

从未经培养的嗜热菌中扩增、克隆及表达核酸外切酶 III(exonuclease III)基因

P. V. Reddy, S. Bench, T. Mamone, R. Deadman, D. Nunez, and J. Farchaus
GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, USA

采用 GenomiPhi DNA 全基因组扩增试剂盒从 *Thermoplasma volcanium* 的甘油保藏物扩增得到了基因组 DNA。利用扩增得到的 DNA 构建了可以代表 *T. volcanium* 基因组的全基因组鸟枪法文库。扩增的 DNA 也被用于克隆核酸外切酶 III 基因，显示可以利用 GenomiPhi DNA 全基因组扩增试剂盒分离得到的基因组 DNA 对目的基因进行快速克隆和表达。

目前，很多实验室不易培养的微生物，包括一些细菌、真菌、病毒和原虫等的基因组很难或无法被研究。其中有些生物可通过改进培养基配方获得扩增，但是这些配方通常比较昂贵而且培养比较耗时。

GenomiPhi DNA 全基因组扩增试剂盒采用新的技术能够从少量的基因组 DNA 中完成代表性的全基因组扩增。该方法通过链替换用 Phi29 DNA 聚合酶指数扩增单链或双链线性 DNA。

采用这种简单、等温的方法可以在一个过夜的反应中由少至 1ng 的起始材料获得微克级的 DNA。绝大部分扩增所得的 DNA 长度超过 10kb，而且 Phi29 DNA 聚合酶的高保真性保证了原始序列扩增的准确性。扩增所得的 DNA 可被直接用于诸如克隆和 PCR 等下游应用中而无需进一步处理。

Thermoplasma 为厌氧异生菌，最佳培养温度是 60 °C。本论文描述了在没有做细菌培养的情况下，从 *Thermoplasma volcanium* 的甘油保藏物扩增得到了基因组 DNA 及构建了鸟枪法文库的过程，同时显示扩增的 DNA 也可被用于克隆和表达核酸外切酶 III 基因。

构建鸟枪法文库

在没有做细菌培养的情况下，从 ATCC 的甘油保藏物中直接用 TempliPhi 试剂盒扩增了 *Thermoplasma volcanium* 全基因组。为了鉴定扩增产物，DNA 经剪切后在 pUC18 中构建了 2-4kb 的全基因组鸟枪法克隆文库。

通过对少量克隆测序分析该文库。用 TempliPhi

DNA 测序模板扩增试剂盒从甘油保藏物中直接扩增质粒 DNA 用于测序。测序反应则用 DYEnamic ET Terminator 循环测序试剂盒在 MegaBACE 4000 DNA 分析系统上进行。

PCR 扩增，克隆及表达

通过 PCR 扩增并克隆特定基因。为核酸外切酶 III 基因特别设计 PCR 引物。PCR 结束后用 2% 的琼脂糖凝胶电泳分析结果，并用 Typhoon 多功能成像系统成像。

采用匹配的酶切位点将 PCR 产物克隆入合适的表达载体中。经测序证实双链基因序列的正确性后，再在大肠杆菌中把基因表达并纯化该蛋白。

结果和讨论

目前，大多数用于构建细菌文库的方法都需要分离大量的高质量基因组 DNA。而使用 GenomiPhi DNA 全基因组扩增试剂盒，只需要 16.5 小时而不是几天或几周就可以得到这些 DNA (表 1)。

表 1. 工作流程比较

	传统方法	GenomiPhi
准备 ATCC 569 培养基	4 小时	0
准备接种	2 - 3 日	0
培养	2 - 3 日	0
基因组 DNA 制备	2 - 4 小时	0
GenomiPhi 扩增反应	0	16 小时
总时间	~ 4 - 6 日	~ 16.5 小时

从 ATCC 购买的甘油保藏物中直接构建了覆盖整个细菌基因组的鸟枪法克隆文库。在进行 GenomiPhi 扩增之前只需要一步快速裂解和澄清。少量克隆经测序后得到 1305 个序列，平均长度为 686 碱基。这代表了仅约 0.56 倍的 1.6-Mb *T. volcanium* 基因组的序列覆盖率 ($1305 \times 686/1600000$)。

这些序列经过拼接并和已报道的基因组序列进行了比对。在这个拼接中，686 个基因缺口与基因组的位置

置作成图表(图1)。基因缺口的大小和位置是在基因组中随机分布的,这意味着这些挑选的扩增克隆在整个基因序列中均匀分布,被 Genomiphi kit 扩增的片段是能代表 T.Volcanim genomic DNA 的。

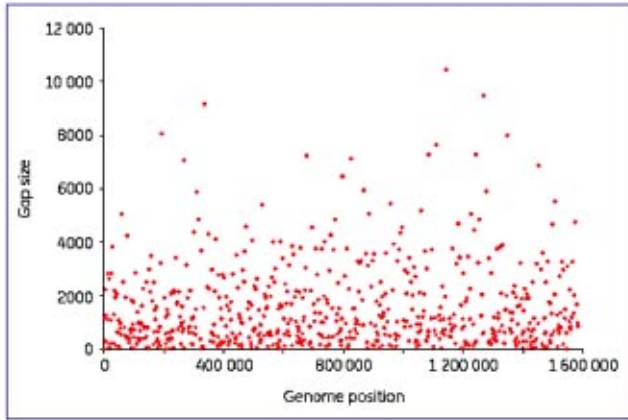


图 1. 在拼接 1305 全基因组鸟枪法序列中, 序列缺口的大小和位置的分布。

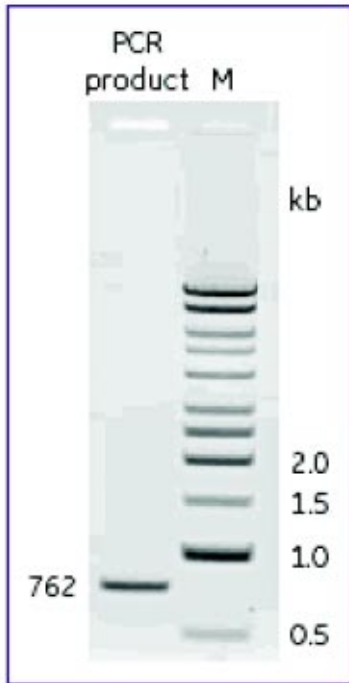


图 2. 采用 Genomiphi DNA 全基因组扩增试剂盒获得的 DNA 作为模板扩增得到的 T. volcanium 核酸外切酶 III 基因 PCR 产物。M = DNA Marker (27-4004-01)

再者, 扩增的基因组 DNA 还是极好的用于扩增特定基因的模板。用核酸外切酶 III 基因特异性引物成功地扩增了该基因, 并获得大小正确的 PCR 产物(图 2)。将该基因 PCR 产物克隆入表达载体, 并成功地在大肠杆菌中表达了该蛋白(图 3)。

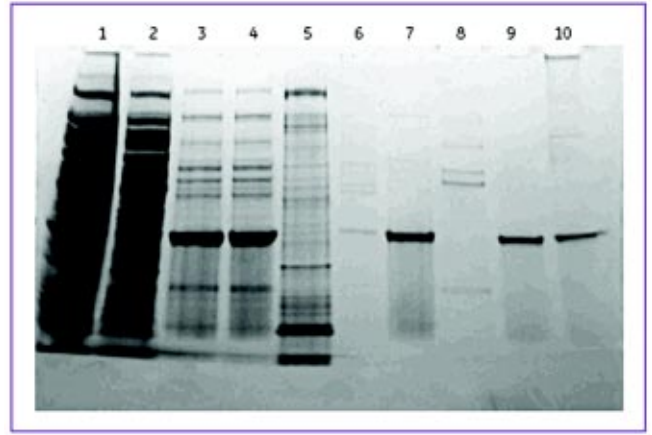


图 3. 在不同纯化步骤获得的核酸外切酶 III 基因产物的 SDS-PAGE 结果。1 为将初提物加热至 50°C, 20 分钟; 2 为过亲和和层析柱的流穿液; 3 为洗脱峰; 4 为透析后的洗脱峰; 5 为亲和和层析非洗脱峰部分; 6 为离子交换流穿液; 7 为离子交换洗脱峰; 8 为离子交换非洗脱峰部分; 9 为在最终缓冲液中的 T. volcanium 核酸外切酶 III; 10 为大肠杆菌的核酸外切酶 III 对照

订购资料

产品	货号
GenomiPhi DNA	
全基因组扩增试剂盒 (25 反应)	25-6600-00
GenomiPhi DNA	
全基因组扩增试剂盒 (100 反应)	25-6600-01
GenomiPhi DNA	
全基因组扩增试剂盒 (500 反应)	25-6600-02
TempliPhi100 扩增试剂盒 (100 反应)	25-6400-10
TempliPhi 500 扩增试剂盒 (500 反应)	25-6400-50
TempliPhi DNA	
测序模板扩增试剂盒 (10 000 反应)	25-6400-01