

逆转录 - PCR 扩增文昌鱼 LIM 类同源框基因片段*

王 勇 郎刚华[†] 刘宗柱 张培军

(中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学开放研究实验室 青岛 266071)

[†](青岛海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

摘要 于 1997 年 6 月在青岛市沙子口海域采集文昌鱼样品,采用 RT-PCR 方法进行青岛文昌鱼 LIM 类同源框基因片段的扩增研究。结果表明,用一对引物一次 PCR 扩增的方法未能得到特异的 PCR 产物,用一对引物两次 PCR 扩增的方法也同样未果。在对套式 PCR 进行研究时发现,用普通 PCR 方法进行的套式 PCR 结果不够理想,而用三步两段法和四步两段法套式 PCR 则可进行成功的扩增。用这两种方法扩增的 PCR 产物具有高度特异性。相比之下,用简并的引物对未知的基因片段进行 PCR 扩增时,三步两段法和四步两段法的套式 PCR 应是首选方法。

关键词 文昌鱼, LIM 类同源框基因, 逆转录 - 聚合酶链式反应

中图分类号 Q78

目前在提高聚合酶链式反应(PCR)特异性方面有许多改进方法,比较常见的是对 PCR 反应体系中各组分的含量进行优化;也有人用二次 PCR 技术来提高 PCR 特异性(余伍忠等,1993);还有人在退火条件上进行改进,采用 PCR - 四步两段扩增法(刘飞鹏等,1997)或“双退火温度”PCR 法(李庆生等,1996),获得了非常纯的目的片段,其纯度经过了测序证实;最近廖玉才等(1997)报道,在 PCR 反应体系中加入四甲基氯化铵有助于得到某些小麦基因的特异性片段。此外,赵崇等(1995)认为,在进行逆转录 - PCR(Reverse Transcription - PCR, RT - PCR)时,长片段的 RT - PCR 扩增难度比较大,应以 mRNA 为模板,这不但提高了模板量,也减少了其它 RNA 对 PCR 的干扰。LIM 类同源框基因是控制动物胚胎发育的关键基因之一,本文对青岛文昌鱼 LIM 类同源框基因的同源框区的 RT - PCR 扩增进行了比较研究,以寻找适合该基因的 PCR 扩增方法,进一步研究文昌鱼早期发育的基因调控。

1 材料与方法

1.1 材料

You - Prime First - Strand Beads 逆转录 - PCR 试剂盒,为瑞典 Pharmacia 公司产品,日本上智大学山上健次郎教授惠赠;PCR 试剂盒,为美国 PE 公司产品;PCR 仪系

* 国家海洋“863”课题资助项目,863-819-01-03 号。王 勇,男,出生于 1968 年 3 月,博士,E-mail:devbiol@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:1999-10-20,收修改稿日期:2000-01-09

PCR9600 型,为 PE 公司产品。

1.2 模板 RNA 的提取

模板 RNA 为青岛文昌鱼(*Branchiostoma belcheri tsingtauense* Tchang et Koo)原肠胚的总 RNA,按文献方法(萨姆布鲁克等,1992)提取。

1.3 引物的设计与合成

外侧引物 F_1 、 R_1 ,由本室设计,在加拿大多伦多大学丘才良教授实验室合成;内侧引物 F_2 、 R_2 ,于本室用固相合成法在 ABI 391 型 DNA 合成仪上合成(表 1)。

表 1 用于文昌鱼 LIM 类同源框基因扩增的引物

Tab. 1 The primers for amplifying LIM class homeobox gene in amphioxus

引物	在同源框中的位置	极性	$T_m(^{\circ}\text{C})$	序列(5'—3')
F_1	13—35	+	67	(A/C)GAAC(G/C)ACAATCA(A/C)(G/T/A)GC(A/C)AA(A/G)CA
R_1	136—158	—	68	C(T/G)TC(G/T)(A/G)TT(T/C)TG(A/G)AACCA(A/G)ACCTG
F_2^*	20—37	+	59	GG <u>AAGCTT</u> CAATCA(A/C)(A/G/T)GC(A/C)AA(A/G)CA(A/G)GC
R_2^{**}	130—150	—	56	TT <u>GGATCC</u> CA(C/A/G)ACCTG(A/T/G)A(T/C)(G/C/A)AC

注: * 表示在 5' - 端引入了 HindⅢ 酶切位点, ** 表示在 5' - 端引入了 BamHⅠ 酶切位点

1.4 逆转录反应

按 Pharmacia 公司产品说明书进行。

1.5 PCR 扩增文昌鱼 LIM 类同源框基因片段

在 100 μl 反应体系中,镁离子终浓度为 3mmol/L,每种 dNTP 终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$,Tag 酶 2.5 单位,PCR 引物含量均为 20pmol,此外还含有 10 μl 的逆转录反应终溶液(总体积为 33 μl)。

1.5.1 一对引物一次 PCR 扩增 使用的引物为 F_1 、 R_1 。PCR 参数为:94 $^{\circ}\text{C}$ /30s,分别在三个反应体系中用三种温度退火(53 $^{\circ}\text{C}$ 、56 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$)40s,72 $^{\circ}\text{C}$ /40s,40 个循环。各取 10 μl 产物进行 3% 琼脂糖电泳,E. B 染色后紫外灯下观察照相。

1.5.2 一对引物两次 PCR 扩增 使用的引物为 F_1 、 R_1 。第一次 PCR 的参数为:94 $^{\circ}\text{C}$ /30s,53 $^{\circ}\text{C}$ /40s,72 $^{\circ}\text{C}$ /40s,40 个循环。从 PCR 反应产物中取 1 μl ,加入到新鲜的 PCR 反应体系中,设立三个反应体系,进行二次 PCR 扩增。退火参数分别为 55 $^{\circ}\text{C}$ 、62 $^{\circ}\text{C}$ 和 67 $^{\circ}\text{C}$,35s;变性与延伸参数同第一次 PCR。各取 10 μl 产物进行 3% 琼脂糖电泳,E. B 染色后紫外灯下观察照相。

1.5.3 套式 PCR 扩增 采用三种方法进行:(1) 普通套式 PCR(使用内侧引物 and 外侧引物各一对,在用外侧引物扩增后,再用内侧引物进行第二轮扩增),(2) 三步两段法套式 PCR(在第二轮扩增时,将 PCR 分为两段,即先在较低退火温度下进行几个循环,然后在较高退火温度下进行剩余的循环,其循环方式仍为变性、退火和延伸三步),(3) 四步两段法套式 PCR(在第二轮扩增时,将 PCR 分为两段,即先在较低退火温度下进行几个循环,然后在较高退火温度下进行剩余的循环,其低温退火时循环方式则为变性、退火、低温延伸和延伸四步)。每种方法的第一次 PCR 反应的参数均为:94 $^{\circ}\text{C}$ /30s,56 $^{\circ}\text{C}$ /40s,72 $^{\circ}\text{C}$ /40s,

35 个循环。在第一次 PCR 中使用外侧引物 F_1 、 R_1 , 在第二次 PCR 中使用内侧引物 F_2 、 R_2 。在方法(1)中,第二次 PCR 的参数为:94℃/30s,55℃/30s,72℃/40s,35 个循环。在方法(2)中,第二次 PCR 的参数为:94℃/30s,40℃/30s,斜坡 2min;72℃/40s,3 个循环。接着 92℃/30s,55℃/30s,72℃/40s,32 个循环。在方法(3)中,第二次 PCR 的参数为:94℃/30s,50℃/15s,55℃/15s,72℃/40s,3 个循环;接着 90℃/30s,55℃/30s,72℃/40s,32 个循环。各取 10 μ l 产物行 3% 琼脂糖电泳,EB 染色后观察照相。

1.5.4 PCR 产物的序列测定 PCR 产物用染料标记的 ddNTP,在 ABI 公司的 310 型全自动 DNA 测序仪上进行双脱氧循环测序,测序引物为 F_2 。

2 结果

2.1 一对引物一次 PCR 扩增的结果

选择了 3 个退火温度,但在较低退火温度下(53℃,56℃)产物的特异性差,而提高退火温度(60℃)又得不到扩增产物(图 1)。

2.2 一对引物两次 PCR 扩增的结果

在第二次 PCR 反应中,退火温度提高到 67℃后,PCR 产物的特异性虽有提高,但仍不理想(图 1)。以该产物为模板测序,测序结果无法判读。

2.3 几种套式 PCR 扩增结果的比较

用经典的套式 PCR 法在 55℃退火没有得到产物,而降低退火温度,非特异产物扩增较多。用三步两段法和四步两段法则得到了高度特异的 PCR 产物(图 2,表 2),其位置与分子量 Marker 中的 142bp 条带平行,理论上该 PCR 产物为 139bp,二者基本相吻合。

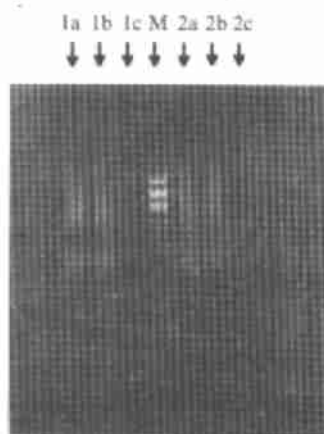


图 1 一对引物一次 PCR 扩增和一对引物二次 PCR 扩增的电泳图谱

Fig. 1 The electropherogram of PCR amplification by the means of single pair of primers—single amplification and single pair of primers—twice amplification

电泳支持物为 3% 琼脂糖,0.5×TBE 缓冲液。

M: 分子量标准, GEM-7ZF/Hae III。

1: 一对引物一次 PCR 扩增, 1a: 53℃ 退火, 1b: 56℃ 退火, 1c: 60℃ 退火;

2: 一对引物二次 PCR 扩增, 2a: 55℃ 退火, 2b: 62℃ 退火, 2c: 67℃ 退火;

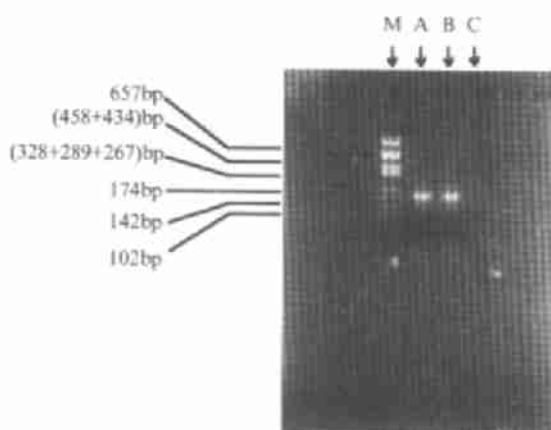


图 2 三种套式 PCR 扩增的电泳图谱

Fig. 2 The electropherogram of three kinds of nested-PCR amplification

电泳支持物为 3% 琼脂糖,0.5×TBE 缓冲液。

M: 分子量标准, pGEM-7ZF/Hae III。

A: 三步两段法套式 PCR; B: 四步两段法套式 PCR;

C: 普通套式 PCR

表 2 不同 PCR 方法对 PCR 特异性的影响
Tab.2 The effects of different PCR methods
on PCR specificity

PCR 方法	特异产物	非特异产物
一对引物一次 PCR	无	有
一对引物两次 PCR	无	有
普通套式 PCR	无	有
三步两段法套式 PCR	有	无
四步两段法套式 PCR	有	无

注：每个实验重复 3 次

2.4 套式 PCR 与其它 PCR 产物的测序结果的比较

用套式 PCR 扩增的产物测序结果比较好,图 3 显示了四步两段法套式 PCR 扩增产物的测序图谱,三步两段法套式 PCR 扩增产物的测序结果与此相同;而用其它 PCR 方法扩增的产物的测序结果远不如此。

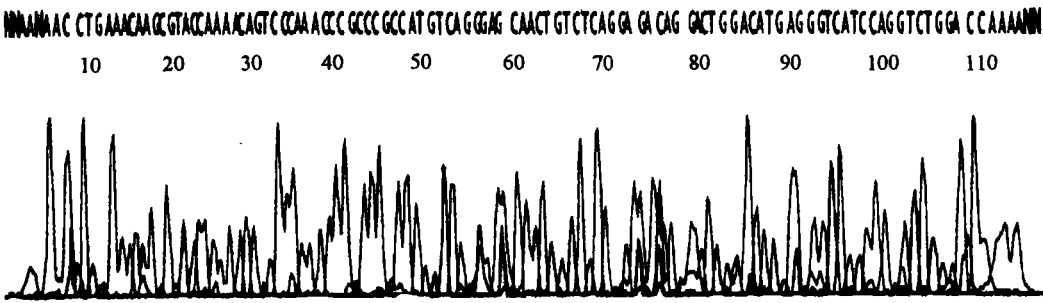


图 3 四步两段法套式 PCR 扩增产物的测序图谱

Fig.3 Electropherogram of DNA sequence amplified by the means of nested-PCR (four steps - two stages method)

注:A112—G93 为与引物 R₂ 互补的序列。N:任何一种核苷酸(指 DNA 测序仪不能判读的核苷酸),
A:腺嘌呤核苷酸,C:胞嘧啶核苷酸,G:鸟嘌呤核苷酸,T:胸腺嘧啶核苷酸

3 讨论

为了克隆青岛文昌鱼的 LIM 类同源框基因,首先对其保守性较高的同源框区进行扩增。由于 PCR 引物简并程度较高,因此最初所进行的扩增结果很不理想,非特异性扩增很多。为此,作者对该基因的 PCR 扩增进行了较为详细的比较研究。首先,在一对引物一次 PCR 扩增的方法中,对 PCR 反应体系中各组分的含量与退火温度进行了优化,但没有多大效果。接着又采用了一对引物二次 PCR 扩增的方法,当退火温度提高到 67℃ 时,产物特异性有所提高,较大片段的非特异性扩增可被除去,但总的来说仍不理想。即使在第二次 PCR 后,在电泳胶上用 DEAE-纤维素膜回收相应分子量的片段,再作 PCR,经测序检测,测序结果杂乱无章,无法判读,证明特异性仍很差。这说明二次 PCR 技术有一定局限性,并不总是能得到特异产物。在套式 PCR 反应中,普通 PCR 结果不佳,可能是由于退火温度设置太高造成的,但如果花费大量时间做预实验去摸索其最适退火温度,则不如使用四步两段法或三步两段法套式 PCR 更简便、可靠。用三步两段法和四步两段法套式 PCR 则得到了高度特异的 PCR 产物,且经测序分析,与作者从文昌鱼基因组 DNA 中扩增的同源框片段相比(Wang *et al*, 1998),结果基本一致(图 3)。

三步两段法套式 PCR 与四步两段法套式 PCR 之所以能获得最佳结果,首先是由于采用了两对互相重叠的引物。由于两对引物既互相重叠又彼此相差几个碱基,因此大大提高了第二次 PCR 的特异性,这一点自然优于一对引物二次 PCR 扩增方法。另外,三步

两段法是先在较低温度下(40℃)退火,并且使由退火至延伸状态的斜坡时间延长,使尽可能多的引物与靶序列杂交,增加了模板 DNA 的拷贝数;然后再在较高温度下(55℃)退火,进行目的片段的特异性扩增,这样做,既保证了产物的数量,又保证了产物的特异性。而四步两段法则是参考文献的方法(刘飞鹏等,1997)并进行了 PCR 参数优化,于前 3 个循环中采用四温度 PCR,即在 94℃ 变性后,于 50℃ 进行退火,接着于 55℃ 进行短暂的低温延伸,加上几个碱基,再于 72℃ 进行充分延伸。循环 3 次后,原始模板中的目的序列被扩增了 2^3 倍。引物 5' 端的 8 个碱基就能与从原始模板扩增出来的目的 DNA 序列互补,此时采用 55℃ 作为退火温度,足以保证引物充分退火。因此在采用四步法进行 3 次循环后,第二阶段便能采用标准的 PCR 条件进行反应。经测序检查,结果较好(图 3)。

综上所述,三步两段法套式 PCR 和四步两段法套式 PCR 与其它 PCR 方法相比,具有明显的优越性,在用简并引物进行 PCR 扩增时,应当是首选方法。另外,在所使用的两对 PCR 引物中,第一次 PCR 所使用的外侧引物不含酶切位点,以提高 PCR 特异性;而考虑到下一步克隆的需要,在第二次 PCR 所使用的内侧引物中引入酶切位点。这样,既提高了 PCR 的特异性,又满足了克隆步骤的要求。

参 考 文 献

- 刘飞鹏,吴雄化,云 涌等,1997. PCR-四步两段扩增法分离人碱性成纤维细胞生长因子(hbFGF)基因. 生物工程进展,17(1):52—55
- 李庆生,郭建平,陶其敏,1996. “双退火温度”多聚酶链反应扩增丙型肝炎病毒 NS₅ 基因. 生物化学杂志,12(2): 249—251
- 余伍忠,周常文,郝小军等,1993. 应用二次 PCR 技术提高体外基因扩增的效率. 生物化学与生物物理进展,20(3): 240—241
- 赵 崇,宋学文,张连英等,1995. 大鼠脑 α_1 型甲状腺激素受体基因的 cDNA 克隆及序列分析. 生物化学杂志,11(4): 392—395
- 廖玉才,李和平,Rainer Fischer,1997. 四甲基氯化铵在 PCR 扩增小麦基因中的关键作用. 遗传,19(2):1—4
- 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T 著,金冬雁,黎孟枫,张 励等译,1992. 分子克隆(第二版). 北京:科学出版社,351—352
- Wang Y, Lang G H, Saiga H *et al*, 1998. Intron analysis of LIM class homeobox gene *Bblim* in amphioxus, *Branchiostoma belcheri tsingtauense*. Develop Reproductive Biol, 7(1):77—80

AMPLIFICATION OF LIM CLASS HOMEBOX GENE FRAGMENT OF AMPHIOXUS BY REVERSE TRANSCRIPTION – PCR

WANG Yong, LANG Gang – Hua[†], LIU Zong – Zhu, ZHANG Pei – Jun

(*Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

[†](*College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao, 266003*)

Abstract LIM class homeobox gene is one of the key genes controlling embryonic development of animal. In order to clone the entire sequence of amphioxus LIM class homeobox gene, adult amphioxus was acquired in Shazikou sea field in Qingdao City in June 1997, and the amplification methodology of Amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*) LIM class homeobox gene fragment by PCR was studied. The amplification by means of single pair of primers and single PCR operation failed to produce specific PCR product, and amplification by means of single pair of primers and twice PCR operations failed, too. In the study of nested – PCR, amplification by means of general PCR approach was not satisfactory, but amplifications by means of three steps – two stages approach and by four steps – two stages method were successful. The sequencing data of PCR product acquired by these two methods show a high accordance with genomic DNA sequencing data of this gene fragment. Therefore, the PCR products, amplified by these two methods, were extremely specific. In comparison with the PCR approaches mentioned, nested – PCR by means of the three – step and two – stage approach and by means of the four – step and two – stage approach were the best to amplify unidentified gene fragments with degenerated primers.

Key words Amphioxus, LIM class homeobox, RT – PCR