

技术与方法 Techniques and Methods

基于分子杂交和单分子 PCR 的同源基因克隆技术

陈喜文¹ 刘晓光² 陈德富^{1,*} 陈飞雪¹¹南开大学生命科学学院, 天津 300071; ²内蒙古商学院, 呼和浩特 010010

Homology Cloning Based on Molecular Hybridization and Single Molecular PCR

CHEN Xi-Wen¹, LIU Xiao-Guang², CHEN De-Fu^{1,*}, CHEN Fei-Xue¹¹College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China; ²Inner Mongolian College of Business and Law, Hohhot 010010, China

提要 文章以拟南芥谷胱甘肽-S-转移酶 Zeta 类(GSTZ)基因为饵基因, 建立了一种基于分子杂交和单分子 PCR 的同源基因克隆新方法。获得的 6 个甘蓝型油菜 GSTZ 全长 cDNA 克隆中, 有 5 个与 GenBank 注册序列(AY208158)完全相同。

关键词 同源克隆; 全长 cDNA; 分子杂交; 单分子 PCR; 谷胱甘肽-S-转移酶 Zeta 类

基因克隆技术中代表性的方法主要有: 根据现有基因序列的同源克隆(homology cloning)、根据基因表达产物的功能克隆(functional cloning)(Bogan 等 2003)、根据连锁图谱的定位克隆(positional cloning)或图位克隆(map-based cloning)(Arondel 等 1992)以及根据表型差异的表型克隆(phenotype cloning)(Jonsson和Weissman 1992)。随着基因克隆技术的发展, 克隆的基因数逐年呈指数增长, 但各种方法都各有其局限性, 所以人们总是期待基因克隆技术不断发展和完善。

单分子 PCR (single molecular PCR, SM-PCR) 是 Ohuchi 等(1998)建立起来的一种极端条件下的 PCR 技术, 模板 DNA 低至每反应管仅 1 个或数个分子, 循环数增至 70~80 个, 所以 1 个或数个 DNA 模板分子可增至 μg 级可操作水平。分子杂交技术可将可配对的 2 条单链核酸分子退火形成双链杂合分子, 条件改变后杂合双链可变成 2 条单链。

谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferases, GSTs, EC. 2. 5. 1. 18) Zeta类(GSTZ)是一种多功能酶(Chen 等 2003), 本文以其基因为试验材料, 建立了一种基于分子杂交和单分子 PCR 的同源基因克隆新方法。方法是以拟南芥 GSTZ 基因为饵基因, 将其固定于硝酸纤维素膜上, 与含靶基因的甘蓝型油菜总 cDNA 杂交, 然后以其洗脱液为模板进行单分子 PCR 扩增, 获得了甘蓝型油菜 GSTZ 基因全长 cDNA。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 植物材料 甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)品系‘垦C1’(陕西农垦科研中心李殿荣先生惠赠)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)生态型‘Columbia gll’(本室保存)种植在温度为 25℃、光照 15 h/黑暗 9 h 的人工气候箱中。幼叶至二叶期时, 取其幼叶提取总 RNA, 提取的总 RNA 用 4 mol·L⁻¹ 尿素变性的 1.25% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性(陈德富等 1999)。

1.2 菌株与质粒 大肠杆菌菌株 DH5 α -FT 为本室保存, 载体 pMD-18T 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 试剂与培养基 Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等购自宝生物工程(大连)有限公司, 硝酸纤维素膜购自日本 Toyo 公司, 蓝色葡聚糖 2000 购自 Pharmacia 公司, 引物合成由北京三博远志生物技术有限责任公司完成, 其它试剂均为国产分析纯。

收稿 2006-05-09 修定 2006-08-17

资助 国家自然科学基金(30671183)、天津市自然科学基金(043606711)、教育部留学回国人员科研启动基金(2003-406)和南开大学 2004 年度科技创新基金。

*通讯作者(E-mail: chendefu@nankai.edu.cn, Tel: 022-23500133)。

2 方法

2.1 总 RNA 提取及全长双链 cDNA 扩增 幼叶总 RNA 提取、poly(A)⁺ mRNAs 分离、全长单链 cDNA 合成参见 Chen 等(2003) 方法。扩增全长双链 cDNA 单引物(IIA) 的序列: 5' AAGCAGTGG-TATCAACGCAGAGT 3'。100 μL 扩增体系中含 10 μL 10×Advantage 2 PCR 缓冲液、2 μL 10 mmol·L⁻¹ dNTP、2 μL 10 μmol·L⁻¹ 引物 IIA、4 μL 全长单链 cDNA 及 2 μL 50×Advantage 2 聚合酶混合物(Clontech 公司)。PCR 参数设为 95℃ 预变性 1 min 后进行 20 个三温度循环(95℃ 变性 15 s、65℃ 退火 30 s、68℃ 延伸 6 min)。

2.2 饵基因 DNA 扩增 依据 GenBank 注册的拟南芥 GSTZ 基因序列(AY208155) 设计扩增其开放阅读框的引物对: A-1 (5' ATGGCGAATTCGGCGA 3') 和 A-2 (5' TCAGATGGTGAAGAAGGAGCA 3'), 以拟南芥全长双链 cDNA 为模板, 扩增饵基因 *AtGSTZ*。100 μL 扩增体系中含 10 μL 10×PCR 缓冲液、8 μL 2.5 mmol·L⁻¹ dNTP、3 μL 10 ng·μL⁻¹ 拟南芥 cDNA、1.25 μL 10 μmol·L⁻¹ 引物 A-1、1.25 μL 10 μmol·L⁻¹ 引物 A-2 及 0.5 μL 5 U·μL⁻¹ Taq DNA 聚合酶。PCR 参数设为 94℃ 预变性 5 min 后进行 35 个三温度循环(94℃ 变性 40 s、60℃ 退火 32 s、72℃ 延伸 1.5 min)。然后电泳法回收目的 DNA, 并调整其终浓度至 15 ng·μL⁻¹, 然后分别溶于 TE、无菌水或含 1.5 mol·L⁻¹ NaOH 和 0.5 mol·L⁻¹ NaCl 的变性液中, 沸水浴中保温 5 min 后骤冷。

2.3 印迹膜制作 剪取(2.5~3) mm×(2.5~3) mm 的硝酸纤维素膜数枚, 浸于 *AtGSTZ* DNA 变性液中, 期间不时摇动, 30 min 后将膜转至含 200 ng·μL⁻¹ 变性鲑精 DNA、5×SSPE、5×Denhardt 和 0.5% SDS 的封闭液中, 65℃ 杂交 24 h 后用 5×SSPE 和 0.1% SDS 各洗膜 1 次, 然后紫外交联 2 min、80℃ 烤膜 30 min。

2.4 单分子 PCR 体系的建立 参照 Ohuchi 等(1998) 方法用 0.1% 蓝色葡聚糖 2000 稀释纯化的 *AtGSTZ* 至最终浓度 10 (分子)·μL⁻¹ (1 分子 *AtGSTZ* 质量为 7.3×10⁻¹⁰ ng)。10 μL PCR 体系中含 1 μL 10×PCR 缓冲液、1 μL 2.5 mmol·L⁻¹ dNTP、1 μL 10 (分子)·μL⁻¹ *AtGSTZ*、0.25 μL 10 μmol·L⁻¹ 引物 A-1、0.25 μL 10 μmol·L⁻¹ 引物 A-2 及 0.05 μL 5 U·μL⁻¹ Taq DNA

聚合酶。PCR 参数为 94℃ 预变性 5 min 后进行三温度循环(94℃ 变性 20 s、60℃ 退火 10 s、72℃ 延伸 80 s)。为优化 PCR 参数, 以 3~4 次重复实验的目的带的相对亮度的平均值为依据评价扩增体系。

2.5 靶基因克隆 取 1 枚印迹膜浸于 20 ng·μL⁻¹ 甘蓝型油菜全长双链 cDNA 中, 沸水浴中保温 5 min 后骤冷, 然后加等体积杂交缓冲液(10×SSPE、10×Denhardt 和 1% SDS), 65℃ 反应 36 h, 再用 65℃ 预热 2×SSC 和 0.1% SDS、1×SSC 和 0.1% SDS 各洗膜 3 次, 每次 20 min, 再将膜转至 40 μL 0.1% 蓝色葡聚糖 2000 溶液中, 100℃ 下保温 5 min 后冰上骤冷, 取上清液为模板, 按优化的 10 μL *AtGSTZ* 单分子 PCR 体系进行扩增, 引物为扩增全长双链 cDNA 用的单引物 IIA, 循环数为 70 个。PCR 完毕后用电泳法回收目的带, 回收的 DNA 与载体 pMD18-T 连接后转化进大肠杆菌 DH5a-FT, 以蓝白斑筛选、质粒 PCR 和限制性内切酶等法筛选的阳性克隆送北京三博志远生物技术有限责任公司测序。

实验结果

1 全长双链 cDNA 扩增

拟南芥与甘蓝型油菜幼叶于液氮中研磨后迅速用 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 公司) 提取总 RNA, 尿素变性琼脂糖凝胶电泳证明, 提取的总 RNA 完整性好, 未发生降解(图 1)。进而用 polyAtract mRNA 分离系统(Promega 公司) 从总 RNA 中富集出 poly(A)⁺ mRNA, 再用 Smart PCR cDNA 合成试剂盒(Clontech 公司) 合成全长 cDNA 第 1 链, 最后用单引物(IIA) PCR 合成双链全长 cDNA。图 2 是双链 cDNA 扩增的结果, 明显呈拖尾状, 拖尾区间介于 0.4~8 kb 之间, 表明扩增的拟南芥与甘蓝型油菜双链 cDNA 是完全的, 可用于基因全长 cDNA 克隆。

2 饵基因 DNA 扩增、印迹膜的制作及杂交条件的优化

以 A-1 和 A-2 为引物对, 以拟南芥全长双链 cDNA 为模板, 扩增得到长为 666 bp 的 *GSTZ* 开放阅读框, 将其命名为 *AtGSTZ*。电泳回收目的片段, 热变性后转移至硝酸纤维素膜上, 制作的印迹膜与甘蓝型油菜 cDNA 杂交, 再以洗脱液为

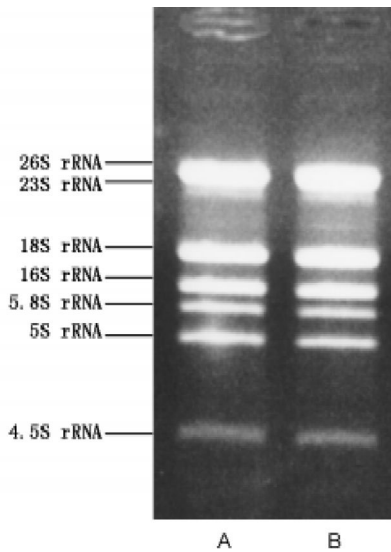


图1 总RNA变性琼脂糖凝胶电泳图谱
A: 拟南芥总RNA; B: 甘蓝型油菜总RNA。

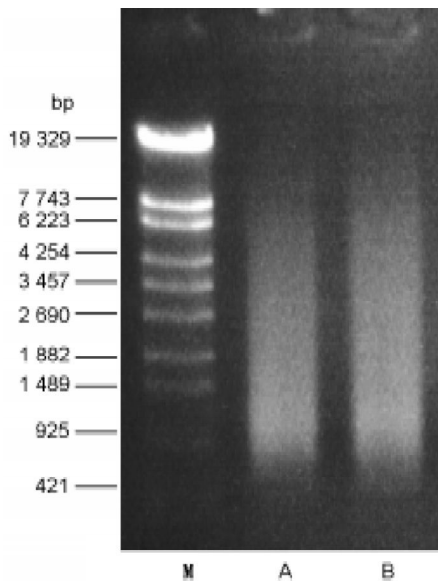


图2 扩增的双链cDNA琼脂糖凝胶电泳图谱
M: DNA标准分子量标记; A: 拟南芥双链cDNA; B: 甘蓝型油菜双链cDNA。

模板进行单引物(IIA)单分子PCR, 扩增未知的甘蓝型油菜 *GSTZ* 基因(*BnGSTZ*)。

对实验过程中关键步骤进行条件优化的结果显示, 用NaOH变性液溶解靶基因DNA是实验成功的关键。当*AtGSTZ* DNA溶于TE或无菌水中, 其洗脱液扩增不出目的带; 若溶于NaOH变性液中, 则可以见到明显的目的带(图3, 泳道1)。造

成其差异的原因可能是溶于TE或无菌水中的热变性*AtGSTZ* DNA多已复性, 以致没有足够靶基因DNA固定于膜上而导致扩增失败。

实验结果还显示, 采用封闭液与否也影响实验结果。未经封闭液处理的印迹膜与甘蓝型油菜cDNA杂交后, 其洗脱液扩增不出目的带。造成这种现象的原因可能是膜上存在未固定*AtGSTZ* DNA的空区, 以致甘蓝型油菜cDNA直接共价结合于膜上无法洗脱下来。

杂交时的温度对实验结果影响也很大。从图3可以看出, 在65℃下杂交可见到明显的目的带; 55和75℃下杂交均未见到明显目的带。推测造成差异的原因是低温下杂交出现非特异性杂交而阻碍膜上的*AtGSTZ* DNA与溶液中的*BnGSTZ* cDNA结合; 高温影响杂交时溶液中的*BnGSTZ* cDNA与膜上的*AtGSTZ* DNA结合, 以致扩增失败。

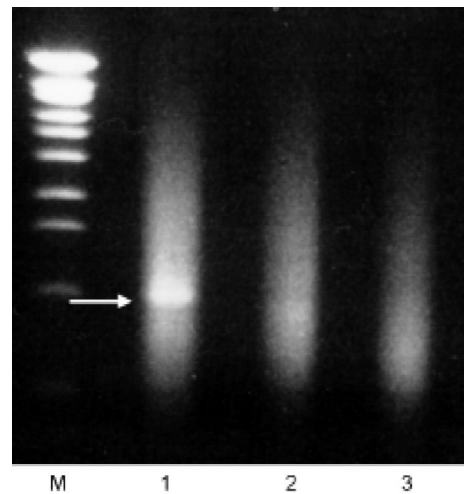


图3 杂交时的温度对目的条带扩增的影响
M: DNA标准分子量标记; 1: 65℃下杂交条带; 2: 55℃下杂交条带; 3: 75℃下杂交条带。箭头所指条带为甘蓝型油菜*BnGSTZ*, 长约1 kb。

3 单分子PCR体系建立

以每管含10个分子*AtGSTZ*为模板进行PCR, 比较不同循环数对目的带相对亮度影响的结果(图4)表明, 65个循环以下的目的带亮度随循环数增加而增加; 65~75个循环的目的带亮度不再随循环数增加而增加; 75个循环以上的目的带亮度随循环数增加反而减弱。因此认为65个循环是10个分子*AtGSTZ* PCR的最适循环数, 65~75个循环

的扩增量可能因 dNTP、引物或 Taq DNA 聚合酶已耗尽而不再增长, 80 个循环以上的扩增可能因扩增产物发生不可逆变性而减少。实验中还见到 3 种温度循环中的不同变性和退火时间也影响扩增量, 其中以 20 s 变性和 10 s 退火扩增出的目的带最亮。

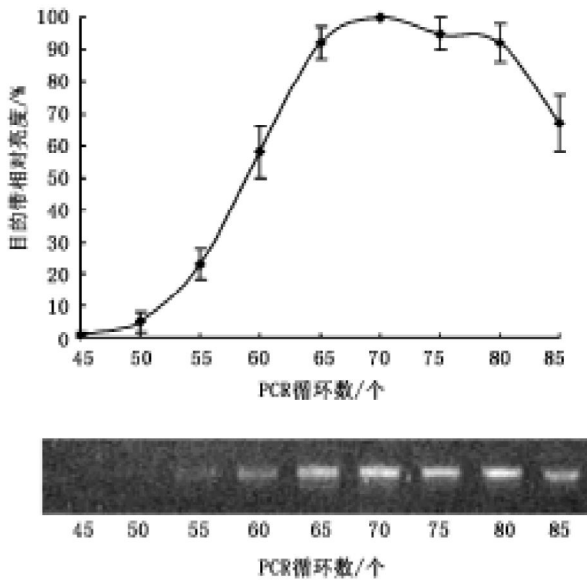


图4 单分子 PCR 循环数对目的 DNA 扩增量的影响

4 同源靶基因克隆与分析

取 1 枚 *AtGSTZ* 印迹膜浸于甘蓝型油菜全长双链 cDNA 溶液中, 杂交完毕后将膜转至 0.1% 蓝色葡聚糖 2000 溶液中, 热变性后骤冷, 取上清液进行单分子 PCR 扩增。以扩增全长双链 cDNA 用的单引物 IIA 为扩增引物, 循环数为 70。扩增 DNA (图 3, 泳道 1 箭头所示) 经电泳分离和回收后与载体 pMD18-T 连接并转化进大肠杆菌, 选取经蓝白斑、PCR 和限制性内切酶等法鉴定的 6 个阳性克隆进行序列测定。序列分析显示, 其中 5 个与我们在前文 (Chen 等 2003) 中采用简并引物 PCR 结合 RACE 技术克隆的 *BnGSTZ* 全长 cDNA 序列 (AY208158) 完全相同, 表明基于分子杂交和单分子 PCR 建立的同源克隆技术能够克隆到靶基因全长 cDNA, 成功率高 (83%)。序列分析也表明, 其中 1 个克隆 (占 17%) 为来源不明的非同源 DNA, 暗示实验中可能有一定程度的污染, 由于此种污染的 DNA 与靶基因长度接近, 两端也含引物 IIA

配对序列, 因此无法通过蓝白斑和 PCR 方法剔除。

讨 论

同源基因克隆通常采用 DNA 保守域简并引物 PCR 等策略, 但由于简并引物 PCR 克隆的特异性低, 实验流程长, 实验要求严格, 因而有时难以达到克隆目的。此外, 简并引物 PCR 克隆仅能获得基因的片段, 而且还需结合 RACE 技术才可以获得全长序列; 当已知的同源基因很少时, 难以发现可用于设计简并引物的 DNA 保守域以致该克隆策略无法采用。本文建立的同源克隆技术通过分子杂交方法从全长总 cDNA 中将需要克隆的同源靶基因 cDNA 一次性分离出来, 然后以通用单引物 IIA 为引物进行单分子 PCR, 扩增其洗脱液中的微量靶基因全长 cDNA, 能有效地获得任何需要克隆的同源靶基因。

为确保克隆到靶基因全长 cDNA, 本文使用了 Clontech 公司的 Smart PCR cDNA Synthesis Kit。本试剂盒利用 SMART 原理 (switching mechanism at 5' end of the RNA transcript) 合成基因全长 cDNA, 要求其 mRNA 的 5' 末端必须含甲基化鸟嘌呤及 3' 末端必须含多聚腺嘌呤, 5' 末端不是鸟嘌呤和 3' 末端不是 poly(A)⁺ 的 mRNA 则合成不出全长 cDNA (Zhu 等 2001)。植物细胞中约 2/3 蛋白质基因转录本的 5' 末端含甲基化鸟嘌呤和 3' 末端含 poly(A)⁺ mRNA, 因此本文中的同源克隆策略对大多数植物蛋白质基因克隆来说可能是有效的。

本文的同源克隆策略中采用了分子杂交技术, 其原理是碱基互补, 同源性越高, 获取杂合双链分子的可能性就越大, 因此同源性高的饵基因 DNA 的选取和共价结合有饵基因 DNA 印迹膜的制作是这项同源克隆技术成功的关键。若选取同源性低的饵基因, 虽可采用低杂交温度或更多单分子 PCR 循环数来弥补, 但实验显示, 过低的杂交温度导致非同源 DNA 污染, 其筛选难度会增大。另外, 过多的循环数又可能因扩增产物的不可逆变性而导致目的 DNA 量的减少。我们在实验中还见到, 制作印迹膜时的饵基因 DNA 变性是否彻底以及膜上空区是否封闭完全等因素也会影响实验结果。

在单分子PCR中, 由于模板数的减少和循环数的增加, 实验难度比常规PCR要明显增大, 这主要表现为更易产生二聚体, 更易出现污染和更易发生突变(杨鹏等2005)。本文中也见到循环数、变性时间以及退火时间对单分子PCR结果的影响很大, 过多或过少的循环数、变性时间和退火时间都可能导致实验失败, 因此在同源克隆中应优化单分子PCR体系, 严格实验操作, 并用高保真DNA聚合酶。

参考文献

- 陈德富, 陈喜文, 邹卫国, 李修庆(1999). 一种有效的植物花粉线粒体RNA分离技术. 植物生理学通讯, 35: 211~214
- 杨鹏, 陈喜文, 陈洁, 陈德富(2005). 单分子PCR技术及其在生命化学中的应用. 生命的化学, 25: 257~259
- Arondel V, Lemieux B, Hwang I, Gibson S, Goodman HM, Somerville CR (1992). Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis*. Science, 258: 1353~1355
- Bogan JS, Hendon N, McKee AE, Tsao T, Lodish HF (2003). Functional cloning of TUG as a regulator of GLUT4 glucose transporter trafficking. Nature, 425: 727~733
- Chen D, Kawarasaki Y, Nakano H, Yamane T (2003). Cloning and *in vitro* and *in vivo* expression of plant glutathione S-transferase zeta class genes. J Biosci Bioeng, 95: 594~600
- Jonsson JJ, Weissman SM (1995). From mutation mapping to phenotype cloning. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 83~85
- Ohuchi S, Nakano H, Yamane T (1998). *In vitro* method for the generation of protein libraries using PCR amplification of a single DNA molecule and coupled transcription/translation. Nucleic Acids Res, 26: 4339~4346
- Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, Li R, Siebert PD (2001). Reverse transcriptase template switching: a SMART™ approach for full-length cDNA library construction. Biotechniques, 30: 892~897