

外源DNA片段克隆方法

基因工程技术两个最基本的特点是分子水平上的操作和细胞水平上的表达，而分子水平上的操作即是体外重组的过程，实际上是利用工具酶对 DNA 分子进行“外科手术”。DNA 克隆涉及一系列的分子生物学技术，如目的 DNA 片段的获得、载体的选择、各种工具酶的选择、体外重组、导入宿主细胞技术和重组子筛选技术等等。本文主要介绍基因克隆分子水平上的外源 DNA 片段的获得。

1.通过已知序列克隆目的基因

基因克隆是指在体外将含有目的基因或其他有意义的 DNA 片段同能够自我复制的载体 DNA 连接，然后将其转入宿主细胞或受体生物进行表达或进一步研究的分子操作过程，因此 DNA 克隆又称分子克隆，基因操作或重组 DNA 技术。基因克隆也可简单概括为“切”、“连”、“转”、“选”几个字。“切”是指用序列特异的限制性内切酶切开载体 DNA，或者切出目的基因；“连”是指用 DNA 连接酶将目的 DNA 同载体 DNA 连接起来，形成重组的 DNA 分子；“转”是指通过特殊的方法将重组的 DNA 分子送入宿主细胞中进行复制和扩增；“选”则是从宿主群体中挑选出携带有重组 DNA 分子的个体。

（1）以氨基酸序列为基础的功能克隆法

已知结构蛋白的 N 端部分氨基酸序列时，就可以依此设计特异性引物，从总 RNA 中通过 RT-PCR 获取该结构蛋白的编码基因。首先获得总 RNA，用 Oligo (dT) 18 为引物通过逆转录酶催化合成 cDNA 第一链，接着以 NH₂ 端部分反推的简并引物为正向引物，由于引物编码某一氨基酸的密码子不止一种，故必须设计包含所有可能编码的核苷酸序列在内的引物群即简并引物，其中恰好只有一种引物与模板严格互补。

依据部分氨基酸序列设计简并引物时应注意以下几点：

- ①尽量选择简并度低的氨基酸序列区域为引物设计区；
- ②充分注意物种对于密码子的偏爱性，选择该物种使用频率高的密码子，以降低引物的简并性；
- ③引物不要终止于简并碱基，对于大多数氨基酸残基来说，意味着引物 3'末端不要位于密码子的第三位；
- ④在简并度高的位置，可用次黄嘌呤代替简并碱基。
- ⑤如果序列的相关信息较多，可以进一步在内侧设计一对引物，以第一次 PCR 产物为模板进行第二次 PCR，即巢式 PCR，以提高扩增的特异性。

（2）对已知序列的基因克隆

这是基因克隆方法中最为简便的一种。基因序列有时可以直接从文献中查到，文献中一般提供该基因在基因文库中的注册号，也可先通过数据库例如 GenBank（<http://www.ncbi.nlm.gov>）、欧洲分子生物学实验室的基因库（<http://www.ebi.ac.uk/ebi-home.html>）查询一下该基因或相关基因是否已经在基因库中注册。将感兴趣的基因序列从库中下载下来，根据整个基因序列设计特异引物，通过 PCR 从基因组织扩增该基因，也可以通过 RT-PCR 方法扩增该基因的全长 cDNA 序列。

2.通过基因文库获得目的基因

（1）cDNA 文库的构建

（2）筛选法获得目的基因

把基因文库转移到尼龙膜或硝酸纤维滤膜之后，就可以同特异性的核酸探针进行菌落或噬菌斑杂交，以便筛选出具有目的基因的阳性克隆。筛选文库的主要方法有两种：一是核酸杂交筛选法，依据基因部分序列合成寡核苷酸探针或用 PCR 扩增片段制备的探针从 cDNA 文库

中筛选编码基因；二是利用已知基因编码的蛋白制成相应抗体探针，从表达载体构建的 cDNA 文库中筛选相应的克隆。

3.其他克隆目的基因的方法

（1）图位克隆法

其基本原理是：功能基因在基因组中都有相对稳定的基因座，利用分子标记将目的基因精确定位在染色体的特定位置之上，然后用目标基因两侧紧密连锁的分子标记筛选含有大插入片段的基因组文库，构建起目的基因区域的物理图谱，再利用物理图谱通过染色体步移技术逐渐逼近目的基因，最终找到包含有目的基因的克隆。

（2）转座子标签法

以突变体为基础的基因克隆方法主要有转座子标签法和 T-DNA 标签法。转座子标签法是把转座子作为基因定位的标记和通过转座子在染色体上的插入和嵌合来克隆基因。转座子标签技术是利用转座子作探针克隆出突变基因，再用突变基因作探针，从野生型个体中分离并克隆出野生型基因，最终得到完整的基因。转座子标签技术是研究功能基因的有效工具之一。转座子标签法不但可以通过上述转座突变分离基因，而且当转座子作为外源基因通过农杆菌介导等方法导入植物时，还会由于 T-DNA 整合到染色体中引起插入突变，并进行分离基因，因此大大提高了分离基因的效率。

利用转座子克隆基因的步骤主要由以下几个方面：①把已分离得到的转座子与选择标记构建成含有转座子的质粒载体；把转座子导入目标植物；利用 Southern 杂交等技术检测转座子是否从载体质粒中转座到目标植物基因组中；④转座子插入突变的筛选和鉴定；⑤利用反向 PCR 或 Tail-PCR 获得转座子两侧的序列；⑥以侧翼序列为探针从 cDNA 文库或基因组文库中筛选目的基因。

（3）T-DNA 插入法

与转座子标签法原理相似，不作详细介绍。

（4）差异显示 PCR

所有真核生物的成熟 mRNA 都含有不同长度的 poly(A)尾部序列，根据 poly(A)内部的 2 个核苷酸排列的不同,可以将所有的 mRNA 分子分为 12 类（见图 1）。根据这 12 种 mRNA 序列可合成 12 种相应的反转录引物，即 M'N'TTTTTTTT.....，用其分别进行反转录，即可将所有 mRNA 分类合成 12 种 cDNA(于 12 个试管内)，然后再用随机引物，以这 12 种 cDNA 分别做模板进行 PCR 扩增，那么与表型相关的 mRNA 就很容易被发现并克隆出来。但不论 AP-PCR 还是 DD-PCR，都适用于 2 种种源近似生物或不同发育阶段的同一个体之间的比较。因而，其 PCR 的模板必须是来自 2 个生物或同一生物不同发育阶段的 mRNA。DD-PCR 的优点是快速、方便，可以检测表达量极低的 mRNA，但其技术条件要求较高，所扩增的 mRNA 的质量不能有差异，即 mRNA 不应降解。

通过以上几种方法获得目的基因以后，主要还是采用酶切连接，无缝克隆连接，TA-克隆的方法对已获得的目的基因和需要连接的载体在合适的条件下进行连接，再将其基因片段和载体的连接产物通过化转或电转等其他方式转入到感受态细胞中，培养至菌落长出进行筛选，挑出阳性克隆，PCR 验证以后送至测序公司测序，便可获得含有正确的目的基因序列的质粒。

4.利用同源重组的克隆方法

（1）TA-克隆：TA-克隆方法（Original TA Cloning Kit）即利用 Taq 聚合酶同时具有的末端连接酶的功能，在每条 PCR 扩增产物的 3'端自动添加一个 3'-A 突出端。利用 TaKaRa 的 T 载体，直接高效地连接 PCR 产物。所以 TA 克隆不需使用含限制酶序列的引物，不需将 PCR 产物进行优化，不需把 PCR 产物做平端处理，不需在 PCR 扩增产物上加接头，即可直接进行克隆。

（2）无缝克隆：无需考虑插入片段有没有酶切位点可用，也不用考虑载体上是否有合适的酶切位点将载体线性化。它可以向几乎任何载体的任何位点进行定向克隆，不需要连接酶，主要用到的是重组酶-无缝克隆试剂盒。

无缝克隆原理：载体末端和扩增的基因 DNA 片段末端有 15 个同源碱基序列完成无缝克隆的连接。

- ❖ 15 bp 同源序列的选择应尽量避免高 GC 含量区域，因为高 GC 含量区域易形成复杂的二级结构或在载体与目的片段退火时形成错误的配对。
 - ❖ 设计目的基因片段扩增引物的 5' 末端必须包含与载体末端相同的 15 个碱基序列，引物的 3' 末端必须包含与目的基因片段相互补的特异碱基序列。
 - ❖ 可通过两种方法对载体进行线性化
 - ① PCR 扩增对载体线性化：用 PCR 扩增对载体线性化后，一定要用 DpnI 将质粒模板消化掉。因为模板质粒一般为超螺旋状态，无缝克隆组装后质粒为带四个缺口的开环质粒，而超螺旋质粒的转化效率比开环质粒的转化效率要高几十到上百倍。只要有极少量的模板质粒存在都会影响无缝克隆实验的转化结果。（推荐使用高保真聚合酶进行载体扩增）以减少扩增突变的引入。
 - ② 酶切对载体线性化：采用酶切对载体线性化时，尽量选用切割效率较高的酶，酶切时间尽量在 4 h 以上。因为切割不彻底时，未被切割的超螺旋质粒同样会影响无缝克隆中开环质粒的转化。
- 载体克隆位点选择：① 尽量选择无重复序列，且 GC 含量比较均匀的区域进行克隆。当克隆位点上下游 20 bp 区域内 GC 含量均在 40%~60% 范围之内时，克隆效率将达到最大。

②不要选择带有重复序列，或高 GC、高 AT 区域的区域进行克隆。

❖ 利用无缝克隆试剂盒可以通过 PCR 仪完成基因片段和载体的连接。

反应程序如下：

a. 25 °C，30 min，3'-5'核酸外切酶切割出约 15 bp 粘性末端，SSB 结合单链 DNA；

b. 60 °C，15 min，3'-5'核酸外切酶失活，SSB 脱离单链 DNA；

c. 0~4°C，∞，同源黏性末端退火。

*目前有新产品的试剂盒，可以直接将目的基因和线性化的载体片段按一定比例混加入 buffer 和酶，置于 30°C，30min，便可进行连接，再进一步转化连接产物，方便快捷。

*注意事项：反应结束后，最好立即将样品转移至冰上，并立即进行转化。如不能立即转化，要将样品放于-20 °C保存（无缝克隆组装的质粒为不稳定的四缺口开环质粒，在室温或高温条件下会降低组装质粒的数量，从而影响转化效率）。

。

The end



• 一站式蛋白抗体发现服务

重组蛋白 · 抗体 · 噬菌体文库 · 诊断原料

—— 武汉国家生物产业基地 · 光谷抗体发现与筛选公共服务平台 ——

科学探索的世界充满挑战，AtaGenix致敬每一位拓荒者，
更致力于成为始终值得您信赖的科研合作伙伴！