菌落PCR技术在重组质粒筛选与鉴定中的应用*

李 华, 刘延琳, 夏 惠, 张振文
(西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 应用以菌落为模板的聚合酶链反应(PCR)技术, 筛选插有酒类酒球菌苹果酸-乳酸酶基因*mleA*和苹果酸通透酶基因*mleP*序列的重组阳性克隆, 筛选到的阳性克隆分别扩增到约1 600 bp及900 bp的条带, 且与两个目的基因片段大小一致。提取阳性克隆的质粒进一步进行双酶切(*Eco*RⅠ-*Kpn*Ⅰ)及质粒PCR鉴定, 证明结果正确。菌落PCR技术的应用使重组质粒的筛选和鉴定得以优化和简化。

[关键词] 菌落PCR; 重组质粒; 苹果酸-乳酸酶基因; 苹果酸通透酶基因
[中图分类号] Q785 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2004)09-0035-03

苹果酸-乳酸发酵在葡萄酒、果酒的生物降酸过程中具有非常重要的作用。苹果酸-乳酸酶和苹果酸通透酶是酒类酒球菌(*Oenococcus oeni*)进行苹果酸-乳酸发酵(Malolactic Fermentation, MLF)的关键酶, 苹果酸-乳酸酶由苹果酸-乳酸酶基因(*mleA*)编码[1], 是降解L-苹果酸为L-乳酸的功能酶; 苹果酸通透酶由苹果酸通透酶基因(*mleP*)编码, 是苹果酸的转运蛋白[1,2]。研究*mleA*和*mleP*基因在酿酒酵母中的表达, 首先要进行*mleA*和*mleP*基因的体外克隆。在重组子的筛选过程中一般采用抗生素筛选、a-互补(蓝白筛选)、质粒快速抽提、质粒碱提、酶切等一系列工作程序。质粒碱提及酶切是这一程序的核心, 也最为繁琐费时, 使得筛选的量受到很大限制, 因而筛选效率不高。针对上述情况, 本研究采用菌落PCR方法进行重组子克隆的筛选和鉴定, 以期简化操作程序, 提高筛选效率。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

E. coli DH5α和质粒YEp352 (Amp^R, URA, Yeast-*E. coli*穿梭载体)来自中国科学院微生物研究所酵母菌分子遗传育种组。

1.2 酶与试剂

溶菌酶和RNase, *Taq*酶购自华美生物工程公司; 蛋白酶K购自上海生工公司; dNTPs(Bebco); T_4DNA ligase, 限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa); 氨苄青霉素(Amp)、IPTG和X-gal购自北京鼎国生物技术发展中心。

1.3 培养基

LB培养基[3]用于*E. coli* DH5α的保存和培养, 加入氨苄青霉素(Amp)、IPTG和X-gal的LB培养基用于筛选重组转化子[3]。

1.4 菌落PCR反应物的制备

将用Pfu酶扩增的*mleA*与*mleP*基因的PCR产物片段(分别约为1 600和900 bp)用*Eco*RⅠ和*Kpn*Ⅰ双酶切, 然后与经同样双酶切的载体YEp352进行连接, 连接产物转化大肠杆菌DH5α感受态细胞, 并涂布于含氨苄青霉素(50 μg/mL)的LB培养基上, 37 ℃培养12~16 h, 待菌落长出后, 用灭菌牙签挑取白斑, 先在预先分格并标记数字的另一平皿上点板, 然后在PCR小管中用20 μL PCR反应混合液(PCR反应缓冲液、dNTP、引物、Taq DNA聚合酶、ddH_2O)轻洗后进行反应。反应亦可用1 μL菌液进行。

1.5 菌落PCR扩增

用*Taq*酶进行。菌落PCR引物依据已发表的*mleA*和*mleP*基因的序列设计[2]。引物由上海生工公司合成。*mleA*和*mleP*基因的PCR引物分别为P_1/P_2和P_3/P_4。

P_1: 5′CGGAATTCATGACAGATCCAGTAAGTAT-3′

P_2: 5′TAGGTACCACACTCTCAACACTCGTAAT-3′

* [收稿日期] 2003-08-13
[基金项目] 2003年西北农林科技大学专项基金资助项目
[作者简介] 李 华(1959-), 男, 重庆梁平人, 教授, 博士生导师, 主要从事葡萄与葡萄酒研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

P3: 5′-GCGAATTCATGAATGCTTTTATTACGAGT-3′

P4: 5′-TCGGTACCATTAGACAAACTGCATCAAG-3′

下画线的核苷酸为引入*Eco*R Ⅰ和*Kpn* Ⅰ酶切位点。

PCR 反应条件: 94 ℃变性5 min, 循环1 次。然后进行29 个循环, 其中94 ℃变性40 s; 56 ℃退火2 min; 72 ℃延伸3 min, 最后72 ℃延伸15 min。

1.6 质粒提取及酶切鉴定

挑取PCR 鉴定为阳性的克隆少许, 接种于2 mL 含氨苄青霉素的LB 培养基(LA)中, 37 ℃ 225 r/min培养过夜。用碱裂解法提取质粒DNA, 并经*Eco*R Ⅰ-*Kpn* Ⅰ双酶切鉴定。

1.7 DNA 操作技术

DNA 操作技术参见文献[3~5]。

2 结果与分析

2.1 PCR 法筛选阳性克隆

以菌落上的少许菌体直接作为模板进行PCR 扩增。对于*mleA* 基因克隆的筛选, 经电泳分析发现, 在筛选的20 个菌落中有17 个可见到约1 600 bp 的阳性条带(图1), 与*mleA* 基因片段大小一致, 因此推测这17 个克隆即为含有*mleA* 基因插入片段的阳性克隆。对于*mleP* 基因克隆的筛选, 经电泳分析发现, 在筛选的20 个菌落中有6 个可见到900 bp 的阳性条带(图2), 与*mleP* 基因片段大小一致, 因此推测这6 个克隆即为含有*mleP* 基因插入片段的阳性克隆。

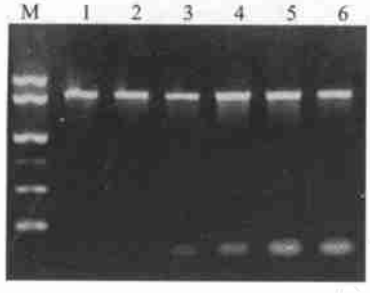

图1 *mleA* 基因的菌落PCR

M. DGL2000 Marker; 1~6. 阳性克隆

Fig. 1 Colony PCR of *mleA*

M. DGL2000 Marker: 1~6. Positive clone

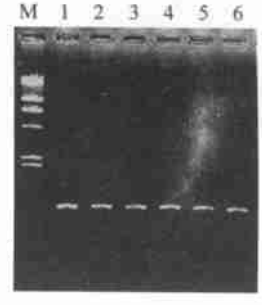

图2 *mleP* 基因的菌落PCR

M. λDNA/*Hind* Ⅲ Marker; 1~6. 阳性克隆

Fig. 2 Colony PCR of *mleP*

M. λDNA/*Hind* Ⅲ Marker: 1~6. Positive clone

2.2 阳性克隆质粒的酶切鉴定

为了进一步验证菌落PCR 结果的正确性, 对获得的阳性克隆分别选取3 个进行质粒DNA 提取, 并进行双酶切鉴定。结果3 个质粒均可见到1 600 和900 bp 的片段(图3)。故这些克隆均为已插入目的基因的阳性克隆。插入*mleA* 和*mleP* 基因的重组质粒暂命名为pmleA 和pmleP。

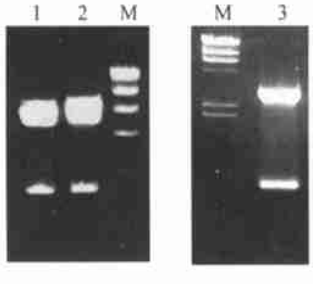

图3 转化子的双酶切

1~2. pmleA/*Eco*R Ⅰ+*Kpn* Ⅰ; 3. pmleP/*Eco*R Ⅰ+*Kpn* Ⅰ;
M. λDNA/*Hind* Ⅲ Marker

Fig. 3 Digested with *Eco*R Ⅰ and *Kpn* Ⅰ

1~2. pmleA/*Eco*R Ⅰ+*Kpn* Ⅰ; 3. pmleP/*Eco*R Ⅰ+*Kpn* Ⅰ;
M. λDNA/*Hind* Ⅲ Marker

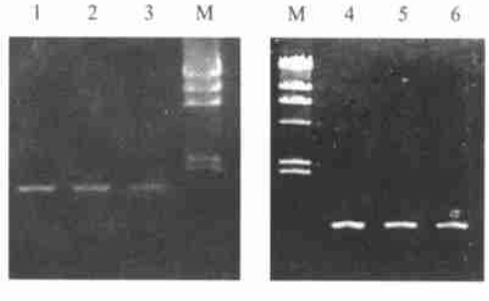

图4 两个重组质粒的PCR 验证

M. λDNA/*Hind* Ⅲ Marker; 1~3. pmleA 的PCR 产物;
4~6. pmleP 的PCR 产物

Fig. 4 Identified with PCR amplification of the two recombined plasmids

M. λDNA/*Hind* Ⅲ Marker: 1~3. PCR product of pmleA;
4~6. PCR product of pmleP

2.3 质粒PCR 验证

以所提取的阳性克隆的质粒pmleA 和pmleP 为模板, 分别进行以P_1/P_2 及P_3/P_4 为引物的PCR 扩增, 结果也分别得到了1 600 及900 bp 的片段(图

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

4)。进一步证明通过以上程序筛选的结果可靠。

3　讨　论

通常重组克隆筛选中较繁琐的步骤是质粒提取。提取质粒后必须经过酶切以判断是否有外源片段插入。Sathe 等[6]将含有重组质粒的细菌经过94 ℃变性1 min 后,用倒置显微镜观察发现大部分细胞破裂,释放出其DNA,因此可将细菌直接作为PCR 反应的模板。本研究利用菌落PCR 技术进行重组子克隆的筛选和鉴定,从菌落PCR 得到的结果,可以直接确认有外源目的片段插入的克隆,避免了用大量提取质粒及酶切验证来筛选重组质粒的繁琐过程,大大减轻了工作量,缩短了实验周期。

一般进行菌落PCR 时,先用Triton-X100 处理,效果较好[7,8]。本研究在用菌落PCR 技术鉴定*mleA* 和*mleP* 基因的重组克隆时,将反应过程中的预变性时间延长为5 min,使得细菌能够充分破裂,DNA 大量释放并充分变性,获得了理想的结果。这种方法直接以菌落为模板,不需要进行特殊处理,并且适合于各种载体。

从菌落PCR 反应筛选得到的重组子克隆中,挑出3～5 个菌落进行质粒提取及酶切鉴定,结果表明该菌落PCR 的结果完全正确。本研究结果表明,菌落PCR 是一种进行重组子筛选的简便、快速、可靠、有效的方法。在筛选工作量比较大的情况下,研究认为合理的筛选程序是:抗生素筛选和(或)蓝白筛选→质粒快速提取筛选→菌落PCR 筛选→质粒碱提→酶切验证→质粒PCR 验证→确认得到阳性克隆。

[参考文献]

[1] 李　华. 现代葡萄酒工艺学[M]. 第2版. 西安: 陕西人民出版社, 2000.

[2] Labarre C, Guzzo J, Cavin J F, et al. Cloning and characterization of the genes encoding malolactic enzyme and the malate permease of *Leuconostoc oenos*[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(4): 1274-1282.

[3] [美]Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 等. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1998. 924-936.

[4] 姜　泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000. 191-194.

[5] [美]Ausubel F M, Kingston R E, Seidman J G, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1999. 39-42, 698-699.

[6] Sathe G M, O'Brien S, Mclaughlin M M, et al. Use of polymerase chain reaction for rapid detection of gene insertions in whole yeast cells[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19: 4775.

[7] 生秀杰, 周伟强, 姜　莉, 等. 应用以菌落为模板的聚合酶链反应技术筛选重组阳性克隆[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(4): 139-140.

[8] 沈关心, 朱慧芬, 张　悦, 等. 菌落PCR 和质粒PCR 对转化菌的筛选[J]. 免疫学杂志, 2000, 16(2): 149-151.

Selection and identification of recombinant plasmids using colony PCR method

LI Hua, LIU Yan-lin, XIA Hui, ZHANG Zhen-wen

(*College of Enology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: Colony PCR method were used for selection and identification of the recombinant plasmids containing *mleA* and *mleP* from *Oenococcus oeni*. About 1 600 bp and 900 bp bands were showed respectively, they were the same as the PCR products of the two gene *mleA* and *mleP*. These positive clones were used for plasmid extracting and identified by double restriction enzyme digestion (*Eco*RⅠ and *Kpn*Ⅰ) and plasmid PCR method.

Key words: colony PCR; recombined plasmid; *mleA*; *mleP*

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net