



戢志呈, 江雁翔, 刘耀光, 等. 应用 Gibson Assembly 方法构建植物表达载体[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(5): 112-116.

应用 Gibson Assembly 方法构建植物表达载体

戢志呈, 江雁翔, 刘耀光, 张群宇

(亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室/华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】构建方便快捷的植物表达载体.【方法】应用 Isothermal *in vitro* recombination system or “Gibson Assembly”方法设计包含片段间 20 ~ 25 bp 互补重叠序列的引物,通过 PCR 扩增出带有首尾重叠的目的 DNA 片段,可将 1 个或多个片段和线性化的载体一步组装成表达载体.【结果和结论】利用该方法快速构建了多个水稻基因的全长以及部分缺失编码区表达载体.此外,还通过对 Gibson Assembly 连接产物进行 PCR 扩增后再连接到载体,提高 DNA 片段组装的效率.本方法不受目的片段内部限制性酶切位点的限制,可广泛应用于各种载体的构建.

关键词: Gibson Assembly; 体外重组; 植物表达载体构建

中图分类号: Q754

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2014)05-0112-05

Application of Gibson Assembly method for plant expression vector construction

Ji Zhicheng, JIANG Yanxiang, LIU Yaoguang, ZHANG Qunyu

(State Key Laboratory of Subtropical Agro-bioresources Conservation and Utilization/College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】To construct a convenient and efficient plant expression vectors.【Method】Gibson et al developed an isothermal *in vitro* recombination system or Gibson Assembly for ligation of multiple DNA fragments. The primers were designed to amplify target DNA sequences that contained 20 – 25 bp overlapping ends. The target DNA segments, linearized vector and the enzyme mixture were mixed in one tube to perform the assembly reaction.【Result and conclusion】Using this method, several vectors for expressing rice genes were assembled. To increase the efficiency for cloning multiple fragments, the assembled primary products by PCR were amplified and then ligated into the vector. The Gibson Assembly method is faster and simpler without the limitation of internal restriction endonuclease sites of target genes, and it can be applied widely to construction of various vectors.

Key words: Gibson Assembly; isothermal *in vitro* recombination system; plant expression vector construction

表达载体是研究目的基因功能和遗传工程的重要工具,在亚细胞定位、目的基因表达、基因敲除、酵母双杂交和单杂交、T-DNA 插入突变等技术方法中

广泛应用.传统载体的构建基于限制性内切酶和 T₄ DNA 连接酶的方法,它要求先从细胞或组织中分离目的基因的 DNA 片段,然后利用限制性内切酶切断

收稿日期:2013-06-06 优先出版时间:2014-07-17

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20140717.0922.041.html>

作者简介:戢志呈(1989—),男,硕士研究生, E-mail: zhichengji@126.com;通信作者:张群宇(1973—),男,副研究员,博士, E-mail: zqy@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(30871331);973 计划项目(2011CB100204)

<http://xuebao.scau.edu.cn>

双链 DNA 分子从而产生黏性末端或平末端. 如果线性化载体也产生相同的末端, 二者可以在 T_4 DNA 连接酶作用下重新形成磷酸二酯键, 构成一个完整的 DNA 分子^[1]. 此方法操作容易, 但针对多个片段的连接, 则需要进行多次的酶切连接, 而且还受限于可利用的酶切位点.

Gibson Assembly 方法是 Gibson 等^[2]发明的将多个 DNA 片段在 1 次反应中实现分子间连接. 此方法关键要求是连接片段与线性化载体首尾有一小段的互补重叠序列. 利用 T5 核酸外切酶 (T5 exonuclease) 的 5'→3' 外切酶活性产生黏性末端, 带有互补的重叠序列 DNA 配对, 再利用 Phusion DNA polymerase 补齐片段上的缺口部分, 最后通过 *Taq* DNA Ligase 将多个 DNA 片段连接起来. 2009 年 Gibson 等^[3]应用 Gibson Assembly 方法设计 40 bp 的互补重叠序列合成了 3 个 5 kb 的片段, 并且成功地插入到 1 个 8 kb 的细菌人工染色体上. 2010 年 Gibson 等^[4]以 600 个含有 60 bp 互补重叠序列的片段利用 Gibson Assembly 方法采用三轮组装的方法成功合成了 16.3 kb 的小鼠线粒体基因. Jiang 等^[5]利用 Gibson Assembly 方法开发了一步法构建植物干涉载体的技术: 从植物基因组中扩增出目标片段, 一步法形成反向互补的发夹结构, 并同时连接入干涉载体中.

本研究应用 Gibson Assembly 方法构建了 1 个水稻转录因子基因 *Os05g0144300* 的全长及其 4 个缺失突变植物转化载体. 另外, 将从不同来源得到的启动子 P_{Nos}、目的基因 *ATP5-N* 和 *orfH79* 及终止子 T_{Nos} 这 4 个表达元件, 一步法构建了水稻红莲型细胞质雄性不育基因 *orfH79* 表达载体. 本研究可为 Gibson Assembly 方法应用于植物表达载体的构建提供借鉴.

1 材料与方 法

1.1 试验材料

植物材料: 水稻‘中花 11’和红莲型不育系‘粤泰 A’, 哥伦比亚型拟南芥. 载体和菌株: pER8 载体, pCAMBIA1300 载体, 大肠埃希菌 DH10B 均为华南农业大学遗传工程实验室保存.

1.2 Gibson Assembly 方法反应体系

反应体系根据 Gibson Assembly 方法^[6]和 Jiang 等^[5]改良方法配制. $2 \times$ IR Buffer (Enzyme-reagent mix): 320 μ L $5 \times$ IR Buffer, 0.3 μ L T5 exonuclease (10 U/ μ L) (Epicentre), 20 μ L Phusion polymerase (2 U/ μ L) (NEB), 160 μ L *Taq* ligase (40 U/ μ L)

(NEB), 加 ddH₂O 至 0.8 mL, 分装为 5 μ L 的等份, -20 $^{\circ}$ C 条件下储存.

1.3 *Os05g0144300* 基因全长及缺失突变载体载体的构建

Os05g0144300 基因全长及缺失突变载体构建引物见表 1. 分别以水稻‘中花 11’叶片抽提的基因组 DNA 和 cDNA 为模板 PCR 扩增 *Os05g0144300* 基因的启动子和目的基因 cDNA 片段. PCR 反应体系为: 50 μ L 反应体系中加入 $2 \times$ PCR Buffer for KOD FX 25 μ L, 2 mmol/L dNTPs 10 μ L, 100 μ mol/L Primer F 0.15 μ L, 100 μ mol/L Primer R 0.15 μ L, KOD FX 1 μ L, 模板 1 μ L, 灭菌去离子水 12.7 μ L. PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 30 个循环; 68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. PCR 产物电泳检测, 采用回收试剂盒 (TaKaRa 公司) 进行纯化回收后, 加入 10% 体积的 3 mol/L NaAc 和 2.5 倍体积的无水乙醇, -80 $^{\circ}$ C 放置 3 h, 10 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心沉淀, 0.3 mol/L 的 TE 溶解 PCR 产物, 并置于 -20 $^{\circ}$ C 条件下保存.

启动子扩增的上下游引物为 P-*EcoR* I F 和 P-*EcoR* I R. 目的基因 1~1 128 氨基酸 (aa) 片段上下游引物为 CDS-F、1 128 aaR, 1~730 aa 片段的上下游引物为 CDS-F、730 aaR, 1~869 aa 片段的上下游引物为 CDS-F、869 aaR, 1~443 aa 片段的上下游引物为 CDS-F、440 aaR, 731~1 128 aa 片段的上下游引物为 731~1 128 aaF、1 128 aaR, 1~741 aa 片段的上下游引物为 CDS-F、741 aaR, 870~1 128 aa 片段的上下游引物为 870~1 128 aaF、1 128 aaR.

用 *EcoR* I 酶切质粒 pCAMBIA1300, 酶切 50 μ L 反应体系: 5 μ L Buffer、12.5 μ L 质粒、0.5 μ L 内切酶、32 μ L ddH₂O, 37 $^{\circ}$ C 酶切 1.5 h 后终止反应. 酶切产物凝胶回收, 纯化, 再乙醇沉淀纯化. Gibson Assembly 连接体系为 10 μ L: 载体 3 μ L, 克隆片段 1 μ L, 混合酶 6 μ L, 50 $^{\circ}$ C 反应 20 min. 连接产物电击转化 DH10B, 用质粒抽提试剂盒 (TaKaRa 公司) 抽取阳性克隆质粒 DNA 进行 *EcoR* I 酶切鉴定, 并送上海美吉公司进行测序, 测序正确后命名为 PCP.

用 *Sal* I 对 PCP 质粒进行酶切, 线性化后的载体与 1~1 128 aa 片段、1~730 aa 片段、1~869 aa 片段用 Gibson Assembly 方法分别连接 (方法同上). 成功连接后质粒分别命名为 PCP-1、PCP-2、PCP-3. 线性化后的载体与 1~443 aa 片段、731~1 128 aa 片段混合连接, 成功连接后质粒命名为 PCP-4. 线性化后的载体与 1~741 aa、870~1 128 aa 混合连接, 成功连接后的质粒命名为 PCP-5.

表 1 *Os05g0144300* 基因全长及缺失突变载体引物Tab. 1 Primers for a vector construction of the full-length and truncated *Os05g0144300* gene

引物名称	引物序列 ¹⁾
P- <i>EcoR</i> I F	5'-acagctatgaccatgattacGAATCCATGTCAATAGAATATAATTC-3'
P- <i>EcoR</i> I R	5'-gatccccgggtaccgagctcGAATCCCGCCTCCCTAGGGTTTCGCTC-3'
CDS-F	5'-taccgggggagctcctctagaGTCGACATGGCTGCCTCGGTGGAG-3'
1128 aa R	5'-ccaagcttgcagctcgcagGTCGACTTAGAATGCCGAGCGCCCTTTTGAATC-3'
730 aa R	5'-ccaagcttgcagctcgcagGTCGACTTAGAATAGATAGGGATGATTGC-3'
869 aa R	5'-ccaagcttgcagctcgcagGTCGACTTAGAATACACGCACTTCATTC-3'
443 aa R	5'-TGGTCTTAACTCCCCACCTTC-3'
731 ~ 1128 aa F	5'-gaaggtggggagtgtaagaccaGTTGAGCATTATAACATGTATC-3'
741 aa R	5'-TTCCTGCCGTTGATACATG-3'
870 ~ 1128 aa F	5'-acatgtatcaacggcaggaaGTTCTTGTAGTGTGGCTC-3'

1) 引物序列中小写字母碱基为引物的互补重叠序列。

1.4 *orfH79* 表达载体的构建

orfH79 表达元件组装相关引物见表 2。以 pER8 载体质粒为模板,PNos-F、PNos-R 为引物扩增 PNos, TNos-F、TNos-R 为引物扩增 TNos^[7]。以水稻红莲型‘粤泰 A’叶片的 cDNA 为模板,*orfH79*-F、*orfH79*-R 为引物扩增 *orfH79* (GeneBank accession NO. AB254027.1)^[8]。以拟南芥叶片的 cDNA 为模板,

ATP5N-F、ATP5N-R 为引物扩增 *ATP5* 的线粒体定位信号肽序列 *ATP5*-N (At5g13450)^[9]。

PNos、*ATP5*-N、*orfH79* 和 TNos 这 4 个片段用 Gibson Assembly 方法进行一次性连接,连接体系和连接条件同上。连接产物连接到 T 载体 pMD[®] 18-T (TaKaRa 公司)转化大肠埃希菌,以阳性克隆质粒为模板,扩增 *orfH79* 各表达元件进行 PCR 验证并测序。

表 2 *orfH79* 表达元件扩增引物Tab. 2 Primers for a vector construction of *orfH79*

引物名称	引物序列 ¹⁾
PNos-F	5'-ctaaaatccagatccccccaattaAAGGCGGGAAACGACAATCT-3'
PNos-R	5'-TCTAGGGGATCCGGTGCAGA-3'
ATP5N-F	5'-cagattgtcgtttccgccttATGGCTAATCGTTTCAGATCAG-3'
ATP5N-R	5'-aaacaaatgctagttgcatTTGATCACAAGCATCCCTAATAG-3'
<i>orfH79</i> -F	5'-ATGACAACTAGCATTTGTTTTTTC-3'
<i>orfH79</i> -R	5'-GAGCTCGTAATGAATTGGATTC-3'
TNos-F	5'-atccaattcattacgagctcATCGTTCAAACATTTGGCAAT-3'
TNos-R	5'-aggtagegaaccgcgcatTTCTGTCGAGGGGGATCAATTCC-3'

1) 小写字母为引物的互补重叠序列。

2 结果与分析

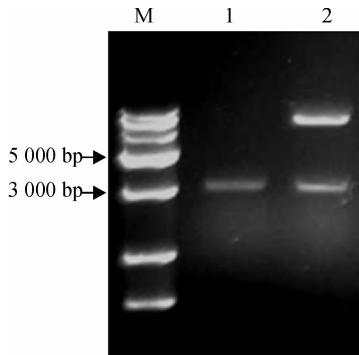
2.1 *Os05g0144300* 基因的全长和缺失突变载体的构建

为了研究水稻转录因子 *Os05g0144300* 基因的功能,利用 PCR 从水稻‘中花 11’的基因组 DNA 扩增出该基因编码区上游的启动子约 3 000 bp,同时用 *EcoR* I 酶切线性化 pCambia1300 载体,采用 Gibson Assembly 方法将二者连接。成功连接的载体命名为 PCP,*EcoR* I 酶切验证结果显示插入片段与目标分子大小一致(图 1)。

根据 *Os05g0144300* 蛋白质功能域预测结果,设计 *Os05g0144300* 基因全长和缺失突变表达载体(图 2)。

从水稻‘中花 11’cDNA 扩增出 *Os05g0144300* 基因全长 1 ~ 1 128 aa 片段 3 384 bp、1 ~ 730 aa 片段 2 100 bp、1 ~ 869 aa 片段 2 607 bp、1 ~ 443 aa 片段 1 329 bp、731 ~ 1 128 aa 片段 1 194 bp、1 ~ 741 aa 片段 2 223 bp、870 ~ 1 128 aa 片段 777 bp。用 *Sal* I 酶切线性化 PCP 质粒,将线性化的载体分别与 1 ~ 1 128 aa 片段、1 ~ 730 aa 片段、1 ~ 869 aa 片段连接,线性化的载体与 1 ~ 443 aa 片段、731 ~ 1 128 aa 片段混合连接,线性化的载体与 1 ~ 741 aa 片段、870 ~ 1 128

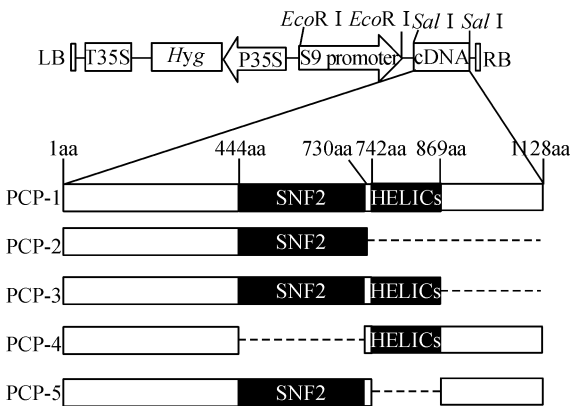
aa 片段混合连接,连接均采用 Gibson Assembly 方法进行. 获得的 5 个重组质粒 PCP-1、PCP-2、PCP-3、PCP-4、PCP-5 经限制性内切酶 *Sal* I 酶切鉴定,结果显示其大小一致(图 3).



M: DNA marker DL15000; 1: *Os05g0144300* 基因启动子片段的扩增; 2: PCP 质粒酶切.

图 1 PCP 载体限制性内切酶 *EcoR* I 酶切检测结果

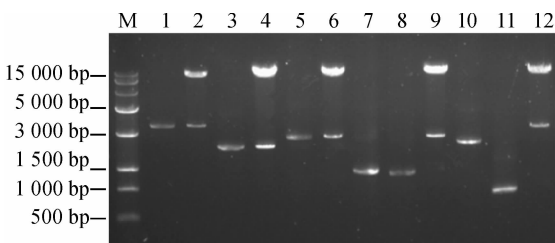
Fig. 1 Electrophoresis results of PCP plasmid digested by *EcoR* I restriction enzyme



S9 promoter 代表 *Os05g0144300* 基因启动子; --- 表示基因的缺失部分; SNF2 和 HELICs 是其编码蛋白的功能保守域.

图 2 *Os05g0144300* 基因全长结构和缺失突变载体示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the construction of full-length and truncated rice gene *Os05g0144300* expression vectors



M: DNA marker DL15000; 1: 1 ~ 1 128 aa; 2: PCP-1 酶切; 3: 1 ~ 730 aa; 4: PCP-2 酶切; 5: 1 ~ 869 aa; 6: PCP-3 酶切; 7: 1 ~ 443 aa; 8: 731 ~ 1 128 aa; 9: PCP-4 酶切; 10: 1 ~ 741 aa; 11: 870 ~ 1 128 aa; 12: PCP-5 酶切.

图 3 *Os05g0144300* 基因全长和缺失突变载体限制性内切酶 *Sal* I 酶切检测结果

Fig. 3 Electrophoresis results of plasmids of the full-length and truncated rice gene *Os05g0144300* expression vectors digested by *Sal* I restriction enzyme

2.2 *orfH79* 表达元件载体的构建

利用 PCR 从 pER8 载体扩增出 PNos 片段 333 bp、TNos 片段 275 bp, 从拟南芥的 cDNA 扩增出 *ATP5* 基因 N 端序列 354 bp, 从水稻红莲型不育系 ‘粤泰 A’ 的 cDNA 扩增出 *orfH79* 基因 598 bp. PNos、*ATP5*-N、*orfH79*、TNos 这 4 个片段, 用 Gibson Assembly 方法进行连接. 鉴于多个 DNA 片段一次性连接到载体的方法虽然可以得到阳性克隆, 但效率较低. 我们对以上 4 个 DNA 片段利用 Gibson Assembly 方法进行连接后, 取部分连接产物先进行一次 PCR 扩增, 扩增产物命名为 PAHT (约 1 600 bp), 再将 PAHT 连接到 TA 载体或植物表达载体上转化大肠埃希菌 (图 4). 这种改良可以大大提高阳性克隆比率. 挑取 12 个单菌落进行菌落 PCR 鉴定, 结果显示全部为阳性克隆. 以阳性克隆质粒为模板, 从中扩出 *orfH79* 各个表达元件以及 PAHT, 片段大小与预期相符 (图 5).

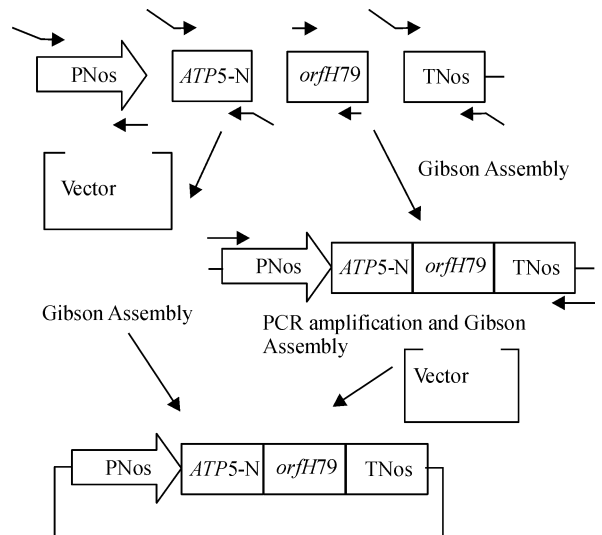
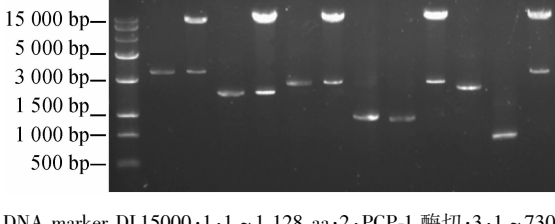


图 4 *orfH79* 表达元件载体构建示意图

Fig. 4 Schematic diagram of the construction of *orfH79* expression vector



M: DNA marker DL2000; 1: PNos; 2: *ATP5*-N; 3: *orfH79*; 4: TNos; 5: PAHT.

图 5 *orfH79* 表达元件载体各片段和组装的完整表达框的 PCR 检测

Fig. 5 Detections of assembling fragments of the *orfH79* expression vector by PCR

3 讨论

传统的载体构建基于酶切连接重组的经典克隆方法,但是该方法在针对一些较长片段或多个 DNA 序列时,载体可供选择的限制性酶切位点往往受到限制^[10]. 采用 Gibson Assembly 方法仅需要对载体进行单酶切线性化,利用互补 DNA 序列可实现多段 DNA 序列的无缝连接,不需要依赖特定的酶切位点. 本方法与传统酶切连接方法相比有以下优点:①传统酶切连接方法需要较长的连接反应时间,而本方法只需温浴 20~30 min 后即可转化;②传统酶切连接方法每次只能连接 1 个插入片段,多个片段的组装需要逐次进行限制性内切酶酶切连接反应,随着连接片段数目的增多,载体的多克隆位点将无法满足插入片段的要求. 而本方法只需对载体进行一种限制性内切酶酶切,获得线性化载体,而插入片段不需要进行酶切产生相同的黏性末端,即对多克隆位点的要求很低;③减少了试验操作步骤,由于插入片段的连接依赖于互补片段,而不是限制性内切酶酶切位点的黏性末端,减少了插入片段的酶切纯化等步骤;④该方法的高效性还体现在对多个不同目的片段的克隆上:当需要用同一个载体对多个基因进行克隆时,仅需要在合成引物时在特异引物的末端加上载体线性化位点两侧的序列,而不需要分析目的片段的限制性内切酶酶切位点等信息,即可以工厂化进行多个载体的构建;另外,在实际的 Gibson Assembly 方法应用中,一次反应连接多个 DNA 片段时可能会出现效率下降,阳性克隆少的问题,我们对其进行改良,对多片段的连接产物进行 1 次 PCR 扩增后再连接到载体,大大提高了阳性克隆率.

应用 Gibson Assembly 方法,克隆片段的长度可以是几百碱基,也可以达到 900 kb^[3],甚至可以用于人工合成细菌的全基因组^[11-12]. Gibson Assembly 方法已经应用于动物^[4]、酵母基因组的克隆^[2, 13-14]. 本研究应用该方法成功构建了 *Os05g0144300* 基因全长及缺失突变植物转化载体和水稻红莲型不育系‘粤泰 A’细胞质雄性不育基因 *orfH79* 表达元件载体,为同类植物表达载体的快速构建提供了方法借鉴.

参考文献:

[1] SMITH H O, WILCOX K W. A restriction enzyme from

Hemophilus influenzae: I: Purification and general properties [J]. J Mol Biol, 1970, 51(2): 379-391.

- [2] GIBSON D G. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(20): 6984-6990.
- [3] GIBSON D G, YOUNG L, CHUANG R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases [J]. Nat Methods, 2009, 6(5): 343-345.
- [4] GIBSON D G, SMITH H O, HUTCHISON C R, et al. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome [J]. Nat Methods, 2010, 7(11): 901-903.
- [5] JIANG Yanxiang, XIE Min, ZHU Qinlong, et al. One-step cloning of intron-containing hairpin RNA constructs for RNA interference via isothermal *in vitro* recombination system [J]. Planta, 2013, 238(2): 325-330.
- [6] GIBSON D G. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments [J]. Methods Enzymol, 2011(498): 349-361.
- [7] SOLAIMAN D K, SOMKUTI G A. Shuttle vectors developed from *Streptococcus thermophilus* native plasmid [J]. Plasmid, 1993, 30(1): 67-78.
- [8] ZHANG Hong, LI Shaoping, YI Ping, et al. A Honglian CMS line of rice displays aberrant F0 of F0F1-ATPase [J]. Plant Cell Rep, 2007, 26(7): 1065-1071.
- [9] ROBISON M M, LING X, SMID M P, et al. Antisense expression of mitochondrial ATP synthase subunits OSCP (ATP5) and gamma (ATP3) alters leaf morphology, metabolism and gene expression in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Physiol, 2009, 50(10): 1840-1850.
- [10] 张亚旭. DNA 重组技术的研究综述 [J]. 生物技术进展, 2012, 2(1): 57-63.
- [11] GIBSON D G, BENDERS G A, Andrews-Pfannkoch C, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome [J]. Science, 2008, 319(5867): 1215-1220.
- [12] GIBSON D G, GLASS J I, LARTIGUE C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome [J]. Science, 2010, 329(5987): 52-56.
- [13] GIBSON D G. Gene and genome construction in yeast [J]. Curr Protoc Mol Biol, 2011, 3(22): 1-17.
- [14] GIBSON D G. Oligonucleotide assembly in yeast to produce synthetic DNA fragments [J]. Methods Mol Biol, 2012 (852): 11-21.

【责任编辑 李晓卉】