse E, Ganzter M, *et al.* Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *E. coli*[J]. *J Virol*, 1996, 70: 4805-4810.
- [3] Kong Y, Yang T, Geller A I, *et al.* An efficient in vivo recombination cloning procedure for modifying and combining HSV-1 cosmid[J]. *J Virol Methods*, 1999, 80: 129-136.
- [4] Jonathan D O, Kenneth W K, Bert V. In vivo cloning of PCR products in *E. coli*[J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21: 5192-5197.
- [5] Youil R, Timothy J T, Qin S, *et al.* Rapid method for the isolation of full length adenoviral genomes by bacterial intermolecular homologous recombination[J]. *J Virol Methods* 2001, 92: 91-97.
- [6] Shimagawa M, Massuda A, Ishiyama T, *et al.* A rapid and simple method for preparation of adenovirus DNA from infected cells[J]. *Microbiol Immunol*, 1983, 27(9):817-822.