论文

一种新的 DNA 分子克隆方法

黄媛, 陶颖, 张文露, 黄爱龙, 胡接力*

重庆医科大学, 感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016

* 联系人, E-mail: hujieli1977@163.com

收稿日期: 2011-05-13; 接受日期: 2011-08-25

国家自然科学基金(批准号: 81000732)资助项目

doi: 10.1360/052011-309

摘要 DNA 分子克隆是基本的分子生物学实验技术, 传统的分子克隆方法大多需经过酶切链接过程, 但在某些情况下, 没有合适的酶切位点往往会成为阻碍克隆进行的障碍. 本文描述了一种新的分子克隆方法, 称为不依赖酶切和链接的分子克隆(RLIC). 利用 RLIC, 将 3 种不同大小的 DNA 片段克隆到 3 种不同载体, 证明了这种方法的有效性和可靠性. 由于该方法不受限制性酶切序列限制, 省去了酶切连接步骤, 因此具有很大的灵活性和简便性, 在分子生物学研究方面有广泛应用前景.

关键词
DNA
分子克隆
方法

DNA 分子克隆是指将一段目的 DNA 分子片段与特定载体 DNA 分子连接, 形成重组 DNA 分子. DNA 分子克隆是基本的分子生物学实验技术, 广泛用于生物学、医学等各个领域. 传统的 DNA 分子克隆方法主要包含以下步骤: 目标 DNA 分子制备、目标分子与载体酶切、连接、转化及筛选.

从分子克隆技术建立之初起, 针对传统 DNA 分子克隆方法的改进就一直在进行, 其中很多技术改进已转化为商品化克隆试剂盒, 如 T-A Cloning^[1], TOPO Cloning, Gateway^[2,3]技术等. 这些新技术在不同程度上简化了克隆过程, 提高了克隆效率, 也能满足大部分研究需求. 但是对于一些问题, 传统克隆方法和新技术仍不能很好地解决. 例如, 可能希望在已克隆了一个基因(以 gene 1 指代)的真核表达载体上再克隆另一个基因(如检测标记 EGFP 或筛选抗性标记等, 以 gene 2 指代), 且 gene 2 需使用独立启动子来单独表达而非融合表达. 此时, 不能再选择该载体的多克隆位点来克隆 gene 2. 因为, 第一, 可能已经没

有合适的酶切位点; 第二, 即使有合适的酶切位点, 在该部位插入 gene 2 将扰乱 gene 1 的表达. 理想的情况是, 在第一个基因表达框架之外(如 polyA 序列下游)的载体骨架上, 找到合适的酶切位点, 插入 gene 2 表达片段(包括启动子、基因及转录终止信号). 然而, 在大多数商业化载体中, 往往很难找到合适的位点来进行这类操作.

如果有一种克隆方法, 可以不受插入部位的序列限制, 即不用限制性切割, 便可以解决上述问题. Aslanidis 和 de Jong^[4]建立过一种非连接依赖性克隆方法(ligation-independent cloning of PCR products, LIC-PCR), 基本原理是: 在 PCR 片段末端及 PCR 扩增的线性载体末端分别加上 12 bp 核苷酸, 利用 T4 DNA 聚合酶的外切活性, 产生末端为单链的上述两种分子, 由于这两种分子末端互补, 退火后转化可得到重组分子. Rashtchian 等人^[5]将此方法进行了改进, 使末端 12 bp 核苷酸含 dUMP, 从而可以用尿嘧啶 DNA 糖基化酶(UDG)进行特异切割, 便于产生单链

末端. 各种 LIC 方法本质上与 T-A 克隆类似, 它们都需要线性化载体, 区别在于线性化载体及 PCR 片段末端互补单链长度不同, T-A 克隆时分子末端仅有一个碱基互补, 而 LIC 中, 分子末端具有更长的互补单链^[6], 这使得分子间退火后无需使用 DNA 连接酶. 虽然 LIC-PCR 具有序列非限制性特点, 但此类方法均需获得线性化载体, 并且需要将载体和待克隆分子末端单链化, 步骤相对复杂繁琐. 本文描述了一种新的 DNA 分子克隆方法, 它具有序列非依赖性特点, 同时操作较简便, 应用灵活, 可作为分子克隆的一种新选择.

1 材料与方法

1.1 材料

人乙型肝炎病毒(HBV)复制质粒 PCH9/3091(约 6.1 kb)由德国 Nassal 实验室构建^[7], 中国人民解放军第三军医大学西南医院兰林博士赠送. PCH9/3091 含有 HBV 1.1×全基因组 DNA, 由 CMV 启动子驱动 HBV 前基因组 RNA(pgRNA)转录, 该质粒在转入肝源性细胞后可支持 HBV 复制. pEGFP-N1, pEGFP-C1 (Clontech 公司)和 pEGFP-N1-SM22 为本实验室保存^[8]. pEGFP-N1-SM22 以 pEGFP-N1 为骨架, 多克隆位点区插入了小鼠 SM22 启动子(长约 2.2 kb). pCDNA3.1-pol 为本实验室构建, 该质粒以 pCDNA3.1(Invitrogen)为骨架, 多克隆位点区克隆有 HBV 多聚酶基因(pol, 长约 2.5 kb). Lenti-GFP 为本实验保存, 该质粒以慢病毒骨架质粒 pLentiLox3.7 为骨架, 含有 *EGFP* 基因表达框架. HepG2 细胞为本实验室保存. PCR 试剂(PrimeSTAR HS)为 TaKaRa 公司产品; 胶回收试剂盒为 QIAGEN 公司产品; PCR 产物纯化试剂盒为 Roche 公司产品; 小量质粒提取试剂盒为 Promega 公司

产品; 地高辛标记检测试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II)及转染试剂 Eugene HD 为 Roche 公司产品; DNAase I, 限制性内切酶 *Sal* I, *Sma* I, *Bgl* II, *Bam*H I 及 *Dpn* I 均为 Promega 公司产品; RNase A 为 Merck 公司产品; 本文所用 PCR 引物由上海 Invitrogen 公司合成, 引物序列见表 1.

1.2 方法

(1) 克隆策略. 最初在 HBV 体外复制研究中, 希望控制 PCH9/3091 的转染效率. 共转染荧光表达质粒 pEGFP-N1 是一种较便于观察的方式, 但由于 EGFP 从另一个质粒表达, 通过荧光表达情况来反映 PCH9/3091 的转染效率可能不太准确. 如果将 EGFP 表达框架克隆到 PCH9/3091, 则 PCH9/3091 的转染效率可以通过观察荧光得到更准确的反映. 为达到此目的, 首先需要得到一个完整的 EGFP 表达框架, 包括启动子、增强子、*EGFP* 基因、终止信号, 然后将该片段插入 HBV 复制元件以外的质粒骨架适当位置. 完整的 EGFP 表达框架可以方便地从 pEGFP-N1 扩增而获得, 但将该片段插入 PCH9/3091 的合适位置却颇为困难, 因为在该质粒上没有合适的酶切位点. 为解决该问题, 本研究建立了一种新的克隆策略, 称为不依赖酶切和连接的分子克隆(restriction digestion and ligation-independent cloning, RLIC). RLIC 的基本原理类似于 Stratagene 公司的 DNA 定点诱变技术(site-directed mutagenesis). 图 1(A)所示为 Stratagene 定点诱变原理: 设计一对突变引物, 该引物含有一个突变目标碱基(用红色突起表示), 该突变碱基两侧序列与质粒相应位置互补, 此对引物与待突变质粒退火并线性扩增, 产物为带缺刻的环状分子, 该分子转化到感受态菌后被修复, 得到诱变质粒. 图 1(B)为本

表 1 PCR 引物序列^{a)}

引物	序列(5'→3')
F _{pch9-egfp}	T CGAATTGATCTGATCAAATTCCG ACC GTATTACCGCCATGCAT PCH9 <i>EGFP</i>
R _{pch9-egfp}	CATACGATT T AGGTGACACTATAG GG ACAAACCACA ACT AGAAATGC PCH9 <i>EGFP</i>
F _{cmv}	CCATTGACGCAAAATGGGCGGTAG
R _{egfp}	CAGCTCGACCAAGGATGGGCACCA
R _{p-lenti}	CG TAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAT CAC GGTGGTCTCCATGCGACGT pLenti-GFP V5 <i>pol</i>

a) 黑体示引物序列中与载体互补的部分; 下划线示引物序列中与待扩增片段互补的部分

研究克隆策略, 将待克隆的 DNA 片段(红色部分)看作待突变的点(或看作增加点突变中的红色突起数量), 该片段两侧末端(黑色部分)序列与载体相应区域(片段插入区间两侧)同源, 由于该同源片段的存在, 该双链片段即可看作是一对大引物(mega-primer), 它们可利用其末端与载体相应部位退火并延伸, 最终也得到含有目标片段的双链环状缺刻分子, 缺刻分子在转化后修补为完整质粒. 利用该策略, 将 EGFP 表达片段插入到 PCH9/3091 中 HBV DNA 下游, 另外还将此方法用于另外两个 DNA 片段亚克隆.

(2) EGFP 表达片段扩增及克隆到 PCH9/3091. 用引物 $F_{pch9-egfp}$ 及 $R_{pch9-egfp}$ 从 pEGFP-N1 扩增 pCMV-EGFP-PolyA 片段, 该片段两端分别带有与 PCH9/3091 HBV DNA 下游质粒骨架序列同源的序列(表 1), 用 QIAGEN 胶回收试剂盒回收该片段, 取 1 μ g 回收片段、50 ng PCH9/3091, 0.5 μ L PrimeSTAR 聚合酶等建立 50 μ L 反应体系. 按如下条件扩增: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 52 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 4 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 3 min. 扩增产物用 Roche PCR 产物纯化试剂盒纯化, 取 1/3 纯化产物用 *Dpn* I 37 $^{\circ}$ C 消化 4 h, 然后取消化后产物 1.5 μ L 电转化 JM109 感受态细胞, 获得的克隆用酶切鉴定, 鉴定正确的克隆命名为 PCH9-EGFP.

(3) PCH9-EGFP 功能鉴定.

(i) 细胞培养及转染. HepG2 细胞用含有 10% 胎牛血清的 MEM 培养基在 37 $^{\circ}$ C, 含 5%CO₂ 的孵箱中培养. 转染前 20 h, 将 HepG2 细胞接种于 6 孔板, 密度约为 7×10^5 个/孔, 用无抗生素培养基培养过夜. 第 2 天, 用 Eugene HD 转染试剂将 2.5 μ g PCH9-EGFP

或 2.5 μ g PCH9/3091(比例为 3:1)转入每孔, 各 3 孔, 转染后第 2 天更换新鲜培养基.

(ii) 细胞内 HBV 病毒 DNA 分析. 转染后第 5 天, 用下述方法从 HepG2 细胞中提取胞浆核心颗粒 HBV DNA. 细胞用 PBS 洗涤后, 每孔加入 400 μ L 细胞裂解液(10 mol/L Tris-Cl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 1%NP40, 2%蔗糖), 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min; 15000 $\times$ g 离心 3 min, 将上清吸入另一个洁净 EP 管中; 加入 $MgCl_2$ 溶液至终浓度为 10 mmol/L, 然后依次加入 DNase I 和 RNase A, 终浓度分别为 40 U/mL 和 1 mg/mL, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h; 反应完成后, 每管加入含有 1.5 mol/L NaCl 的 35% PEG 8000 140 μ L, 冰浴 1 h; 4 $^{\circ}$ C, 11000 $\times$ g 离心 5 min, 弃上清; 每管加入 400 μ L 消化缓冲液(0.5%SDS, 2.5 mmol/L Tris-Cl pH 8.0, 10 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl)及终浓度为 1 mg/mL 的蛋白酶 K, 42 $^{\circ}$ C 消化 3 h; 酚氯仿抽提, 乙醇沉淀, 产物溶于 7.5 μ L 灭菌超纯水中, -20 $^{\circ}$ C 保存备用.

HBV DNA 经 1%琼脂糖凝胶电泳后, 转印至带正电荷尼龙膜(Roche), 烤干固定后进行预杂交、杂交(地高辛标记的 HBV DNA 探针)、洗脱、检测, 具体操作按产品说明书进行.

(4) SM22 启动子亚克隆. 用引物 F_{cmv} 及 R_{egfp} 从 pEGFP-N1-SM22 扩增 pSM22 片段, 该片段两端分别带有 pCMV 3'末端及 EGFP 5'末端序列. 用 QIAGEN 胶回收试剂盒回收该片段, 取 800 ng 回收片段、50 ng pEGFP-C1, 0.5 μ L PrimeSTAR 聚合酶等建立 50 μ L 反应体系. 按如下条件扩增: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 2.5 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min. 扩增产物用 Roche PCR 产物纯化试剂盒纯化, 取 1/3 纯

图1 RLIC 原理

(A) Stratagene 定点诱变原理: 点突变引物与待突变载体退火并延伸, 合成带缺刻的分子, 这些分子转化细菌后, 可获得带有已发生点突变的质粒; (B) RLIC 原理: 待插入片段可看作“大突变引物”, 该片段可采用类似(A)的方式克隆到载体

化产物用 *Dpn* I 37℃ 消化 4 h, 然后取消消化后产物 1.5 μL 电转化 JM109 感受态细胞, 获得的克隆用酶切鉴定.

(5) HBV pol 基因亚克隆. 用引物 F_{cmv} 及 $R_{p-lenti}$ 从 pCDNA3.1-pol 扩增 HBV pol 片段, 该片段两端分别带有 pCMV 3'末端及部分 V5 epitope 序列. 用 QIAGEN 胶回收试剂盒回收该片段, 取 1 μg 回收片段, 30 ng pLenti-GFP, 0.6 μL PrimeSTAR 聚合酶等建立 50 μL 反应体系. 按如下条件扩增: 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 15 s, 55℃ 20 s, 72℃ 4 min 30 s, 30 个循环, 72℃ 延伸 5 min. 扩增产物用 Roche PCR 产物纯化试剂盒纯化, 取 1/3 纯化产物用 *Dpn* I 37℃ 消化 4 h, 然后取消消化后产物 1.5 μL 电转化 JM109 感受态细胞, 获得的克隆做 PCR 及测序鉴定.

2 结果

2.1 PCH9-EGFP 克隆及鉴定

要实现 EGFP 独立表达, 需获得 EGFP 完整表达框架, 包括启动子及终止信号. 首先从 pEGFP-N1 扩增 EGFP 表达框架, 扩增片段长约 1.6 kb(图 2(B)), 然后, 以胶回收纯化后的该 1.6 kb 片段为大引物, PCH9/3091 为模板, 进行线性扩增(非指数扩增). 高质量的胶回收片段对于后面的 RLIC 反应很重要, 不纯的片段可能会导致 RLIC 反应产生较多非目标产物. RLIC 产物经 *Dpn* I 消化后, 起始的模板质粒 PCH9/3091 被去除, 而线性扩增产物被保留(未甲基化), 这些带缺口的产物在转化大肠杆菌后被修复, 得到候选克隆. 图 2 显示了两个候选克隆的酶切鉴定电泳

图 2 PCH9-EGFP 克隆及鉴定

(A) EGFP 表达片段克隆示意图. 首先, 利用引物 $F_{pch9-egfp}$ 和 $R_{pch9-egfp}$ 从 pEGFP-N1 扩增 EGFP 表达片段, 包含 CMV 启动子、EGFP 基因及 polyA 信号序列, 该片段末端含有与 PCH9/3091 待插入位点两侧互补的序列; 利用 RLIC 反应, 将该片段插入 PCH9/3091 中 HBV DNA 序列下游, 得到质粒 PCH9-EGFP. *: 示大引物中与载体同源的序列位置; (B) EGFP 表达片段扩增及候选克隆酶切鉴定电泳图. PCR 扩增的 EGFP 表达片段分子量约为 1.6 kb. 含有正确插入片段的克隆应被 *Sal* I 切为 3.8 kb+3.9 kb 两段, 被 *Sma* I 切为 0.7 kb+7.0 kb 两段

结果. 由于 EGFP 表达片段含有多克隆位点(MCS), 该片段插入将引入另一个 *Sal* I 及 *Sma* I 位点, 结合原来 PCH9/3091 上这两个酶的单一位点(图 2(A)), 可以鉴定克隆是否正确. 酶切结果显示, 这两个克隆均含有正确的插入片段.

2.2 PCH9-EGFP 可表达绿色荧光蛋白

为了解 EGFP 表达片段克隆到 PCH9/3091 后是否具有正常功能, 将酶切鉴定正确的 PCH9-EGFP 质粒转染 HepG2 细胞, 然后观察细胞是否表达绿色荧光蛋白. 结果显示, 在转染后 48~120 h, 均可见明显绿色荧光细胞(图 3, 仅显示部分结果), 提示 EGFP 表达片段具有正常功能, 可以用来指示转染效率.

2.3 PCH9-EGFP 支持 HBV 体外复制

RLIC 反应要利用 DNA 聚合酶合成模板质粒骨架, 由于 DNA 聚合酶有一定的错误合成率, 可能带来一些潜在风险, 即在模板质粒骨架中引入人为突变. 因此, 还有必要确认 PCH9-EGFP 除了可以表达 EGFP 外, 其他功能亦未受到影响, 本研究关注的最重要功能是支持 HBV 体外复制. 为此, 将 PCH9-EGFP 转染 HepG2 细胞, 转染后第 5 天提取细胞内核心颗粒 HBV DNA, 并用 Southern blot 检测. 如图 4 所示, 与 PCH9/3091 相同, PCH9-EGFP 在转入 HepG2 细胞后, 仍能支持 HBV 复制, Southern blot 可以检测到 HBV 复制中间体, 包括 rcDNA(松弛环状 DNA), dsIDNA(双链线性 DNA)及 ssDNA(单链 DNA).

2.4 SM22 启动子亚克隆

上述结果显示, RLIC 已成功将 EGFP 表达片段插入到 PCH9/3091 指定位置, 且未破坏质粒的原有功能, 提示 RLIC 的有效性. 为进一步确认该方法的可靠性, 再次利用 RLIC 策略, 将一段长约 2.2 kb 的

图 3 PCH9-EGFP 支持绿色荧光蛋白表达

图 4 Southern blot 检测 HBV 复制中间体

将 PCH9/3091 及 PCH9-EGFP 分别转染 HepG2 细胞, 5 天后提取细胞内 HBV 复制中间体, 并用 Southern blot 检测. M: DNA marker; rcDNA: 松弛环状 DNA; dsIDNA: 双链线性 DNA; ssDNA: 单链 DNA

DNA 片段(SM22 启动子), 从 pEGFP-N1 载体亚克隆到 pEGFP-C1. 图 5(A)显示了该实验的流程. 与上述方法类似, 将 pSM22 从 pEGFP-N1-SM22 扩增出来, 该片段两端分别带有一小段 CMV 启动子 3'末端和 EGFP 5'末端同源序列, 这些同源序列在后续 RLIC 反应中可与 pEGFP-C1 相应序列退火(图 5(B)). 由于 pEGFP-N1 与 pEGFP-C1 的差别仅在于 MCS 位置不同, 前者位于 EGFP 基因 N 端, 而后者位于 EGFP 基因 C 端, 通过 MCS 中的单一位点 *Bgl* II 及 *Bam* H I 酶切, 可鉴定出正确的克隆. 在本实验挑选鉴定的克隆中, 所有克隆均为正确克隆(图 5(B)).

2.5 HBV pol 基因亚克隆

作为对 RLIC 方法的又一次验证, 利用 RLIC 将 HBV DNA 聚合酶(*pol*)基因从 pCDNA3.1 亚克隆到 Lenti-GFP 载体. *pol* 基因长度约 2.5 kb, Lenti-GFP 约 7.6 kb. 首先从 pCDNA3.1-*pol* 扩增得到 *pol* 基因片段, 该片段两端分别带有 pCMV 3'末端及部分 V5 表位同源序列(位于 EGFP 基因下游), 然后利用 RLIC 反应将该片段克隆到 Lenti-GFP. 图 6(B)中 PCR 鉴定结果及测序结果(结果未显示)显示, 本实验获得了含有正确插入片段的重组质粒.

图 5 pSM22 亚克隆

(A) pSM22 片段亚克隆示意图. 从 pEGFP-N1-SM22 扩增 pSM22 片段, 利用 RLIC 反应将其克隆到 pEGFP-C1. *: 示大引物中与载体同源的序列位置; (B) pSM22 片段扩增及候选克隆酶切鉴定. 挑取 8 个候选克隆(1~8 号)进行酶切鉴定. 正确的克隆应被 *Bam*H I 切为 6.2 kb+0.7 kb 两段, 被 *Bgl* II 切为 4.0 kb+2.9 kb 两段. 9 为一个未被酶切的候选质粒

图 6 HBV pol 基因亚克隆

(A) HBV pol 基因克隆示意图. *: 示大引物中与载体同源的序列位置; (B) pol 基因 PCR 扩增及候选克隆的 PCR 鉴定. P: 从候选克隆扩增 pol 基因; M: DNA marker; N: 阴性对照

3 讨论

本文描述了一种新的 DNA 分子克隆方法, 称为 RLIC. 以 3 种不同长度的插入片段(2.2, 2.5 和 3.4 kb)及 3 种不同的载体(pEGFP-C1[4.7 kb], PCH9/3091[6.1 kb], Lenti-GFP[7.6 kb])为例, 展示了该方法的有效性及其简便灵活性. RLIC 突出的优点是, 它是一种序列非特异性克隆方法, 无需选择特异性酶切位点, 这为 DNA 片段插入位点选择提供了极大的灵活性. 正如在将 EGFP 表达片段克隆到 PCH9/3091 中一样, 经常没有合适的酶切位点, 这时要么对载体进行复杂的改造, 要么放弃当前实验方案. 由于 RLIC 策略无需考虑酶切位点, 使得可以较容易地获得目的克隆, 从而有利于某些分子生物学实验的顺利开展.

RLIC 反应简单易行, 其基本原理类似定点诱变反应, 它以完全互补的双链目标片段为大引物(mega-primers, 图 1). 需要注意的是, 保证在该大引物两端带有一定长度的克隆载体同源序列(与载体上插入位点两侧序列互补), 通过在片段扩增引物 5'末端加上相应序列即可实现(如引物 $F_{\text{pch9-egfp}}$, $R_{\text{pch9-egfp}}$ 及 $R_{\text{p-lenti}}$). 或当条件允许时, 直接从共有序列处开始扩增片段(如亚克隆 SM22 时所用引物 F_{cmv} 及 R_{egfp}). 根据经验, 片段末端同源序列长度最好在 25 bp 以上, 且长度越长, 克隆效率可能越高.

RLIC 反应需用到 *Taq* DNA 聚合酶, 而该类酶均存在一定的错误掺入率, 因此可能产生一个潜在缺点, 即在反应过程中可能在质粒骨架上引入突变. 本研究认为, 这种缺点的影响是有限的. 首先, RLIC 反应并非真正的 PCR, 它是一个线性扩增过程, 即每一轮扩增都只能以初始的质粒为模板来进行, 而不能以前面循环的扩增产物为模板, 这就保证了每轮扩增模板的正确性, 避免了突变产物在后续循环中的指数积累; 其次, 即使偶尔出现突变, 这些突变应主要出现在质粒骨架上(因为插入片段本身不被扩增), 严重影响质粒自身功能的突变在转化筛选过程中因无法生存复制将被筛除, 而那些不影响质粒自身功能的突变则不会对后续实验造成重要影响; 另外, 通过选用保真度高的 DNA 聚合酶, 可以在很大程度上防止人为突变发生. 本实验采用了 Prime-STAR DNA 聚合酶进行 RLIC 反应, 功能实验显示, 所得 PCH9-EGFP 克隆的正常功能并未遭到破坏.

总之, RLIC 是一种有效的 DNA 分子克隆新方法, 由于该方法不依赖限制性酶切位点, 使得在面临没有合适酶切位点的情况下, 能够方便地将目标片段克隆到载体. 同时, RLIC 省却了连接步骤, 操作简便易行, 这使得该方法在分子生物学研究方面有广泛的应用前景.

参考文献

- Holton T A, Graham M W. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19: 1156
- Katzen F. Gateway recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin Drug Discov*, 2007, 2: 571–589
- Hartley J L, Temple G F, Brasch M A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res*, 2000, 10: 1788–1795
- Aslanidis C, de Jong P J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6069–6074
- Rashtchian A, Buchman G W, Schuster D M, et al. Uracil DNA glycosylase-mediated cloning of polymerase chain reaction-amplified DNA: application to genomic and cDNA cloning. *Anal Biochem*, 1992, 206: 91–97
- Aslanidis C, de Jong P J, Schmitz G. Minimal length requirement of the single-stranded tails for ligation-independent cloning (LIC) of PCR products. *PCR Methods Appl*, 1994, 4: 172–177
- Nassal M. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol*, 1992, 66: 4107–4116
- 王媛媛, 胡接力, 崔静, 等. SM22 启动 SCAP 真核表达质粒的构建及其在 CHO 细胞中的表达. *生物工程学报*, 2010, 26: 114–120

A New Method for DNA Molecular Cloning

HUANG Yuan, TAO Ying, ZHANG WenLu, HUANG AiLong & HU JieLi

*Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China*

DNA molecular cloning is an extensively used technique in molecular biology research. Traditional methods for molecular cloning usually include restriction digestion and ligation process. In many cases, however, cloning of a DNA fragment may be difficult because no appropriate restriction site can be found. In the present study, we have developed a new method for DNA molecular cloning, named Restriction digestion and Ligation-Independent Cloning (RLIC). We cloned three DNA fragments with different sizes into three different vectors by using RLIC, demonstrating the effectiveness of this method. Freeing from the limitation of restriction enzyme sites and omitting the ligation process, RLIC possesses great flexibility and may find broad applications in molecular biology research.

DNA, molecular cloning, method

doi: 10.1360/052011-309