

## 小金海棠*MxYLS5*启动子克隆技术的比较

陈竹, 王忆, 殷丽丽, 张新忠, 韩振海\*

中国农业大学园艺植物研究所, 北京100193

**摘要:** 分别利用3种基于PCR技术的染色体步移法克隆了小金海棠*MxYLS5*基因的启动子, 并比较了这三个体系的扩增产物。3种体系都可以获得特异性扩增产物, 但扩增条带的长度和数量均不同, 其中利用Genome Walking Kit扩增出来的条带特异性较好长度最长, 而且特异性引物和简并引物的设计及退火温度的设置对3种体系的扩增产物起着关键的作用。基于PCR技术的染色体步移法为小金海棠*MxYLS5*基因启动子的克隆提供了一个稳定可靠的技术手段。

**关键词:** 启动子克隆; 染色体步移; Tail-PCR; hiTail-PCR; 小金海棠

## Comparison of *MxYLS5* Promoter Cloning Technology from *Malus xiaojinensis*

CHEN Zhu, WANG Yi, YIN Li-Li, ZHANG Xin-Zhong, HAN Zhen-Hai\*

Institute for Horticultural Plants, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** Three genomic walking methods based on PCR were used to clone the promoter of *MxYLS5* from *Malus xiaojinensis*. And we compared the amplification products of these three systems. All these systems can obtain specific amplification products, but the length and numbers of bands are different. Amplified bands applied Genome Walking Kit have better specificity and longer length. And specific primers, degenerate primers and annealing temperature play a key role in amplification products. These three systems provide a stable and reliable technological means for promoter cloning of *MxYLS5* from *Malus xiaojinensis*.

**Key words:** promoter cloning; genomic walking; Tail-PCR; hiTail-PCR; *Malus xiaojinensis*

随着高通量测序技术的发展,一些模式物种全基因组序列的获得为研究提供了极大的便利。但目前为止,绝大多数物种的基因组序列仍然未知,因此,染色体步移(genomic walking)技术在现代分子生物学的研究中仍发挥着重要的作用。染色体步移是指由生物基因组或基因组文库中的已知序列出发,逐步探知其旁邻的未知序列或与已知序列呈线性关系的目标序列(王阅霞等2006)。目前,分离侧翼序列的染色体步移法主要有两种,一种是结合基因组文库为主要手段,另一种是基于PCR扩增为主要手段。随着PCR技术的日益成熟,基于PCR技术扩增未知序列的染色体步移法被广泛应用,这些方法依其原理可分为3类:反向PCR(Ochman等1988; Triglia等1988)、连接法介导的PCR(Mueller和Wold 1989; Riley等1990; Rosenthal和Jones 1990; Jones和Winistorfer 1992)以及特殊引物PCR(Liu等1995; Antal等2004; Jiang等2007)。反向PCR是最早应用于染色体步移的一种方法,但该方法操作繁琐,并受酶切位点、连接效率等的影响,往往不易得到理想结果。连接PCR扩增长度

往往比较短,对启动子等长片段的克隆则需要多次实验。特殊引物PCR是较理想的染色体步移技术,它具有步骤简单,步行距离长,而且扩增特异性高等优点,其中以刘耀光等设计的Tail-PCR、hi-Tail-PCR及其改进方法较为出众(Liu和Whittier 1995; Liu等1995; Liu和Chen 2007),这些方法都是基于单纯的PCR技术,简单高效,灵敏度高,减少了实验过程中人为影响,且近年来通过对非特异性引物的不断改进,该方法在克隆未知序列方面有很大的应用前景。

本文对3种不同Tail-PCR方法进行了比较,并讨论了不同引物及不同退火温度对扩增产物的影响,以建立一个高效稳定的克隆苹果属植物小金海棠基因启动子的染色体步移技术体系。

收稿 2011-09-26 修定 2011-12-05

资助 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-28)、北京市科技新星课题(2008B74)和果树逆境生理与分子生物学北京市重点实验室资金。

\* 通讯作者(E-mail: rschan@cau.edu.cn; Tel: 010-62732467)。

## 材料与方法

### 1 植物材料

小金海棠(*Malus xiaojinensis* M. H. Cheng et N. G. Jiang)组培苗在生长培养基中生长到茎木质化后转接至生根培养基,待长出白色新生根后转移到1/2营养液练苗1个月后,移入完全营养液中进行水培,幼苗营养液初始pH值用NaOH调至6.0,每周更换一次营养液,每天定时通气,16 h光照,光量子通量密度 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,温度为白天( $25\pm 2$ ) °C,夜间( $17\pm 2$ ) °C。

### 2 引物设计

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,引物序列见表1。

### 3 载体和菌株

大肠杆菌(*E. coli*) DH5 $\alpha$ 由本试验室保存;克隆载体pEASY-T Vector购自北京全式金生物有限公司。

### 4 工具酶和试剂

LA *Taq* DNA聚合酶、LA PCR缓冲液、dNTP购于TaKaRa公司;DNA凝胶回收试剂盒购于北京博大泰克公司;DL2000/1 kb DNA Marker购于北京Mylab公司;IPTG、X-gal、卡那霉素及小量质粒

提取试剂盒购自上海生工生物有限公司;蔗糖、酵母提取物、胰蛋白胨等培养基成分购自北京鼎国生物技术有限公司;测序工作由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。

### 5 Tail-PCR (thermal asymmetric interlaced PCR) 反应

根据刘耀光的Tail-PCR反应体系(Liu和Whittier 1995),并略作改进,Tail-PCR反应液成分见表2。设计简并引物AD1~7及根据*MxYSL5*基因已知序列设计特异引物MY5-SP1、MY5-SP2、MY5-SP3。以小金海棠基因组DNA为模板,MY5-SP1与简并引物AD1~7分别配对,进行第1轮PCR反应,反应液组分见表2。混匀后进行PCR,程序如下:92 °C热启动3 min;95 °C预变性1 min;94 °C变性30 s,65 °C退火1 min;72 °C延伸2 min,10个循环;94 °C变性30 s,25 °C退火3 min,以 $0.5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ 的速度升温至72 °C,延伸2 min;94 °C变性30 s,29 °C退火1 min,72 °C延伸2 min,5个循环;94 °C变性30 s,58 °C退火1 min,72 °C延伸2 min,94 °C变性30 s,58 °C退火1 min,72 °C延伸2 min,94 °C变性30 s,29 °C退火1 min,72 °C延伸2 min,12个循环;72 °C延伸5 min。将第1轮PCR产物稀释100倍,以此作为模板,以MY5-SP2和AD1~7分别配对,进行第2轮扩增。反

表1 引物名称及序列

Table 1 Primer names and sequences

引物名称	引物序列
AD1	5'-TGWGNAGWANCASAGA-3'
AD2	5'-AGWGNAGWANCAWAGG-3'
AD3	5'-CAWCGICNGAIASGAA-3'
AD4	5'-TCSTICGNACITWGGA-3'
AD5	5'-NTCGASTWTSWGTT-3'
AD6	5'-GTCGASWGANAWGAA-3'
AD7	5'-WGTGNAGWANCANAGA-3'
LAD1	5'-ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCNVNNGGAA-3'
LAD2	5'-ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBNBNNNGGTT-3'
LAD3	5'-ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBDNBNNNCGGT-3'
LAD4	5'-ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVVNNGGCAA-3'
LAD5	5'-ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCHNNGGAC-3'
MY5-SP1	5'-GCGTTCGCTCATTCCAAACAGAT-3'
MY5-SP2	5'-CCAAGAGACCCGACAGACG-3'
MY5-SP3	5'-TGTCATAGTCTGGTGCTGGGAAT-3'
MY5-T-3RD SP2	5'-CCGCTTCTTTCCACTGGCTTG-3'
MY5-T-3RD SP3	5'-GAGGTGGGAAAGGAAAGGATTAG-3'
AC1	5'-ACGATGGACTCCAGAG-3'
YSL5SP2-LONG	5'-ACGATGGACTCCAGAGTCCGCGCCGAACGTGAGCTGCTCCCGCCAT-3'

表2 Tail-PCR反应组分

Table 2 Reaction components of Tail-PCR

反应成分	第1轮反应用量/ $\mu\text{L}$	第2轮反应用量/ $\mu\text{L}$	第3轮反应用量/ $\mu\text{L}$
模板	0.5	1.0	1.0
dNTP预混物(各 $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	8.0	8.0	8.0
$10\times\text{LA PCR}$ 缓冲液II (加入 $\text{Mg}^{2+}$ )	5.0	5.0	5.0
TaKaRa LA <i>Taq</i> ( $5 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )	0.5	0.5	0.5
AD1~7引物( $100 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )	1.0	1.0	1.0
SP引物( $10 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )	1.0	1.0	1.0
水	34.0	33.5	33.5

应液组分见表2, 混匀后进行PCR, 程序如下:  $94\text{ }^\circ\text{C}$  变性30 s,  $60\text{ }^\circ\text{C}$ 或 $64\text{ }^\circ\text{C}$ 退火1 min,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸2 min,  $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性30 s,  $60\text{ }^\circ\text{C}$ 或 $64\text{ }^\circ\text{C}$ 退火1 min,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸2 min,  $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性30 s,  $29\text{ }^\circ\text{C}$ 退火1 min,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸2 min, 10个循环;  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸5 min。将第2轮PCR产物稀释100倍, 以此作为模板, 以MY5-SP3与AD1~7分别配对, 进行第3轮扩增。反应液组分见表2, 混匀后进行PCR, 程序如下:  $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性30 s,  $60\text{ }^\circ\text{C}$ 或 $64\text{ }^\circ\text{C}$ 退火1 min,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸2 min,  $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性30 s,  $60\text{ }^\circ\text{C}$ 或 $64\text{ }^\circ\text{C}$ 退火1 min,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸2 min,  $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性30 s,  $29\text{ }^\circ\text{C}$ 退火1 min,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸2 min, 10个循环;  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸5 min。反应结束后, 分别取第1次、第2次和第3次PCR反应产物各 $5\text{ }\mu\text{L}$ , 用1%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

## 6 hiTail-PCR (high-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR)反应

根据刘耀光的hiTail-PCR程序(Liu和Chen 2007)略作改进, hiTail-PCR反应液成分见表3。设计简并引物LAD1~5, 以小金海棠基因组DNA为模板, MY5-SP1与简并引物LAD1~5分别配对, 进行第1轮PCR反应。反应液组分见表3, 混匀后进行PCR, 程序如下:  $93\text{ }^\circ\text{C}$ 热启动2 min;  $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性1

min;  $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性30 s,  $60\text{ }^\circ\text{C}$ 退火1 min;  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸3 min, 10个循环;  $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性30 s,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ 退火2 min, 以 $0.5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ 的速度升温至 $72\text{ }^\circ\text{C}$ , 延伸3 min;  $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性20 s,  $58\text{ }^\circ\text{C}$ 退火1 min,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸3 min, 25个循环;  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸5 min。将第1轮PCR反应产物稀释40倍, 以此为模板, 引物YSL5SP2-LONG与AC1配对, 进行第2轮PCR反应。反应液组分见表3, 混匀后进行PCR, 程序如下:  $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性20 s,  $65\text{ }^\circ\text{C}$ 退火1 min,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸3 min, 2个循环;  $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性20 s,  $68\text{ }^\circ\text{C}$ 或 $66\text{ }^\circ\text{C}$ 退火1 min,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸3 min,  $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性20 s,  $50\text{ }^\circ\text{C}$ 退火1 min,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸3 min, 13个循环;  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸5 min。将第2轮PCR反应产物稀释10倍, 并以此为模板, 引物MY5-SP3与AC1配对, 进行第3轮PCR反应。反应液组分见表3, 混匀后进行PCR, 程序如下:  $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性20 s,  $68\text{ }^\circ\text{C}$ 退火1 min,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸3 min,  $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性20 s,  $68\text{ }^\circ\text{C}$ 退火1 min,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸3 min,  $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性20 s,  $50\text{ }^\circ\text{C}$ 退火1 min,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸3 min, 6~7个循环;  $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸5 min。反应结束后, 分别取第1次、第2次和第3次PCR反应产物各 $5\text{ }\mu\text{L}$ , 用1%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

## 7 Genome Walking Kit反应

以小金海棠基因组DNA为模板, 以TaKaRa公

表3 hiTail-PCR反应组分

Table 3 Reaction components of hiTail-PCR

反应成分	第1轮反应用量/ $\mu\text{L}$	第2轮反应用量/ $\mu\text{L}$	第3轮反应用量/ $\mu\text{L}$
模板	1.0	1.0	1.0
dNTP预混物(各 $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	4.0	4.0	8.0
$10\times\text{LA PCR}$ 缓冲液II (加入 $\text{Mg}^{2+}$ )	2.0	2.5	5.0
TaKaRa LA <i>Taq</i> ( $5 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )	0.5	0.6	0.5
AD引物( $100 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )	1.0	0.3	0.6
SP引物( $10 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )	0.3	0.3	0.6
水	11.2	16.3	34.3

司Genome Walking Kit里的简并引物AP1~4为上游引物, MY5-SP1为下游引物, 进行第1轮PCR反应。反应液组分见表4, 混匀后进行PCR, 程序如下: 94 °C热启动1 min; 98 °C预变性1 min; 94 °C变性30 s, 65 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min, 5个循环; 94 °C变性30 s, 25 °C退火3 min; 72 °C延伸2 min; 94 °C变性30 s, 65 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min, 94 °C变性30 s, 65 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min, 94 °C变性30 s, 44 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min, 15个循环; 72 °C延伸10 min。将第1轮PCR产物稀释100倍, 以此作为模板, 以MY5-SP2和AP1~4为引物, 进行第2轮扩增。反应液组分见表4, 混匀后进行PCR, 程序如下: 94 °C变性30 s, 64 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min, 94 °C变性30 s, 64 °C退火1 min, 72 °C延伸2

min, 94 °C变性30 s, 44 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min, 15个循环; 72 °C延伸10 min。第2轮PCR产物稀释100倍, 以此作为模板, 以MY5-SP3和AP1~4为引物, 进行第3轮扩增。反应液组分见表4, 混匀后进行PCR, 程序如下: 94 °C变性30 s, 60 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min, 94 °C变性30 s, 60 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min, 94 °C变性30 s, 44 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min, 15个循环; 72 °C延伸10 min。同时, 分别以AP1~4作为4个简并引物, MY5-SP3、MY5-T-3RD SP2、MY5-T-3RD SP3分别为1~3轮PCR反应的特异引物, 进行3轮PCR反应, 反应液组分见表4, 反应程序同上述1~3轮的反应程序。反应结束后, 分别取第1次、第2次、第3次PCR反应液各5 μL, 用1%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

表4 Genome Walking Kit的PCR反应组分

Table 4 PCR reaction components of Genome Walking Kit

反应成分	第1轮反应用量/μL	第2轮反应用量/μL	第3轮反应用量/μL
模板	0.5	1.0	1.0
dNTP预混物(各2.5 mmol·L <sup>-1</sup> )	8.0	8.0	8.0
10×LA PCR缓冲液II (加入Mg <sup>2+</sup> )	5.0	5.0	5.0
TaKaRa LA <i>Taq</i> (5 U·μL <sup>-1</sup> )	0.5	0.5	0.5
AD引物(100 pmol·μL <sup>-1</sup> )	1.0	1.0	1.0
SP引物(10 pmol·μL <sup>-1</sup> )	1.0	1.0	1.0
水	加到50.0	加到50.0	加到50.0

## 实验结果

### 1 Tail-PCR扩增结果

Tail-PCR扩增结果如图1所示。将图1-B中5、6、11、12泳道的扩增产物用胶回收试剂盒进行回收纯化, 并连接到T载体上, 挑取阳性克隆经测序共得到5条条带, 条带长度在200~600 bp之间, 将这5条序列与*MxYSL5*启动子序列比对(陈竹等2010; 刘丽丽2008), 其中引物AD6扩增所获得的517 bp条带为特异性扩增产物, 序列为+129 bp至-388 bp。从不同退火温度的扩增产物间比较可以看出, 退火温度仅影响了扩增产物的浓度, 但没有定性影响PCR产物。

### 2 hiTail-PCR扩增结果

hiTail-PCR扩增结果如图2所示。将图2-B中2~7泳道的扩增产物用胶回收试剂盒进行回收纯化, 并连接到T载体上, 挑取阳性克隆经测序共得

到9条条带, 条带长度在200~750 bp之间, 将这9条序列与*MxYSL5*启动子序列比对(陈竹等2010; 刘丽丽2008), 其中引物LAD1所获得的490 bp及LAD3扩增所获得的475 bp条带为特异性扩增产物, 序列分别为+129 bp至-361 bp、+129 bp至-346 bp。

### 3 Genome Walking Kit扩增结果

扩增结果如图3所示。将图3-B中AP1~AP4泳道的扩增产物连接到T载体上经测序共得到7条750~2 500 bp的扩增条带, 将这7条序列与*MxYSL5*启动子序列比对(陈竹等2010; 刘丽丽2008), 其中由AP1扩增所获得的1 020 bp条带及AP2扩增所获得的851 bp条带为特异性扩增产物, 序列分别为+129 bp至-891 bp、+129 bp至-722 bp。将图3-C中的扩增产物用胶回收试剂盒进行回收纯化, 并连接到T载体上, 挑取阳性克隆经测序共得到8条扩增条带, 长度在100~2 000 bp之间, 但均为非特异性扩增产物。

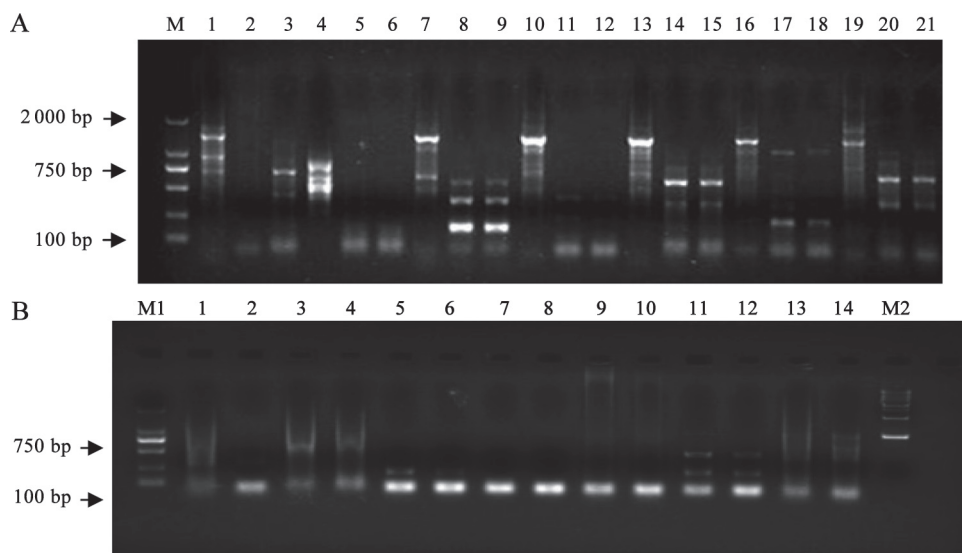


图1 Tail-PCR扩增结果

Fig.1 Tail-PCR results

A为第1、2轮Tail-PCR的扩增产物电泳图, 1~21每3个一组, 共7组, 每组依次为简并引物AD1~7的扩增产物, 每组的3个泳道依次为第1轮扩增产物(特异引物为SP1)、第2轮扩增产物(特异引物为SP2, 退火温度为60 °C)、第2轮扩增产物(特异引物为SP2, 退火温度为64 °C); M: DL2000 DNA Marker。B为第3轮Tail-PCR的扩增产物电泳图, 每2个一组, 共7组, 每组依次为AD1~7的扩增产物, 每组的2个泳道分别为60 °C退火温度及64 °C退火温度的扩增产物; M1: DL2000 DNA Marker; M2: 1 kb DNA Marker。

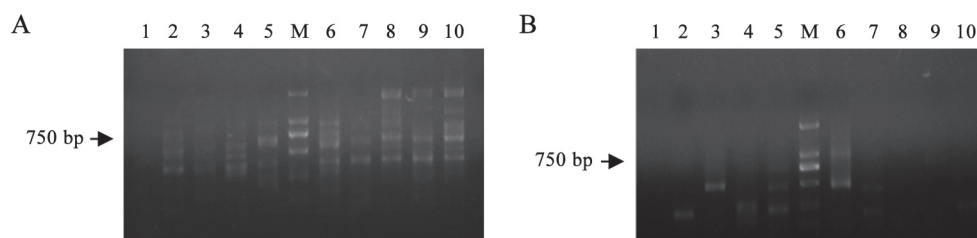


图2 hiTail-PCR扩增结果

Fig.2 hiTail-PCR results

A为第2轮hiTail-PCR的扩增产物电泳图(特异引物为YSL5SP2-LONG), 1~5依次为以第一轮5种产物(简并引物为LAD1~5)为模板的扩增结果, 退火温度为66 °C, 6~10依次为以第一轮5种产物(简并引物为LAD1~5)为模板的扩增结果, 退火温度为68 °C; B为第3轮hiTail-PCR的扩增产物电泳图(特异引物为MY5-SP3), 1~5依次为以第2轮1~5的扩增产物为模板扩增的结果, 6~10依次为以第2轮6~10的扩增产物为模板扩增的结果。M: DL2000 DNA Marker。

## 讨 论

启动子克隆的方法很多, 从常用的启动子探针载体筛选到PCR方法都有应用。由于PCR法简便快捷, 近年来人们较多采用PCR方法克隆启动子, 为克隆启动子提供了更可靠、更合理的方法。苑克俊等(2009)用RS-PCR与Tail-PCR相结合的方法在苹果中克隆到了528 bp的法尼基焦磷酸合酶基因的启动子序列; 文静等(2009)用巢式PCR在小金海棠中扩增得到了2 kb的*MxFRO2*基因启动子序列, 但相对Tail-PCR, 巢式PCR操作难度较

大; Acevedo等(2008)人用改进的染色体步移技术从南极海水细菌中成功克隆到了水解酶基因的全长; Bae和Sohn (2010)用Template-blocking PCR的方法分别从毕赤酵母和青霉菌中成功地克隆到了*PGK1*启动子和青霉菌基因。本文利用了3种基于PCR技术的染色体步移法扩增得到了小金海棠*MxYSL5*基因的启动子, 这3种体系都可以获得特异性扩增产物, 但扩增条带的长度和数量均不同。Tail-PCR获得的产物中条带长度较短且特异性产物数量较少, 本文仅获得一条特异性扩增序列, 长

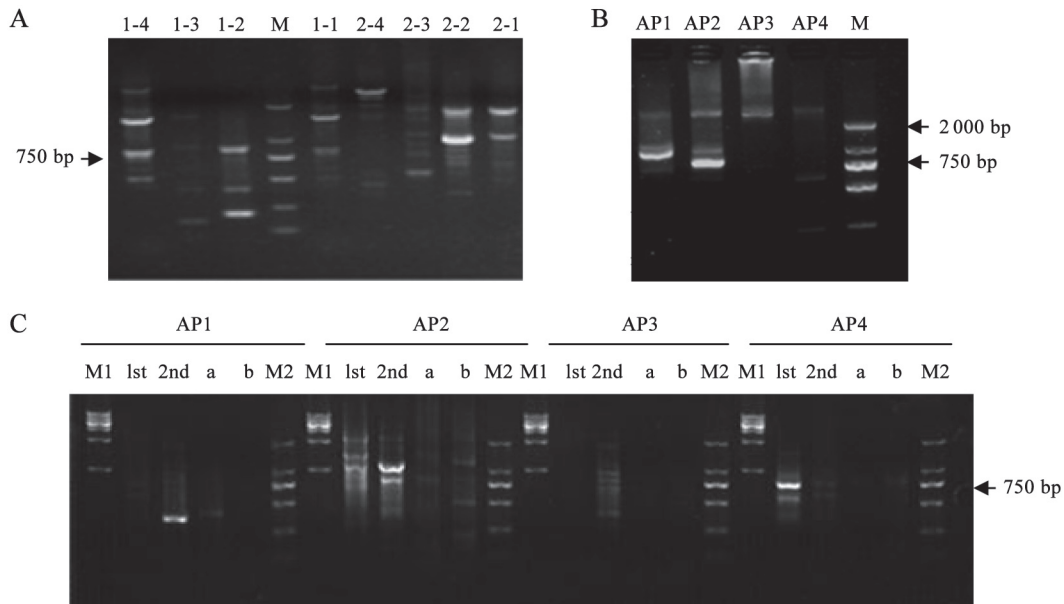


图3 Genome Walking Kit扩增结果

Fig.3 PCR results of Genome Walking Kit

A为简并引物AP1~4与特异引物MY5-SP1、MY5-SP2扩增的第1、2轮产物电泳图, 1-1至1-4依次为MY5-SP1与AP1~4扩增的第1轮产物, 2-1至2-4依次为MY5-SP2与AP1~4扩增的第2轮产物; M: DL2000 DNA Marker。B为特异引物MY5-SP3与AP1~4的第三轮扩增产物电泳图; M: DL2000 DNA Marker。C为分别以AP1~4为简并引物, MY5-SP3、MY5-T-3RD SP2、MY5-T-3RD SP3为特异引物的1~3轮扩增产物电泳图, 其中a、b分别为第三轮反应中不同的退火温度(分别为60 °C和64 °C)扩增的结果; M1: 1 kb DNA Marker; M2: DL2000 DNA Marker。

度为517 bp; 与Tail-PCR相比, hiTail-PCR通过重新设计Tail-PCR中的简并引物, 降低了非特异性扩增, 提高了反应的扩增效率, 得到了两条特异性扩增产物, 但条带的长度与Tail-PCR方法中得到的条带长度相当, 分别为490 bp和475 bp; 与Tail-PCR和hiTail-PCR相比, Genome Walking Kit扩增出来的条带特异性最好且长度最长, 得到了两条特异性扩增产物, 长度分别为1 020 bp和851 bp, 该体系与Tail-PCR方法中所用特异引物一样, 均为MY5-SP1、MY5-SP2和MY5-SP3, 推断该试剂盒主要是通过提高简并引物质量来提高体系稳定性, 从而达到扩增条带长度长、特异性高的目的, 但遗憾的是并未获知其中的简并引物序列, 因此, 简并引物的设计对扩增产物起着很重要的作用, 而且从该体系扩增的两种产物中可以发现, 简并引物相同、特异性引物不同, 扩增出来的产物也不同。Tail-PCR中, 退火温度不同, 扩增出来的条带一样, 但浓度不一样, 而hiTail-PCR中不同退火温度扩增出来的条带不一样。因此, 在所用的这3种基于热不对称交错PCR原理建立起来的体系中, 特异性引

物和简并引物的设计及退火温度的设置对Tail-PCR及其改进技术的成功与否起着关键的作用; 这3种体系为小金海棠*MxYLS5*基因启动子的克隆提供了一套成熟的技术策略。

### 参考文献

- 陈竹, 王忆, 张新忠, 韩德果, 韩振海(2010). 小金海棠类黄色条纹蛋白基因(*MxYLS5*)启动子的克隆与表达. 农业生物技术学报, 18 (6): 1084~1090
- 刘丽丽(2008). 小金海棠*MxYLS5*基因的克隆与功能分析[博士论文]. 北京: 中国农业大学
- 王闰霞, 马欣荣, 王天山, 谭红(2006). 染色体步行PCR技术. 应用与环境生物学报, 12 (3): 427~430
- 文静, 孔瑾, 王忆, 任玲, 许雪峰, 韩振海(2009). 小金海棠 $Fe^{3+}$ -螯合还原酶*MxFRO2*基因启动子的克隆与表达分析. 农业生物技术学报, 17 (1): 114~120
- 苑克俊, 刘庆忠, 艾呈祥, 魏海蓉(2009). 苹果基因邻近未知序列的PCR扩增方法. 农业生物技术学报, 17 (6): 1083~1088
- Acevedo JP, Reyes F, Parra LP, Salazar O, Andrews BA, Asenjo JA (2008). Cloning of complete genes for novel hydrolytic enzymes from Antarctic sea water bacteria by use of an improved genome walking technique. J Biotechnol, 133: 277~286
- Antal Z, Rasclé C, Fevre M, Bruel C (2004). Single oligonucleotide nested PCR: a rapid method for the isolation of genes and their

- flanking regions from expressed sequence tags. *Curr Genet*, 46: 240~246
- Bae JH, Sohn JH (2010). Template-blocking PCR: an advanced PCR technique for genome walking. *Anal Biochem*, 398: 112~116
- Jiang Y, Pei J, Song X, Shao W (2007). Restriction site-dependent PCR: an efficient technique for fast cloning of new genes of microorganisms. *DNA Res*, 14: 283~290
- Jones DH, Winistorfer SC (1992). Sequence specific generation of a DNA panhandle permits PCR amplification of unknown flanking DNA. *Nucleic Acids Res*, 20 (3): 595~600
- Liu YG, Whittier RF (1995). Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, 25: 674~681
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J*, 8: 457~463
- Liu YG, Chen YL (2007). High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. *Biol Techniques*, 43: 649~656
- Mueller PR, Wold B (1989). *In vivo* footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science*, 246: 780~786
- Ochman H, Gerber AS, Hartl DL (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, 120: 621~623
- Riley J, Butler R, Ogilvie D, Finniear R, Jenner D, Powell S, Anand R, Smith JC, Markham AF (1990). A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acids Res*, 18: 2887~2890
- Rosenthal A, Jones DSC (1990). Genomic walking and sequencing by oligo-cassette mediated polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 18 (10): 3095~3096
- Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ (1988). A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res*, 16 (16): 81~86