

魏跃, 陈啸寅, 王全智, 等. 应用改良 TAIL-PCR 克隆黄瓜 *6PGDH* 基因上游序列[J]. 浙江农业学报, 2011, 23(5):900–904.

应用改良 TAIL-PCR 克隆黄瓜 *6PGDH* 基因上游序列

魏 跃^{1,2}, 陈啸寅¹, 王全智¹, 陈劲枫^{2,*}

(¹ 江苏农林职业技术学院, 江苏 镇江 212400; ² 南方蔬菜遗传改良重点开放实验室, 南京农业大学, 江苏 南京 210095)

摘 要: 运用改良的热不对称交错 PCR (thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR) 对黄瓜 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因 (*6-phosphogluconate dehydrogenase* gene, *6PGDH*) 的上游序列进行了克隆。与最初的 TAIL-PCR 相比较, 主要改进之处有: (1) 根据 Primer 5.0 软件计算结果从随机 RAPD 引物库中筛选出合适的上游引物, 低严谨和高严谨反应中的退火温度也分别进行了调整; (2) 将热不对称交替反应继续应用到第 3 轮 PCR 扩增反应中以提高特异目的条带和减少非目的条带。经过 3 轮 PCR 扩增反应最终获得位于黄瓜 *6PGDH* 起始密码子 ATG 上游长度为 517 bp 新序列。试验结果表明, 应用改良 TAIL-PCR 能快速、有效地克隆与已知区域相邻的序列。

关键词: 热不对称交错 PCR; 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶; 黄瓜; 上游序列

中图分类号: S642.2

文献标志码: A

文章编号: 1004–1524(2011)05–0900–05

Isolation upstream sequence of *6PGDH* gene from cucumber (*Cucumis sativus* L.) by modified TAIL-PCR

WEI Yue^{1,2}, CHEN Xiao-yin¹, WANG Quan-zhi¹, CHEN Jin-feng^{2,*}

(¹ Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry, Zhenjiang 212400, China; ² Key Laboratory of Southern Vegetable Crop Genetics Improvement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The upstream sequence of the *6-phosphogluconate dehydrogenase* (*6PGDH*) gene from cucumber (*C. sativus* L.) was isolated using modified TAIL-PCR method. Compared with the original protocol, the main modifications of the TAIL-PCR were introduced here: (1) among the battery of random 10 bp primers originally developed for RAPD analysis, suitable primers were selected as short arbitrary upstream primers according to the Primer 5.0 software prediction prior to PCR, and the annealing temperatures of two different stringency circles were also adjusted to be optimal accordingly. (2) the asymmetric interlaced thermal cycle was also applied in tertiary PCR so that the target product could be further preferentially amplified over non-target products. A 517 bp sequence upstream to the start codon of the *6PGDH* gene of cucumber was successfully isolated after three rounds of amplification. The final result demonstrated that the modified of TAIL-PCR was an instant and efficient method to clone the flanking sequences from known region.

Key words: Thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR); *6-phosphogluconate dehydrogenase* (*6PGDH*); *Cucumis sativus* L.; upstream sequence

收稿日期: 2011–03–07

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30830079); 教育部“111”项目 (B08025)

作者简介: 魏跃 (1970–), 男, 湖北黄石人, 博士, 副教授, 主要从事园艺植物遗传育种研究。E-mail: weiyue12170059@gmail.com; Tel: 13645294835

* 通讯作者, 陈劲枫, E-mail: jfchen@njau.edu.cn; Tel: 025–84396279

在基因组研究中常常需要克隆与已知区域相邻的序列,如克隆已知基因的启动子序列,或将小段的分子标记区域扩增以转化成为稳定可靠的 SCAR 标记等。目前克隆相邻序列的方法主要有二类:一类是将限制性内切酶和 PCR 扩增技术结合使用如反向 PCR 技术(Inverse PCR)^[1]和接头介导 PCR 技术(ligation-mediated PCR)^[2]等,另一类是仅使用 PCR 扩增如常规 PCR 技术^[3]和热不对称交错 PCR(thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR)^[4]等。TAIL-PCR 最早是由 Liu 和 Whittier^[4]提出,是上述仅使用 PCR 扩增类中使用最普遍的方法,具有简单易行、灵敏性和特异性高等优点,应用该技术 Liu 和 Whittier 成功从 P1、YAC 和 BAC 克隆中获得了插入末端的 DNA 序列^[4]和拟南芥的 T-DNA 侧翼序列^[5]。在 Liu 等^[4,5]最初研究中克隆对象的基因组都相对较小,而如今研究对象的基因组往往要复杂和庞大得多,如黄瓜基因组大小是拟南芥 3 倍多,为 367 Mb^[6],为在较大且复杂的基因组中更好地使用热不对称交错 PCR 技术,对 Liu 和 Whittier^[4]最初的 TAIL-PCR 方法进行了一些改进就显得十分必要。

作者曾对黄瓜 *6PGDH* 基因(GenBank accession no.:FJ610345)进行了克隆并获得成功,本研究在 Liu 最初的 TAIL-PCR 方法^[4]基础上进行了一些改进,以黄瓜栽培品种‘北京截头’基因组为模板对黄瓜 *6PGDH* 的上游序列进行了克隆,以期达到简单、易行、廉价但能同样有效克隆相邻序列的效果。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以南京农业大学黄瓜课题组提供的黄瓜栽培品种‘北京截头’(*C. sativus* L. ‘BeijingJietou’)为试验材料。幼苗 2~3 片真叶时取嫩叶,于液氮中速冻保存用于 DNA 提取。DNA 提取采用 CTAB (cetlytrimethylammonium bromide)法^[7]。

pMD19-T Vector 载体和 *Taq* 酶均为 TaKaRa 公司产品,DNA 纯化试剂盒和宿主菌大肠杆菌 TOP₁₀购自天根公司。

1.2 热不对称交错 PCR(TAIL-PCR)

1.2.1 引物设计

根据已知黄瓜 *6PGDH* 的基因组序列在其 3’端区域利用 Primer 5.0 软件设计 3 条特异嵌套引物(Specific Primer, SP)作为下游引物:6PGD-A1:5’-AGTGCTCAGACAAGGCAGCAATG-3’ T_m = 64℃;

6PGD-A2: 5’-GAGGGAGATTACCTTCGT-TATGG-3’ T_m = 59.2℃和

6PGD-A3: 5’-AGCGATGTTGAGGGCGAG-GTTTT-3’ T_m = 68.2℃,其中 T_m(melting temperature)溶点温度是根据 Mazers 等^[8]方法计算,3 条特异引物在 DNA 序列中的相应的位置见图 2,在 PCR 反应中的 Ta(annealing temperature)退火温度没有按照原方法^[4]中比 T_m 高出 1℃~5℃进行设置,而是根据 Primer 5.0 软件计算结果将在第 1 次 PCR 反应中 6PGD-A1 的退火温度设置为 54.3℃,第 2 次 PCR 反应中 6PGD-A2 的退火温度为 52.7℃,第 3 次 PCR 反应中 6PGD-A3 的退火温度为 55.1℃(表 2)。

以黄瓜 *6PGDH* 基因 DNA 序列为模板,通过 Primer 5.0 软件进行预测从 10 bp RAPD 随机引物群中挑选合适引物作为随机上游引物,淘汰 3’末端有连续 3 个以上的核苷酸能与模板配对,或与 3 条特异嵌套引物中任一条能够形成稳定二聚体的 RAPD 引物,最后选择 AQ-20, AQ-18, AQ-15, AQ-03, AP-07, AW-05(表 1)分别为随机上游引物进行 TAIL-PCR。由于 RAPD 引物只有 10 bp 比原方法中 16 bp 简并引物要短的多,所以相应的低严谨(low-stringency)反应中退火温度调整为 38℃,而不是原方法中的 44℃^[4]。

1.2.2 TAIL-PCR 的反应体系与程序

PCR 反应体系设为 50 μL,取 30~50 ng 总

表 1 TAIL-PCR 中的 RAPD 引物序列

Table 1 The sequence of the random primers used in TAIL-PCR

引物	序列(5’-3’)	在图 1 中的相应泳道
AQ-20	GTGAACGCTC	Lane 1
AQ-18	GGGAGCGAGT	Lane 2
AQ-15	TGCGATCCGA	Lane 3
AQ-03	GAGGTGCTCTG	Lane 4
AP-07	ACCACCCGCT	Lane 5
AW-05	CTGCTTCGAG	Lane 6

DNA,SP 特异引物 0.2 μM、RAPD 引物 2 μM, dNTP each 为 0.2 mM,Taq 酶为 2 U 和 1 × *Taq* polymerase buffer,在 TaKaRa PCR 仪上进行扩增反应。以 6PGD-A1 分别与表 1 中的某一 RAPD 引物配对进行第 1 次 PCR 扩增,为简化程序去除了原方法中第 1 次 PCR 中的步骤 3 梯度(ramping)循环,并将原步骤 4 中 10 个低严谨循环数减少至 1 个,原步骤 5 的热不对称交替循环数从 10 个增加至 15 个。从 PCR 产物中取 1 μL 反应液不经稀释直接做第 2 次 PCR 反应的模板,以 6PGD-A2 和相同的 RAPD 引物进行第 2 次 PCR 扩增,同样将热不对称交替循环数从 10 个增加至 15 个,取 1 μL 反应液做模板以 6PGD-A3 和相同的 RAPD 引物第 3 次 PCR 扩增反应。为扩大

特异目的条带减少非目的条带,在第 3 次 PCR 中继续使用 25 个循环的热不对称反应。TAIL-PCR 反应具体程序见表 2。

1.3 DNA 序列测定与分析

回收的目的片段连接到 pMD19-T Vector 载体上,连接产物转化感受态大肠杆菌 TOP₁₀,进行蓝白斑筛选,挑取白斑接种于 1 mL LB (含 100 mg·L⁻¹ 氨苄青霉素)液体培养基中。温度 37℃ 振荡频率 150 r·min⁻¹ 培养过夜。在相同条件下进行 PCR 扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳检测插入片段的大小,测序由上海生工生物技术公司完成。利用 DNAMAN 软件将测序结果与已知黄瓜 6PGDH 基因进行序列比对与分析。

表 2 TAIL-PCR 的反应程序

Table 2 Reaction parameters for the TAIL-PCR

引物组合			
第 1 轮 PCR (RAPD primer/ PGD-A1)	1	1	94℃ 5 min
	2	5	94℃ 30 s; 54.3℃ 1 min ; 72℃ 2.5 min
	3	1	94℃ 30 s; 38℃ 1 min; 72℃ 2.5 min
	4	15	94℃ 30 s; 54.3℃ 1 min ; 72℃ 2.5 min; 94℃ 30 s; 54.3℃ 1 min ; 72℃ 2.5 min; 94℃ 30 s; 38℃ 1 min; 72℃ 2.5 min
第 2 轮 PCR (RAPDprimer/6PGD-A2)	5	1	72℃ 10 min
	6	15	94℃ 30 s ; 52.7℃ 1 min; 72℃ 2.5 min; 94℃ 30 s ;
	7	1	52.7℃ 1 min; 72℃ 2.5 min; 94℃ 30 s ; 38℃ 1 min; 72℃ 2.5 min
第 3 轮 PCR (RAPD primer/ PGD-A3)	8	25	72℃ 10 min
	9	1	94℃ 30 s ; 55.1℃ 1 min; 72℃ 2.5 min; 94℃ 30 s; 55.1℃ 1min; 72℃ 2.5 min; 94℃ 30 s ; 38℃ 1 min; 72℃ 2.5 min 72℃ 10 min

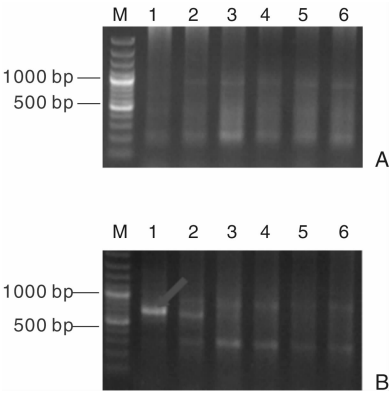
2 结果与分析

在 Liu and Whittier^[4] 试验中,通过比较第 2 次和第 3 次 PCR 扩增片断长度差异是否符合设计引物之间距离来鉴别目的条带,在本试验中所有第 2 次 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳中都为弥散带(图 1-A),只有第 3 次 PCR 产物中第 1 泳道出现一条比较明显长度为 600 ~ 700 bp 的条带(图 1-B),该扩增片断是以 AQ-20 和 6PGD-A3 为配对引物而扩增的,测序结果显示条带长度为 668 bp,DNAMAN 序列比对分析结果显示该条带 3' 端 151 bp 长度的碱基序列与已知黄瓜 6PGDH

的 5' 端序列完全相同(图 2),从而证实了该条带为目的条带,克隆序列为黄瓜 6PGDH 的 5' 端上游序列,从而最终获得了位于起始密码子 ATG 上游长度为 517 bp 的新序列(图 2)。

3 讨论

较早克隆与已知片断相邻的未知序列的方法是基因组文库筛选法,通过构建基因组文库然后用特异基因片段做探针杂交,筛选出含有目的启动子的克隆^[9],但由于该方法需要构建文库及需要使用同位素标记的探针,操作复杂、费用高且有一定的危害性而较少应用。随着分子生物



A. 第 2 次 PCR 产物; B. 第 3 次 PCR 产物
第 1~6 泳道使用的随机引物分别为 AQ-20, AQ-18, AQ-15, AQ-03, AP-07 和 AW-05。图 1-B 中第 1 泳道箭头所示条带为引物 AQ-20/6PGD-A3 第 3 次 PCR 反应产物。M 为 3,000 bp Marker。

图 1 第 2 次和第 3 次 PCR 产物的琼脂糖凝胶图像
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the secondary PCR and tertiary PCR products.



注:起始密码子 ATG 用黑色背景显示;4 个箭头分别表示 3 条特异引物和随机引物 AQ-20;引物 AQ-20 和 6PGD-A3 之间为 PCR 扩增获得的序列,其中与已知 6PGDH 基因相重叠的序列用下划线表示。

图 2 序列分析
Fig.2 The analysis of sequences

学技术的发展,反向 PCR 技术 (Inverse PCR)^[1] 和接头介导 PCR 技术 (ligation-mediated PCR)^[2,10] 逐渐得到了较为广泛的应用,该类方法将基因组 DNA 进行酶切后再进行 PCR 扩增。但此类方法往往具有以下缺点:(1)在 PCR 扩增反应前由于序列未知,合适的酶切效果需要从多个限制性内切酶的酶切结果中进行比较和筛选,酶切和连接效果对易受 DNA 模板和限制性内切酶

浓度及反应时间、温度等外界条件的影响,试验往往对 DNA 提取质量要求较高。(2)连接反应可在酶切后 DNA 条带的两端进行,常常导致非特异片断的产生和目的片断含量的减少从而降低了反应效率。Liu 和 Whittier^[4] 提出的热不对称交错 PCR 是一类只使用 PCR 扩增技术的方法,其基本原理是利用目标序列旁的已知序列设计嵌套的特异性引物,用它们分别和具有低 T_m 值的 16 bp 随机简并引物相组合,以基因组 DNA 作为模板,根据引物的长短和特异性的差异设计不对称的退火温度,通过不同严谨扩增反应的交替进行来最大化地扩增出目的产物和减少非目的产物。该方法不需要酶切和连接反应,对 DNA 模板质量要求也不很高,具有简单、灵敏和特异性高等优点,具体表现为:(1)简单易行。在 PCR 扩增之前不需要酶切和连接,对 DNA 质量要求一般,常规提取方法如 CTAB 法就可达到要求,目的条带可在简易的琼脂糖胶上进行分析鉴定。(2)特异性高。相对其他染色体步行方法,其非目的条带较少,特异性条带含量高,反应产物可直接进行测序或作为杂交探针。(3)快捷。整个 TAIL-PCR 反应只需要几小时内,对大批量样品试验可在很短时间内完成。所以该方法在分子生物学研究中得到了广泛应用,在植物基因克隆方面取得了很多成果^[11-14],成为非常实用的染色体步行技术。

本试验在前人研究基础上,对 Liu 和 Whittier 最初的 TAIL-PCR 方法采取了一些不同措施和改进,主要有:(1)在原方法中使用了多条 16 bp 长度的简并引物作为随机引物,引物较高简并性会导致非特异性目的条带的增加,容易与特异引物形成二聚体,而降低简并性又会减少成功几率。为此我们在本试验中使用广泛性高、价格较为低廉的 RAPD 引物为随机引物。为克服盲目性、减少工作量和提高效率,在 PCR 扩增反应前运用 Primer 5.0 软件以 6PGDH 基因为模板从 RAPD 引物库中进行筛选,淘汰 3' 末端有 3 个以上连续碱基能与模板互补配对或者能够与 3 条特异引物中任意一条形成二聚体的引物,结果从挑选出的 6 个 RAPD 引物中就得到了目的条带,表明 PCR 扩增之前进行引物筛选和预测能够提高效率、减少盲目性和工作量。(2)在 PCR 扩增反应

中,退火温度是十分重要而又需要保持平衡,过高会提高反应特异性但降低灵敏度,过低则相反。在最初的 TAIL-PCR 方法中,高严谨和低严谨反应的退火温度分别为 63℃ 和 44℃,本试验由于使用了 10 bp 较短引物和与原方法中不同的特异引物,因此退火温度根据 Primer 5.0 计算结果重新设定进行了优化。(3)原方法中第 3 次 PCR 中没有热不对称交替循环程序,本试验中为进一步提高特异目的条带和减少非目的条带,在第 3 轮 PCR 继续运用了 25 个热不对称交替循环。

克隆基因的启动子序列必须至少得到起始密码子上游 2 kb 以上长度的序列^[15,16],而本试验获得目的条带长度相对较短,因此不能将其作为启动子序列进行相关分析。如需克隆启动子序列,还需继续对其上游进行延伸克隆再将各分段进行拼接。没有获得较长的序列可能与使用普通 *Taq* 酶有关,也表明可能在特异引物设计、随机 RAPD 引物选择和反应程序设置等方面还有待进一步改进。

参考文献:

- [1] Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction[J]. *Genetics*, 1988, 120: 621 - 623.
- [2] Balavoine G. Identification of members of several homeobox genes in a planarian using a ligation-mediated polymerase chain reaction technique[J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 1547 - 1553.
- [3] 王海燕, 林俊芳, 柳永, 等. 灰树花 *gpd-GF* 启动子的克隆与表达载体构建[J]. 热带作物学报, 2005, 26(4): 57 - 63.
- [4] Liu YG, Whittier RF. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking[J]. *Genomics*, 1995, 25: 674 - 681.
- [5] Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, et al. Efficient isolation and

mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR[J]. *Plant J*, 1995, 8: 457 - 463.

- [6] Koo Dal-Hoe, Choi Hae-Woon, Cho Jeongki, et al. A high-resolution karyotype of cucumber (*Cucumis sativus* L. 'Winter Long') revealed by C-banding, pachytene analysis, and RAPD-aided fluorescence in situ hybridization[J]. *Genome*, 2005, 48(3): 534 - 540.
- [7] Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8(19): 4321 - 4326.
- [8] Mazers GR, Moyret C, Jeanteur P, et al. Direct sequencing by thermal asymmetric PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19: 4783.
- [9] Rinehart JA, Petersen MW, John ME. Tissue-specific and developmental regulation of cotton gene *FbL2A* [J]. *Plant Physiology*, 1996, 112: 1331 - 1334.
- [10] Zhang XH, Chiang VL. Single-stranded DNA ligation by T4 RNA ligase for PCR cloning of 5'-noncoding fragments and coding sequence of a specific gene[J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 990 - 991.
- [11] Terauchi R, KahI G. Rapid isolation of promoter sequences by TAIL-PCR: the 5'-flanking regions of *Pal* and *Pgi* genes from yams (*Dioscorea*) [J]. *Mol Gen Genet*, 2000, 263: 554 - 560.
- [12] 韩兆雪, 吴芳, 赵桃, 等. 青稞 B 组醇溶蛋白基因 5' 上游调控区的 TAIL-PCR 克隆及序列分析[J]. 麦类作物学报, 2007, 27(4): 613 - 618.
- [13] 陈军营, 孙佩, 王德勤, 等. 一种改良的克隆小麦 *GLP3* 基因启动子的 TAIL-PCR 技术[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(4): 754 - 758.
- [14] 宋达峰, 韩凝, 边红武, 等. 用改良 TAIL-PCR 技术分析转基因烟草 *chf1* 基因插入区的侧翼序列[J]. 作物学报, 2005, 31(10): 1377 - 1379.
- [15] Joshi CP. An inspection of the domain between putative TA-TA box and translation start site in 79 plant genes[J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(16): 6643 - 6653.
- [16] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(1): 297 - 300.

(责任编辑 苗立祥)