

含有尿嘧啶 DNA 糖苷酶基因 表达载体的构建*

刘丽¹ 贲昆龙²

(1 华南农业大学动物科学系, 广州, 510642; 2 中国科学院昆明动物研究所)

摘要 采用自行设计的带酶切位点的上下游引物, 用 PCR 技术, 从大肠杆菌 ATCC 23743 的 DNA 中, 获得了含有编码尿嘧啶 DNA 糖苷酶(UNG)基因的 PCR 产物, 以该 PCR 产物构建了重组克隆质粒 pGEM/UNG. DNA 序列分析结果确证其中含有完整的 UNG 基因. 利用该重组质粒, 进一步构建了重组表达质粒 pBV/UNG.

关键词 尿嘧啶 DNA 糖苷酶(UNG)基因; 克隆载体; 表达载体; 构建
中图分类号 Q 71

尿嘧啶 DNA 糖苷酶(UNG)是细胞中含量最多的一种 DNA 糖苷酶, 它的识别对象是 DNA (双链和单链)中的尿嘧啶碱基. UNG 能准确地识别出尿嘧啶与胸腺嘧啶或胞嘧啶之间在结构上的细微差别, 而且它只作用于 DNA 链中的尿嘧啶. UNG 的这种防止和修复错误配对的功能, 是生物体的自我保护机制之一(刘丽等, 1997). UNG 是研究蛋白质-DNA 相互作用、损害识别以及在原子水平上从 DNA 中去除被损伤碱基的良好材料(Cleaver et al, 1995). 利用 UNG 对尿嘧啶碱基的特异性识别作用和对热不稳定的特性, 还将它用于防止 PCR 技术中的结转污染(carry-over contamination)造成的假阳性(Longo et al, 1990; Udaykumar et al, 1993). 该方案只需要在标准 PCR 技术中采取两个改变: 在所有反应中用 dUTP 替代 dTTP; 在 PCR 温度循环前用 UNG 与 PCR 反应物共温育. 由于 UNG 能降解掺入 dUTP 的 PCR 产物, 这样可以避免结转污染和假阳性. 结合本实验室研制新型 PCR 检测试剂盒的需要, 笔者进行了 UNG 基因重组克隆质粒(pGEM/UNG)和表达质粒(pBV/UNG)的构建, 为进一步开展 UNG 基因的表达和应用研究奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 热启动 PCR 及产物的回收和鉴定

参照文献报道(Varshney et al, 1988)的 UNG 基因序列, 设计了一对带酶切位点的引物: P I : CAGGAGAATTCCATGGCTAACGA, 含 *Eco* R I 识别位点; P II : AACTCATGCATCCGGCATTTC-CC, 含 *Nsi* I 识别位点.

PCR 反应体积为 50 μ L, 其中含有 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, 4 \times dNTPs 各 0.1 mmol, P I 和 P II 各 50 pmol, BSA 1 μ L, 模板 DNA 0.5 μ g, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 u. 采用热启动(95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min)及中国科学院昆明动物研究所免疫学实验室的优化 PCR 温度循环程序: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C

1999-02-02 收稿 刘丽, 女, 34 岁, 讲师, 博士

* 中国科学院与云南省合作资助项目, 在中国科学院昆明动物研究所完成

2 min, 70 °C 3 min; 25 个循环后在 72 °C 作用 20 min.

用低熔点琼脂糖凝胶回收 PCR 产物(Sambrook et al, 1989).

1.2 克隆载体 pGEM/UNG 的构建与鉴定

将纯化后 PCR 产物用 *EcoR* I/*Nsi* I 双酶切后,按常规方法与载体质粒 pGEM-7Zf(+)(也用 *EcoR* I/*Nsi* I 双酶切)连接、转化,利用氨苄青霉素抗性和颜色标记双重筛选,阳性菌落经扩增后用碱变性法提取质粒 DNA,通过质粒 PCR 和 *EcoR* I 及 *EcoR* I/*Nsi* I 酶切进行鉴定.

1.3 UNG 基因序列的测定

以重组质粒为模板,先进行 PCR 反应,然后对反应产物进行 DNA 序列测定,具体操作参照 Pharmacia 公司 T7Sequencing™ Kit 的说明,测序工作在中国科学院细胞与分子进化开放实验室进行.

1.4 表达载体 pBV/UNG 的构建与鉴定

基本操作同 1.2. 用 *EcoR* I/*Nsi* I 双酶切目的片段,用 *EcoR* I/*Pst* I 双酶切 pBV220,进行定向克隆.

2 结果

2.1 克隆载体 pGEM/UNG 的构建

重组质粒 pGEM/UNG 构建路线如图 1 所示. 将双酶切的 PCR 产物,插入 pGEM-7Zf(+)载体的 *EcoR* I 和 *Nsi* I 位点,转化采用 CaCl_2 法制备的感受态受体菌 JM109,再将转化菌于含氨苄青霉素的培养基上培养,并采用 α 互补法进行颜色筛选,获得了多个阳性菌. 从阳性克隆中提取质粒 DNA,用限制性内切酶 *Eco* I 进行单酶切,得到长度为 3 650 bp 的单一一条带,这是 UNG 基因的双酶切片段 716 bp 和 pGEM-7Zf(+)DNA 双酶切片段 2 934 bp 的连接物;用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Nsi* I 双酶切,得到长约 716 bp 和 2 934 bp 的 2 个片段. 同时,用引物 P I 和 P II 进行 PCR 扩增后,得到长约 732 bp 的特异性产物(图 2). 上述结果表明,目的片段已被正确插入载体质粒中,符合实验设计.

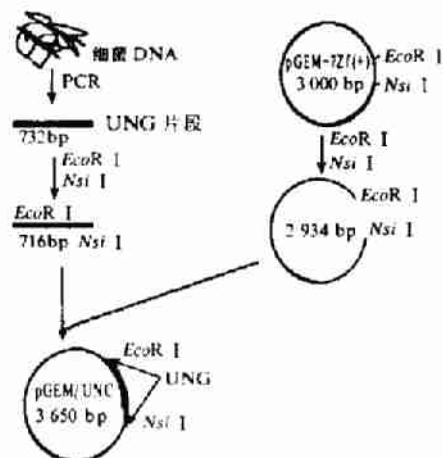
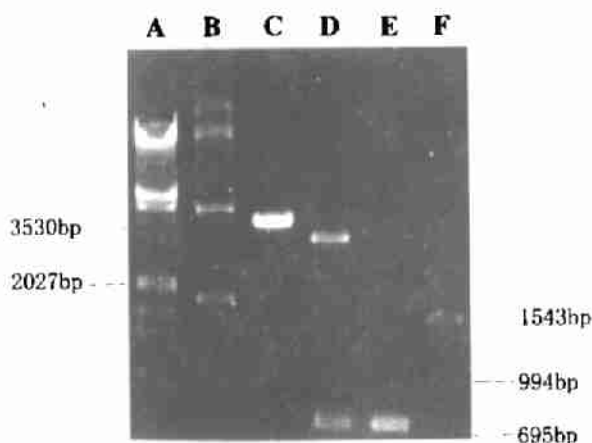


图 1 重组质粒 pGEM/UNG 的构建路线



A 和 F: 分子组成标准; B: 重组质粒 pGEM/UNG; C: *EcoR* I 酶切产物; D: *EcoR* I + *Nsi* I 双酶切产物; E: 重组质粒 pGEM/UNG 的 PCR 产物

图 2 重组质粒 pGEM/UNG 的电泳鉴定

2.2 UNG 基因核苷酸序列的测定

低熔点琼脂糖凝胶回收重组质粒的 PCR 产物,进行序列测定,结果与 GenBank 中贮存的 *E. coli* 菌株 UNG 基因的序列完全一致。

2.3 表达载体 pBV/UNG 的构建

表达质粒 pBV/UNG 构建路线如图 3 所示。将双酶切的 PCR 产物,插入到 pBV220 载体的 *EcoR* I 和 *Pst* I 位点之间,从阳性克隆中提取质粒 DNA,用限制性内切酶 *EcoR* I 进行单酶切,得到长度为 4 362 bp 的单一一条带,该条带为 UNG 基因双酶切片段 716 bp 和 pBV220DNA 双酶切片段 3 646 bp 的连接物;用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Nsi* I 双酶切,只出现单一一条带 4 362 bp,因为 UNG 基因双酶切片段上的 *Nsi* I 末端与 pBV220DNA 双酶切片段的 *Pst* I 末端相互连接后,这两种酶的酶切位点都消失了。同时,用引物 P I 和 P II 进行 PCR 扩增后,得到长约 732 bp 的特异性产物(图 4)。上述结果表明,目的片段已被完整地插入到表达载体之中。

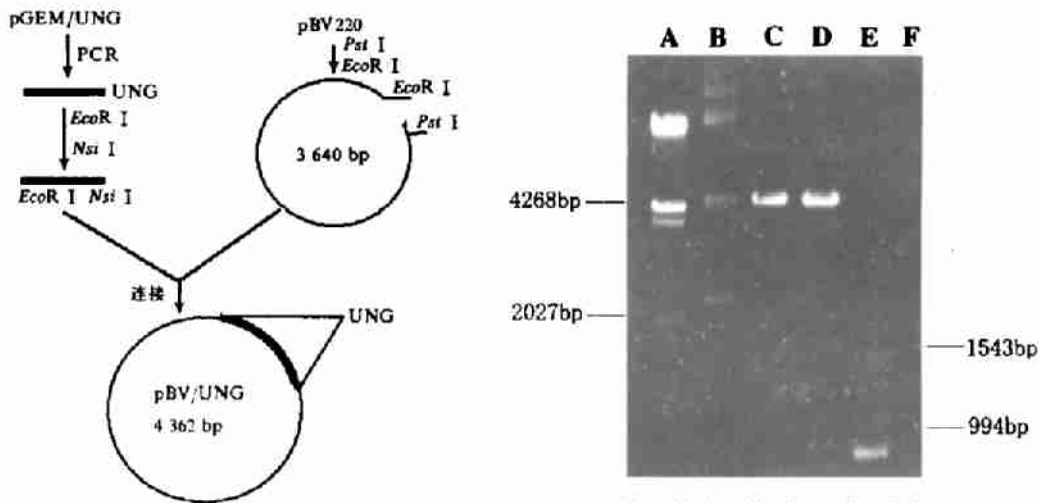


图 3 重组质粒 pBV/UNG 的构建路线

A 和 F: 分子组成标准; B: 重组质粒 pBV/UNG;
C: *EcoR* I 酶切产物; D: *EcoR* I + *Nsi* I 双酶切产物;
E: 重组质粒 pBV/UNG 的 PCR 产物

图 4 重组质粒 pBV/UNG 的电泳鉴定

3 讨论

大肠杆菌的 UNG 是一个有 228 个氨基酸的单聚体多肽,其分子组成为 25 558。已知 UNG 基因的全部核苷酸序列,它的开放读码框含有 690 个核苷酸(Duncan et al, 1984; Varshney et al, 1988)。本实验利用 PCR 技术,从大肠杆菌 K-12 系菌株(ATCC 23 743)的总 DNA 中,扩增出特异性的 UNG 基因片段。PCR 的特异性是由 2 个人工合成的引物序列决定的,所以引物的特异性直接关系到 PCR 的扩增效率和特异性。参照已报道的大肠杆菌总 DNA 中含 UNG 基因的 *Hpa* I 片段序列,根据引物设计原则,笔者设计了一对引物,上游引物 P I 位于 *Hpa* I 片段的第 521 ~ 543 间;下游引物 P II 与 *Hpa* I 片段的第 1 230 ~ 1 252 间反向配对,二者之间包括整个 UNG 基因片段,跨幅约 732 bp。以 PCRDESN 软件分析表明,上游引物 P I 和下游引物 P II 长度适中,其内部没有连续 4 个以上碱基构成发夹结构,二者的 3' 端之间无同源性,不会形成引物二聚体。通过实验证实,利用该引物对,得到了特异性的 PCR 产物,其大小与预计的完全吻合。

一个理想的克隆载体应该有松弛型复制子,多克隆位点和至少一种筛选标记.笔者选用质粒 pGEM-7Zf(+)作为本研究的克隆载体,其长度只有 3 000 bp,内含具有 15 种单一酶切位点的多克隆位点区(MCS),而且具有双重选择标记(LacZ 插入失活的颜色选择和氨苄青霉素抗性).根据 pGEM-7Zf(+)的限制性内切酶图谱,结合用计算机分析出的 UNG 基因片段的限制性内切酶图谱,笔者分别在上、下游引物内设计了在 UNG 基因片段内没有的 *EcoR* I 酶切位点和 *Nsi* I 酶切位点.在 pGEM-7Zf(+)中,它们都只有单一的识别位点.双酶切后,外源 UNG 基因片段的两粘性末端与载体 DNA 的两粘性末端是分别匹配的,所以外源 UNG 基因片段能被定向地克隆到 pGEM-7Zf(+)中.本实验设计可以极大地降低连接反应中的各种非特异性的环化现象.实验结果显示,构建的重组质粒与设计相符.重组质粒中的 UNG 基因片段的核苷酸序列的测定结果与 GenBank 中贮存的 *E. coli* 菌株 UNG 基因的序列完全一致,说明重组质粒 pGEM/UNG 中的 UNG 基因片段是完整的.

作为表达载体,除了具备克隆载体的因子,还需要有强启动子、核糖体结合位点、转录起始信号、转录终止信号、翻译起始密码子和终止密码子等一系列调控序列.笔者选用的 pBV220 原核高效表达载体的特性是:1)同时含有 *cIts* 857 抑制子基因与 P_L 启动子,可以转化任何菌株;2) P_R 与 P_L 启动子串联以及人工合成高效 SD 序列,有增强的转录活性;3)SD 序列后面紧跟多酶切点,便于插入带起始 ATG 的外源基因,可表达非融合蛋白;4)强的转录终止信号可防止出现“通读”现象,有利于质粒-宿主系统的稳定(张智清等,1990).本实验采用双酶切法,将外源 UNG 基因片段定向插入到 pBV-DNA 之中.在 pBV220 中,虽然没有 *Nsi* I 的识别位点,但其中的 *Pst* I 位点能产生与 *Nsi* I 匹配的亲和粘性末端,所以 UNG 基因片段的 *Eco* RI 和 *Nsi* I 双酶切产物能够被定向重组入 pBV220 之中,但随着外源片段的插入,*Pst* I 和 *Nsi* I 的酶切位点都会消失.对重组 DNA 的限制性酶切分析和 PCR 检测结果表明,已成功构建了重组表达质粒 pBV/UNG,为继续进行重组蛋白的诱导表达研究奠定了基础.

参 考 文 献

- 刘 丽,贲昆龙.1997.具有修复功能的尿嘧啶 DNA 糖苷酶.生命的化学,17(5):13~15
- 张智清,姚立红,侯云德.1990.含 $P_R P_L$ 启动子的原核高效表达载体的组建及其应用.病毒学报,6:112~116
- Cleaver J E, Layher S K. 1995. "If the shoe fits": clues on structural recognition of DNA damage. Cell, 80:825~827
- Duncan B K, Chambers J A. 1984. The cloning and overproduction of *Escherichia coli* uracil-DNA glycosylase. Gene, 28:211~219
- Longo M C, Beminger M S, Hartley J L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene, 93:125~128
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 30~31
- Udaykumar, Epstein J S, Hewlett I K. 1993. A novel method employing UNG to avoid carry-over contamination in RNA-PCR. Nucleic Acids Res, 21:3 917~3 918
- Varshney U, Hutcheon T, van de Sande J H. 1988. Sequence analysis, expression, and conservation of *Escherichia coli* uracil DNA glycosylase and its gene(UNG). J Biol Chem, 263:7 776~7 784

(下转第 44 页)

Study on the Establishment of Swine Selection and Breeding Systems

Tan Deming¹ Chen Wenguang² Zhang Cun¹ Lei Dongfeng¹

(1 Guangshanbo Pig Industry Co. Ltd. Shenzhen, 518103; 2 Dept. of Animal Science, South China Agric. Univ.)

Abstract Breeder pigs including American-lines Landrace, Large White, Duroc, Hampshire and line 24 were selected and bred by systematic ally. Continuing tests of the 6 generations selected in 10 years indicated the pigs accomplished the goals of the breeding program. Breeding pigs showed multifarious characters, i. e. high prolificacy, fast growth rate and high production efficiency. Dam line breeder swine (Landrace and Large White) exhibited evident estrous signs, tame temperament, high conception rate, large litter size, with live birth averaging 10.37 and 10.86, and 21-day litter mass averaging 54.23 and 58.81 kg, for Landrace and Large White respectively. Fast growth was expressed by sire line boars which achieved maximum daily gain of up to 1 020 g during test period. In addition the boars also attained good performance regarding to feed conversion efficiency and leanness with lean rate reaching 65.3%, Commercial pigs produced by cross combinations of Duroc × Landrace × Large White and Duroc × Large White × Landrace expressed high heterosis and took 165 days to reach 90 kg of market mass.

Key words lean-meat swine; selection; breeding; system

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 39 页)

Construction of an Expression Vector Containing Uracil DNA Glycosylase (UNG) Gene

Liu Li¹ Ben Kunlong²

(1 Dept. of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642;

2 Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences)

Abstract Using a pair of specific primers (PI and PII), a PCR fragment containing the gene encoding for uracil DNA glycosylase (UNG) was obtained from the total DNA of the *Escherichia coli* K-12 strain, ATCC23743. The PCR fragment was cloned into plasmid pGEM-7Zf(+) after the latter had been digested with restrictive enzymes, *EcoR* I and *Nsi* I. The nucleotide sequence of the cloned fragment in the recombinant plasmid confirmed that the cloned UNG gene was correct and intact. Thereafter, the UNG gene fragment was subcloned into an expression plasmid pBV220, located downstream of the bacteriophage λP_L promoter. The UNG gene in pBV/UNG was shown to be intact.

Key words uracil DNA glycosylase (UNG) gene; cloning vector; expression vector; construction

【责任编辑 柴 焰】