

质粒载体连接反应

(一) 外源 DNA 和质粒载体的连接反应

外源 DNA 片段和线状质粒载体的连接，也就是在双链 DNA 5'磷酸和相邻的 3'羟基之间形成的新的共价链。如质粒载体的两条链都带 5'磷酸，可生成 4 个新的磷酸二酯链。但如果质粒 DNA 已去磷酸化，则只能形成 2 个新的磷酸二酯链。在这种情况下产生的两个杂交体分子带有 2 个单链切口，当杂本导入感受态细胞后可被修复。相邻的 5'磷酸和 3'羟基间磷酸二酯键的形成可在体外由两种不同的 DNA 连接酶催化，这两种酶就是大肠杆菌 DNA 连接酶和 T4 噬菌体 DNA 连接酶。实际上在有克隆用途中，T4 噬菌体 DNA 连接酶都是首选的用酶。这是因为在下沉反应条件下，它就能有效地将平端 DNA 片段连接起来。

DNA 一端与另一端的连接可认为是双分子反应，在标准条件下，其反应速度完全由互相匹配的 DNA 末端的浓度决定。不论末端位于同一 DNA 分子（分子内连接）还是位于不同分子（分子间连接），都是如此。现考虑一种简单的情况，即连接混合物中只含有一种 DNA，也就是用可产生粘端的单个限制酶切割制备的磷酸化载体 DNA。在酶作用的底物。如果反应中 DNA 浓度低，则配对的两个末端同一 DNA 分子的机会较大（因为 DNA 分子的一个末端找到同一分子的另一末端的概率要高于找到不同 DNA 分子的末端的概率）。这倦，在 DNA 浓度低时，质粒 DNA 重新环化将卓有成效。如果连接反应中 DNA 浓度有所增高，则在分子内连接反应发生以前，某一个 DNA 分子的末端碰到另一 DNA 分子末端的可能性也有所增大。因此在 DNA 浓度高时，连接反应的初产物将是质粒二聚体和更大一些的寡聚体。Dugaiczky 等(1975;同时参见 Bethesda Res,Lab. 出版的 Focus 第 2 卷，第 2、3 期合刊)从理论上探讨了 DNA 浓度对连接产物性质的影响。简而言之，环化的连接产物与多联体连接产物的比取决于两个参数： j 和 i 。 j 是 DNA 分子的一个末端在同一分子的另一末端附近的有效浓度， j 的数值是根据如下一种假设作出的：沉吟液中的 DNA 呈随机卷曲。这样， j 与 DNA 分子的长度成反比（因为 DNA 越长，某一给定分子的两末端的越不可能相互作用），因此 j 对给定长度的 DNA 分子来说是一个常数，与 DNA 深度无关。 $j = [3/(3\pi lb^0)]^{3/2}$ 其中 l 是 DNA 长度，以 cm 计， b 是随机卷曲的 DNA 区段的

长度。b 的值以缓冲液的离子强度为转移，而后者可影响 D N A 的刚度。
i 是溶液中所有互补末端的深度的测量值，对于具有自身互补粘端的双链 dna 而言， $i=2N_0M \times 10^{-3}$ 末端/ml 这里 N_0 是阿佛伽德罗常数，M 是 D N A 的摩尔浓度（单位：mol/L）。理论上，当 $j=i$ 时，给定 D N A 分子的一个末端与同一分子的另一末端，以及与不同分子的末端相接触的可能性相等。因而在这样的条件下，在反应的初始阶段中，环状分子与多联体分子的生成速率相等。而当 $j>i$ 时，有利于重新环化；当 $i>j$ ，则有利于产生多联体。图 1.9 显示了 D N A 区段的大小与连接反应混合物中 $j:i$ 之比分别为 0.5、1、2 和 5 时所需 D N A 浓度之间关系(D ugaiczzyk 等, 1985)。现在考虑如下的连接反应混合物：其中除线状质粒之外，还含有带匹配末端的外源 D N A 片段。对于一个给定的连接混合物而言，产生单体环状重组基因组的效率不仅受反应中末端的绝对浓度影响，而且还受质粒和外源 D N A 末端的相对浓度的影响。当 i 是 j 的 2 - 3 倍（即末端的绝对浓度足以满足分子间连接的要求，而又不致引起大量寡聚体分子的形成时）外源 D N A 末端浓度的 2 倍时，有效重组体的产量可达到最大。这些条件下，连接反应终产物的大约 40% 都是由单体质粒与外源 D N A 所形成的嵌合体。当连接混合物中线状质粒的量恒定 ($j:i=3$) 而带匹配末端的外源 D N A 的量递增时，这种嵌合体在连接反应之末的理论产量。

涉及带粘端的线状磷酸化质粒 D N A 的连接反应应包含：

- 1) 足量的载体 D N A，以满足 $j:i>1$ 和 $j:i<3$ 。对一个职 pUC18 一般大小的质粒，这意味着连接反应中应含有载体 D N A 为 20-60 μ g/ml。
- 2) 末端浓度等于或稍高于载体 D N A 的外源 D N A，如外源 D N A 浓度比载体低得多，在效连接产物的数量会很低，这样就很难别小部分带重组抽粒的转化菌落。这种情况下，可考虑采用一些步骤来减少带非重组质粒的背景菌落。如用磷酸酶处理线状质粒 D N A 或发迹克隆策略以便通过定向克隆的方法构建重组质粒。

(二) 粘端连接

- 1) 用适当的限制酶消化质粒和外源 D N A。如有必要，可用凝胶电泳分离片段并（或）用碱性磷酸酶处理质粒 D N A。通过酚：氯仿抽提和乙沉淀来纯化 D N

A，然后用 TE(pH7.6)溶液使其浓度为 100/ml。

2) 按如下所述设立连接反应混合物：

- a. 将 0.1 μ l 载体 D N A 转移到无菌微量离心管中，加等摩尔量的外源 D N A。
- b. 加水至 7.5 μ l，于 45 $^{\circ}$ C 加温 5 分钟以使重新退火的粘端解链，将混合物冷却到 0 $^{\circ}$ C。
- c. 加入：10xT4 噬菌体 D N A 连接酶缓冲液 1 μ l

T 4 噬菌体 N D A 连接酶 0.1 Weiss 单位

5 mmol/L ATP 1 μ l

于 16 $^{\circ}$ C 温育 1 - 4 小时

10xT4 噬菌体 D N A 连接酶缓冲液

200mmol/L 同 Tris.Cl(pH7.6)

50mmol/L K MgCl₂

50mmol/L 二硫苏糖醇

500 μ g/ml 牛血清白蛋白（组分 V.Sigma 产品）（可用可不用）

该缓冲液应分装成小份，贮存于 -20 $^{\circ}$ C。

另外，再设立两个对照反应，其中含有（1）只有质粒载体；（2）只有外源 D N A 片段。如果外源 D N A 量不足，每个连接反应可用 50-100ng 质粒 D N A，并尽可能多加外源 D N A，同时保持连接反应体积不超过 10 μ l。可用至少 3 种不同方法来测定 T 4 噬菌体 D N A 连接酶的活性。大多数制造厂商（除 New England Biolabs 公司外）现在都用 Weiss 等，（1968）对该酶进行标化。1 个 Weiss 单位是指在 37 $^{\circ}$ C 下 20 分钟内催化 1 mmol³²P 从焦磷酸根置换到 [γ , β -³²P]ATP 所需酶时，1 个 Weiss 单位相当于 0.2 个用外切核酸酶耐受试验来定义的单位（Modrich 和 Lehman,1970）或者 60 个粘端单位（如 New England Biolabs 公司所定义）。因此，0.015 Weiss 单位的 T 4 噬菌体 D N A 连接酶在 16 $^{\circ}$ C 下 30 分钟内可使 50% 的 λ 噬菌体 HindIII 片段（5 μ g）得以连接。在本书中，T 4 噬菌体 D N A 连接酶一律用 Weiss 单位表示。目前提供的 T 4 噬菌体 D N A 连接酶均为浓溶液（1-5 单位/ μ l），可用 20mmol/L Tris.Cl(pH7.6)、60mmol/L KCl、5mmol/L 二硫苏糖醇、500 μ g/ml 牛血清白蛋白、50% 甘稀释成 100 单位/ml 的浓度置存。处于这种浓度并在这种缓冲液中的 T 4 噬菌体 D N A 连接酶于 -20 $^{\circ}$ C 保存 3 个月可保持稳定。

3) 每个样品各取 1 — 2 μl 转化大肠杆菌感受态细胞。

(三) 平端 D N A 连接

T 4 噬菌体 D N A 连接酶不同于大肠杆菌 D N A 连接酶, 它可以催化平端 D N A 片段的连接 (Sgaramella 和 Khorana,1972;Sgaramella 和 Ehrlich,1978), 由于 D N A 很容易成为平端, 所以这是一个极为有用的酶学物性。有了这样的物性, 才能使任何 D N A 分子彼此相连。然而, 相对而言, 平端连接是低效反应, 它要求以下 4 个条件:

- 1) 低浓度 (0.5mmol/L) 的 ATP(Ferretti 和 Sgaranecka,1981)。
- 2) 不存在亚精胺一类的多胺。
- 3) 极高浓度的连接酶 (50Weiss 单位. ml)。
- 4) 高浓度的平端。

1. 凝聚剂

在反应混合物中加入一些可促进大分子群聚作用并可导致 D N A 分子凝聚成集体的物质, 如聚乙二醇 (Pheiffer 和 Zimmerman,1983;Zimmerman 和 Pheiffer,1983;Zimmerman T H arrison,1985) 或氯化六氨全高钴 (Rusche 和 Howard-Flanders,1985), 可以使如何取得适当浓度的平端 D N A 的总是迎刃而解。在连接反应中, 这些物质具有两作用:

- 1) 它们可使平端 D N A 的连接速率加大 1 — 3 个数量级, 因此可使连接反应在酶 D N A 浓度不高的条件下进行。
 - 2) 它们可以改变连接产物的分布, 分子内连接受到抑制, 所形成的连接产物一律是分子间连接的产物。这样, 即使在有利于自身环化 ($j:i=10$) 的 D N A 浓度下, 所有的 D N A 产物也将是线状多聚体。
- 在设立含凝聚剂的连接反应时, 下列资料可供参考。

(1) 聚乙二醇 (PEG8000)

1) 用去离子水配制的 P E G 8000 贮存液 (40%) 分装成小份, 冰冻保存, 但加入连接反应混合物之前应将其融化并使其达到室温。在含 15%PEG 8000 的连接反应混合物中, 对连接反刺激效应最为显著。除 PEG 800 和 T 4 噬菌体 D N A 连接酶以外, 其他所有连接混合物的组分应于 0 $^{\circ}\text{C}$ 混合, 然后加适当体积的

PEG 8000 (处于室温), 混匀, 加酶后于 20℃ 进行温育。

2) 连接混合物中含 0.5mmol/L ATP 和 5mmol/L MgCl₂ 时对连接反应的刺激效应最为显著, 甚至 ATP 浓度略有增加或 MgCl₂ 浓度略有降低, 都会严重降低刺激的强度 (Pheiffer 和 Zimmerman, 1983)。

3) 浓度为 15% 的 PEG 8000 可刺激带粘端的 DNA 分子的连接效率提高至原来的 10-100 倍, 反应的主产物是串联的多联体。

4) PEG 8000 可刺激短至 8 个核苷酸的合成寡聚物的平端连接, 在这一方面, 它与氯化六氨合高钴有所不同。

(2) 氯化六氨合高钴

1) 氯化六氨合高钴可用水配成 10mmol/L 贮存液贮存于 -20℃, 它对连接反应的刺激具有高度的浓度信赖性。当连接反应混合物中盐浓度为 1.0-1.5μmol/L 时, 其刺激作用最大。氯化六氨合高钴可使平端连接的效率大约提高到原来的 50% 左右, 但只能使端连接的效率提高到原来的 5 倍 (Rusche 和 Howard-Flanders, 1985)。

2) 在单价阳离子 (30mmol/L KCl) 存在下, 它对平端连接仍有一定的刺激作用, 但此时连接产物的分布有所改变。连接产物不再是清一色的分子间连接产物, 相反, 环状 DNA 将占优势。

3) 与 PEG 8000 不同, 氯化六氨合高钴不能显著提高合成寡核苷酸的连接速率。