一种简单易行的重组方法——三引物 PCR 法

邓朝阳* 宋贵生* 徐军望 朱 祯†

(中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101. *同等贡献. †联系人, E-mail: zzhu@genetics.ac.cn)

摘要 报道了一种不需要限制性内切酶和连接酶的重组 DNA 方法——三引物 PCR 法(TP-PCR). TP-PCR 反应体系中有 2 种模板和 3 种引物, 从而在同一个反应体系中产生一个重组 DNA 分子. 这种方法的主要优点是快速、高效且不依赖连接片段的限制酶位点. 用这种方法已成功构建了融合蛋白基因——*sck* 基因.

关键词 DNA 重组 TP-PCR 豇豆蛋白酶抑制剂

DNA 的体外重组一般是通过在准确的限制酶位点对两个 DNA 片段连接进行的. 一般来说, 标准的 DNA 重组方法需要对所连接的 DNA 片段的限制酶位点有所了解^[1], 然后用限制性内切酶消化, 这时带有黏性末端或平末端的 DNA 片段可以通过 DNA 连接酶连接在一起形成重组的 DNA 分子. 然而, 在一些重组反应中, 没有合适的限制酶切位点可以利用. 目前已有一些方法被用来解决这个困难, 如通过定点突变来产生新的限制酶切位点^[2]或通过接头来对目的片段进行准确的扩增^[3]. 然而, 这些方法或很昂贵或需要额外的遗传操作, 从而使其应用受到很大的限制. 本研究采用一种新的方法——三引物 PCR 法(TP-PCR)进行 DNA 重组. 此方法仅需在同一个 PCR 反应体系中加入 2 种模板和 3 种引物即可产生重组的 DNA 分子.

cpti 基因是丝氨酸蛋白酶抑制剂基因家族的成员之一, 由于其产物的广谱抗虫能力, 在植物基因工程上已被广泛用作抗虫基因^[4]. 然而, CpTI 蛋白是一种细胞质蛋白, 在代谢活跃的叶细胞环境中会不断地被降解, 外源 CpTI 蛋白在转基因植物的叶子中积累水平很低^[5,6]. 本研究中, 融合基因 *sck* 编码的融合蛋白由 3 部分组成: 融合蛋白 N 末端的信号肽、中间的 CpTI 肽以及 C 末端的内质网延迟信号肽^[7,8]. 信号肽可以指导胞质中合成的多肽进入内质网(ER), 然而 ER 延迟信号肽可以使蛋白滞留在 ER 中. 通过这种方法, 转基因植物中外源的 CpTI 蛋白可被导入并滞留在 ER——一个代谢相对不活跃的环境中. 由于在转基因植物中蛋白质定位方式的变化, 其积累水平也得到了很大的提高.

1 材料与方法

(i) 模板和引物. 在 TP-PCR 的同一个反应体系中有 2 种模板和 3 种引物. 2 种模板是质粒 pBlueL3 和 pSKTI, 分别带有 *cpti* 基因^[7]和 *skti* 基因^[9], *skti* 基因提供信号肽编码序列. 3 种引物是 F 引物(5'-AAAATGAAGAGCACCATCTTC-3'), R 引物(5'-TCT-AGAGTTCATCTTTCTCATCATCTTCATCCCT-3')和 I 引物. 其中 F 引物和 *skti* 基因的 5'末端互补; R 引物和 *cpti* 基因的 3'末端互补并带有 Lys-Asp-Glu-Leu(KDEL)内质网延迟信号序列和一终止密码子^[8]; 中间引物(I 引物)长为 55 个碱基, 其 5'端(1~25)和 SKTI 信号肽编码序列互补, 3'端(26~55)和 *cpti* 基因的 5'末端互补.

(ii) 三引物 PCR 原理. 如图 1 所示, 第 1 个循环, I 引物以质粒 pBlueL3 上的 *cpti* 基因序列为模板合成 *cpti* 基因的正义链. 第 2 个循环, R 引物合成 *cpti* 基因的反义链, 此时的 *cpti* 基因的 5'端和 3'端分别带有额外的核苷酸序列. *cpti* 序列中额外的 3'端序列和 SKTI 信号肽编码序列互补并在下一个循环中作为引物. 在第 3 个循环中, SKTI 信号肽编码序列得到延伸并被加在反义链上, 产生了反义链 3'-信号肽序列-*cpti* 基因-KDEL-5'. 在第 4 个循环中, F 引物以反义链 3'-信号肽序列-*cpti* 基因-KDEL-5'为模板产生正义链. 在其后的循环中, 富余的 F 引物和 R 引物即可大量地合成融合蛋白基因目的片段 *sck*. *sck* 是编码融合蛋白的各种序列名称首字母的缩写(signal peptide-*cpti*-KDEL).

在 100 μ L 的 PCR 反应体系中, 含质粒 pBlueL3

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/CSB2002-47-16-1247>

图 1 三引物 PCR 原理示意图

和 pSKTI 各 100 ng, 50 mmol/L dNTP, F 引物和 R 引物各 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 中间引物 0.002 ~ 0.02 $\mu\text{mol/L}$, 10 μL PCR 反应缓冲液(10 $\times$). 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min 后加入 2 U Vent DNA 聚合酶, 并覆盖上一层石蜡油, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 36 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min.

2 结果

PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测(图 2), 结果发现, 用 I 引物和 R 引物的 PCR 反应中, 得到了一条 365 碱基的扩增片段, 其长度和预期的一致. 然而, 在 TP-PCR 扩增中经常会出现两条扩增条带(图 2, 第 4 泳道). 较亮的条带(415 bp)比第 3 泳道(365 bp)中扩增条带略长, 这条亮带即为融合蛋白目的基因片段 *skc*. 然而, 用 F 和 R 引物的 PCR 反应中, 没有产生任何条带. 较亮的条带用 Klenow 酶补平后纯化回收, 插入 pBluescript KS(+)*EcoRV* 位点^[10], 得到克隆质粒 pBlueSCK. 测序结果证实, 所获融合蛋白基因长 415 bp, 和预期完全一致(图 3). 这样通过 TP-PCR 方法, 我们成功地获得了融合蛋白 *skc* 基因.

图 2 TP-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析
1 示 ϕ 174/*Hae*III Marker; 2 示 F 引物和 R 引物扩增产物, 3 示 I 引物和 R 引物扩增产物, 4 示 TP-PCR 扩增产物

3 讨论

设计合理的中间引物是保证 TP-PCR 反应成功的关键. 只有中间引物设计合理才能保证两种 DNA 片段在融合位点正确连接. 3 条引物的浓度比例是另一个关键因素, 要适当调节中间引物的比例使得 TP-PCR 反应获得最理想的结果. 实验结果表明, 合适的比例范围可有效增加目的片段的扩增, 同时减少非特异产物的扩增, 一般来说在 1/1000 ~ 1/100 范围内比较合适. 除此以外, 为了保证 PCR 产物的高忠实性, 需用高忠实的 DNA 聚合酶来代替 Taq 聚合酶.

TP-PCR 法的主要优点在于它的简单易行. 因为我们可以 在所期望的任何位点将两种 DNA 片段连接起来, 而不需知道 DNA 片段的限制位点. 由 Horton 等人^[11]所发展的重组 PCR 系统可以用 4 种引物和 2 种模板来产生重组 DNA 分子, 然而这种方法的缺点是需要 在不同的 PCR 管中进行两轮 PCR 反应, 这将会增加污染的概率. 通过 TP-PCR 进行重组操作, 可以在几个小时内于一个 PCR 反应体系中完成. 原则上, 这种方法还可以用来产生两种 DNA 片段的完整分子. 如果中间引物设计合理的话, 甚至可以将几种

1	<u>AAA ATG AAG AGC ACC ATC TTC</u>	TTT GCT CTC TTT CTC TGT TGT GCC TTC ACC ACC	54
1	Met Lys Ser Thr Ile Phe	Phe Ala Leu Phe Leu Cys Cys Ala Phe Thr Thr	17
55	<u>TCA TAC CTA CCT TCA GCC ATC GCT GAT TTC GTT TTA AAG GTG TGT GTG CTG GTA</u>		108
18	Ser Tyr Leu Pro Ser Ala Ile Ala	Asp Phe Val Leu Lys Val Cys Val Leu Val	35
109	<u>CTT TTC</u>	CTT GTA GGG GTT ACT ACT GCA GCC ATG GAT CTG AAC CAC CTC GGA AGT	162
36	Leu Phe	Leu Val Gly Val Thr Thr Ala Ala Met Asp Leu Asn His Leu Gly Ser	53
163	AAT CAT CAT GAT GAC TCA AGC GAT GAA CCT TCT GAG TCT TCA GAA CCA TGC TGC		216
54	Asn His His Asp Asp Ser Ser Asp Glu Pro Ser Glu Ser Ser Glu Pro Cys Cys		71
217	GAT TCA TGC ATC TGC ACT AAA TCA ATA CCT CCT CAA TGC CAT TGT ACA GAT ATC		270
72	Asp Ser Cys Ile Cys Thr Lys Ser Ile Pro Pro Gln Cys His Cys Thr Asp Ile		89
253	AGG TGG AAT TCG TGT CAC TCG GCT TGC AAA TCC TGC ATG TGT ACA CGA TCA ATG		324
84	Arg Trp Asn Ser Cys His Ser Ala Cys Lys Ser Cys Met Cys Thr Arg Ser Met		107
325	CCA GGC AAG TGT CGT TGC CTT GAC ATT GCT GAT TTC TGT TAC AAA CCT TGC AAG		378
108	Pro Gly Lys Cys Arg Cys Leu Asp Ile Ala Asp Phe Cys Tyr Lys Pro Cys Lys		125
379	<u>TCC AGG GAT GAA GAT GAT GAG AAA GAT GAA CTC TAG A</u>		415
126	Ser Arg Asp Glu Asp Asp Glu Lys Asp Glu Leu		136

图 3 *sck* 基因的碱基序列和推测的氨基酸序列

融合蛋白编码序列(*sck* 基因)通过三引物 PCR 法扩增得到, 长为 415 bp, 其中包括编码 136 个氨基酸的 411 个碱基和一个终止密码子. 融合蛋白由 N 端 25 个氨基酸的信号肽(来自 SKTI)、107 个氨基酸的 CpTI 多肽以及 C 端的 KDEL 信号组成, 其中 CpTI 多肽 N 端的两个甲硫氨酸由精氨酸和苯丙氨酸取代从而产生一个信号肽加工位点. 箭头示预测的信号肽加工位点, 下画线序列分别示 *skti* 基因的 5' 末端引物、中间引物和带有 KDEL 和终止密码子的 *cpti* 3' 端引物

DNA 片段连接起来.

本研究中所产生的 *sck* 融合基因已被用来构建成玉米泛素蛋白基因启动子控制下的植物表达载体^[12]. 转基因水稻的蛋白酶抑制活性检测证实, *sck* 转基因水稻的蛋白酶抑制活性是 *cpti* 转基因水稻的 2 倍, 一些个体甚至达到了 4 倍. 生物活性检测和大田试验表明, *sck* 转基因水稻对鳞翅目等的害虫表现出很强的抗性.

致谢 本工作为国家高技术研究发展计划(批准号: 2001AA212041, 2001AA222251)、国家自然科学基金(批准号: 39989001)和国家转基因植物研究与产业化开发专项(批准号: J99-B-004, J99-A-020)资助项目.

参 考 文 献

1 Nelson M R, Creutz C E. Comparison of the expression of native and mutant bovine annexin IV in *Escherichia coli* using four different expression systems. *Protein Exp Purif*, 1995, 6: 132 ~ 140

2 Boylan M O, Pelletier J, Dhepagnon S, et al. Construction of a fused *LuxAB* gene by site-directed mutagenesis. *J Biolumin Chemilumin*, 1989, 4: 310 ~ 316

3 Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 1987, 155: 335 ~ 350

4 Ryan C A. Proteinase inhibitor gene families: Strategies for trans-

formation to improve plant defenses against herbivores. *Bioassays*, 1989, 10: 20 ~ 24

5 Hilder V A. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 1987, 300: 160 ~ 164

6 Wandelt C I, Khan M R I, Craig S, et al. Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *Plant J*, 1992, 2(2): 181 ~ 192

7 Hammond R W, Foard D E, Larkins B A. Molecular cloning and analysis of a gene coding for the Bowman-Birk protease inhibitor in soybean. *J Biol Chem*, 1984, 259: 9883 ~ 9890

8 Pelham H R B. The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*, 1990, 15: 483 ~ 486

9 Song S I, Kim C H, Baek S J, et al. Nucleotide sequences of cDNAs encoding the precursors for soybean (*Glycine max*) trypsin inhibitors (Kunitz type). *Plant Phys*, 1993, 101: 1401 ~ 1402

10 Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E F. *Molecular Cloning: A Laboratory Annual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989

11 Horton R M, Hunt H D, Ho S N, et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: Gene splicing by overlap extension. *Gene*, 1989, 77: 61 ~ 68

12 Takimoto I, Christensen A H, Quail P H, et al. Non-systemic expression of a stress-responsive maize polyubiquitin gene (Ubi-1) in transgenic rice plants. *Plant Mol Biol*, 1994, 26(3): 1007~1012

(2002-02-09 收稿, 2002-06-25 收修改稿)