

锚定 PCR(Anchored PCR): 一种新的染色体步行方法

陈柏君 孙超 王勇 胡鸢雷 林忠平*

(北京大学生命科学学院, 北京 100871. * 联系人, E-mail: linzp@pku.edu.cn)

基于 PCR 的技术是克隆已知 DNA 片段侧翼序列的最常用方法. 到目前为止, 这些方法大致可以分为 3 种类型: 反向 PCR(inverse PCR)^[1~3]、连接介导的 PCR(ligation-mediated PCR)^[4~9] 和随机引物 PCR(randomly primed PCR)^[10~12]. 反向 PCR 是使用最早的方法, 其原理是用限制性内切酶消化基因组总 DNA, 然后在连接酶的作用下使酶切产物自身环化, 设计一对向外性引物进行 PCR 扩增已知序列旁侧的 DNA 片段. 由于其要求在目标 DNA 区段有合适的限制性位点, 而且 DNA 分子自身环化的效率往往较低, 因此目前已较少应用. 相比之下, 连接介导的 PCR 和随机引物 PCR 更受欢迎, 但它们依然有一些局限性, 如连接介导的 PCR 依赖于目的 DNA 片段两侧的限制性位点, 而随机引物 PCR 所能获得的片段通常较小, 大多在 1 kb 以下. 另外, 这 2 种方法常常会产生很多非特异性的扩增产物, 从而大大降低了实验效率. 为克服这些问题, 近几年又有一些改进方法相继报道, 如 vectorette-PCR^[6], biotin-capture PCR^[7], TAIL-PCR^[12] 以及 T-linker PCR^[9] 等, 但这些方法大多在操作过程中仍然受限制性内切酶消化或连接反应等因素的限制, 有的方法, 如 TAIL-PCR 虽然避免了此类操作, 但由于随机引物的使用, 其扩增的片段通常较小.

我们根据同聚物加尾原理设计了一种锚定 PCR(anchored PCR)技术, 可用于从复杂的基因组中高效克隆已知 DNA 片段的侧翼序列, 并且无需进行限制性内切酶消化或连接反应. 这一技术在操作上与传统的 5'-RACE 技术^[13~15] 有部分相似之处, 但两者在本质上是不同的. 锚定 PCR 技术以基因组总 DNA 为起始材料, 用于克隆某一已知片段的侧翼序列, 如分离某一基因的调控序列, 分析 T-DNA 或转座子插入突变体等. 而 5'-RACE 以 RNA 为起始材料, 仅用于获取基因的 cDNA 末端. 如图 1 所示, 锚定 PCR 方法主要由以下 3 个步骤组成: () 以基因组总 DNA 为模板, 用一条基因特异性引物(GSP1)进行线性 PCR 扩增, 产生单链扩增产物; () 在末端转移酶(TdT)的作用下, 在单链 DNA 分子的 3 末端加上多聚胞嘧

啶; () 用巢式基因特异性引物(GSP2)和与多聚胞嘧啶配对的锚定引物(AAP)对加尾的产物进行 PCR 扩增, PCR 产物连入载体后进行测序鉴定.

我们用上述方法成功地从一种耐旱植物厚叶旋蒴苣苔(*Boea crassifolia*)基因组中克隆了干旱诱导性转录因子基因 *BcMYB1* 的启动子. 从厚叶旋蒴苣苔提取的基因组总 DNA 作为线性 PCR 扩增的模板, 50 μ L PCR 反应体系中含 200 μ mol/L dNTPs, 5 μ L PCR 缓冲液(10 $\times$), 5 pmol 基因特异性引物 BM1RP1(5'-ATCCAAACCTTACTTTTTTACACATTAGT-3'), 约 2 μ g 模板 DNA. 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 7 min 后加入 2.5 U Ex Taq 酶(TaKaRa, 大连); 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 25 个循环. PCR 产物用 3S PCR 纯化试剂盒(SNBC, 上海)回收后进行加尾, 回收产物中加入 6 μ L 加尾缓冲液(5 $\times$), 1 μ L 10 mmol/L dCTP 后, 再加无菌双蒸水至 29 μ L; 反应混合物先在 94 $^{\circ}$ C 保温 2 min, 立即置冰上, 加入 1 μ L 末端转移酶(TaKaRa, 大连)后在 37 $^{\circ}$ C 保温 15 min, 再在 75 $^{\circ}$ C 保温 10 min 以灭活末端转移酶. 锚定引物 AAP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGHIIGGGHIIGGGIIG-3', 其中 I 为次黄嘌呤核苷, 多聚 G 上游包含 *Mlu*, *Sal* 和 *Spe* 3 个酶切位点)和巢式基因特异性引物 BM1RP2 (5'-TGAACCTTCGTTTAAATTTCGCATGA-3') 用于对加尾产物的扩增. PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min.

图 2 显示了 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果. 用单引物线性 PCR 扩增后没有任何条带, 而用巢式引物和锚定引物对加尾产物进行 PCR 扩增后的产物在泳道上呈弥散状(smear), 显示有不同大小的片段得到了扩增. 切取 1~2 kb 区域的凝胶并回收 DNA, 回收产物连接到 pGEM-T easy (Promega, USA)载体中, 用一对与已知序列相对应的正向引物 BM1FP (5'-CCGATGGTGGCCATTGTTGAT-3') 和反向 BM1RP2 进行 PCR 鉴定, 如果是阳性克隆(亦即含有 *BcMYB1* 基因的上游序列), 就会扩增出预期的 107 bp 的片段. 我们随机选取了 60 个克隆进行鉴定, 结果

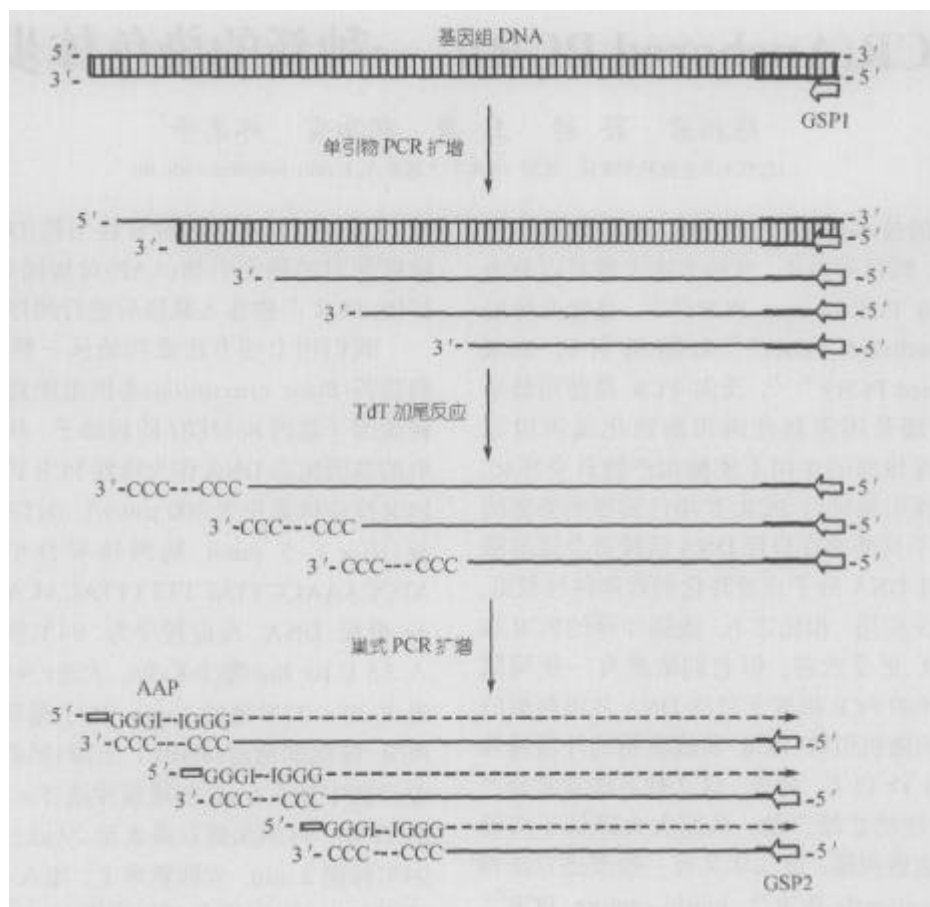


图 1 锚定 PCR 技术进行染色体步行的操作流程

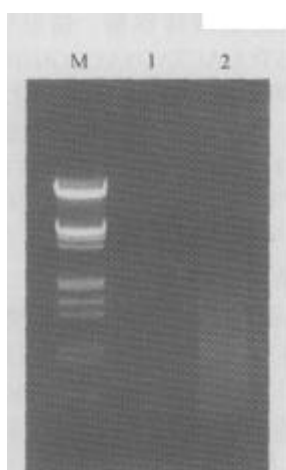


图 2 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

M 示 *EcoR* + *Hind* 消化的 *l* DNA 分子量标记; 1 示单引物扩增;
2 示巢式扩增

有 53 个扩增出了预期的片段, 阳性率高达 88%, 而且大多数插入片段的长度超过 1 kb(图 3). 因为实验的第一步是单引物的线性扩增, 扩增产物的大小是

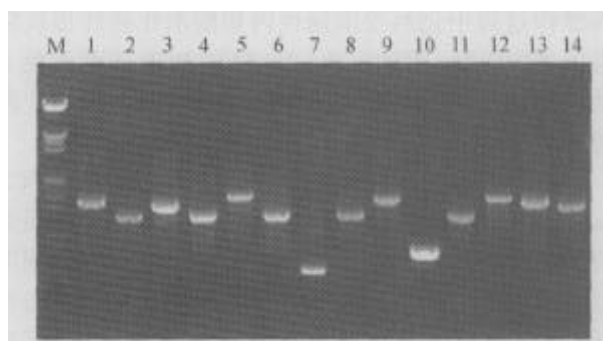


图 3 部分阳性克隆插入片段大小的 PCR 鉴定

M 示 *EcoR* + *Hind* 消化的 *l* DNA 分子量标记; 1~14 示不同的克隆
PCR 扩增结果

不一致的, 因此阳性克隆中的插入片段也就大小不等. 对含有最长插入片段的阳性克隆进行测序, 结果显示获得了 *BcMYB1* 基因的 1455 bp 启动子序列 (GenBank 登录号: AY520822).

实验结果表明, 利用锚定 PCR 技术可以进行高效率的染色体步行, 而且与已往所报道的一些方法

相比, 锚定 PCR 技术具有以下优点: () 无需对基因组总 DNA 进行限制性内切酶消化及连接反应, 从而避免了此类技术操作中最困难的步骤; () 操作过程简单, 大约 2~3 个工作日就能完成, 而多数其他的方法通常需要几周时间; () 特异性高, 在我们的实验中获得阳性克隆的比率高达 88%; () 有较长的步行距离, 一次实验可以获得 1.5 kb 左右的目的片段. 当然, 这一技术中增加了加尾反应及 DNA 回收等步骤, 但与限制性内切酶消化及接头连接等操作相比, 还是较为容易. 总之, 当需要在高度复杂的基因组中进行染色体步行时, 锚定 PCR 技术提供了一种可供研究者选择的便捷方法.

致谢 本工作作为国家自然科学基金(批准号: 30170747)和国家高技术研究发展计划(批准号: 2001AA212161, 2001AA224011)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Ochman H, Gerber A S, Hartl D L. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, 1988, 120: 621~623
- 2 Arveiler B, Porteous D J. Amplification of end fragments of YAC recombinants by inverse polymerase chain reaction. *Technique*, 1991, 3: 24~28
- 3 Akiyama K, Watanabe H, Tsukada S, et al. A novel method for constructing gene-targeting vectors. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: e77
- 4 Shyamala V, Ames G F-L. Genomic walking by single-specific-primer polymerase chain reaction: SSP-PCR. *Gene*, 1989, 84: 1~8
- 5 Warshawsky D, Miller L. A rapid genomic walking technique based on ligation-mediated PCR and magnetic separation technology. *Biotechniques*, 1994, 16: 792~798

- 6 Moynihan T P, Markham A F, Robinson P A. Genomic analysis of human multigene families using chromosome-specific Vectorette PCR. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 4094~4095
- 7 Sterky F, Holmberg A, Alexandersson G, et al. Direct sequencing of bacterial artificial chromosomes (BACs) and prokaryotic genomes by biotin-capture PCR. *J Biotechnol*, 1998, 60: 119~129
- 8 Kilstrup M, Kristiansen K N. Rapid genome walking: A simplified oligo-cassette mediated polymerase chain reaction using a single genome-specific primer. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: e55
- 9 Yan Y X, An C C, Li L, et al. T-linker-specific ligation PCR (T-linker PCR): An advanced PCR technique for chromosome walking or for isolation of tagged DNA ends. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: e68
- 10 Parker J D, Rabinovitch P S, Burmer G C. Targeted gene walking polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19: 3056~3060
- 11 Liu Y G, Mitsukawa N, Oosumi T, et al. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J*, 1995, 8: 457~463
- 12 Terauchi R, Kahl G. Rapid isolation of promoter sequences by TAIL-PCR: The 5-flanking regions of *Pal* and *Pgi* genes from yams (*Dioscorea*). *Mol Gen Genet*, 2000, 263: 554~560
- 13 Frohman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 8998~9002
- 14 Loh E Y, Elliot J F, Cwirla S, et al. Polymerase chain reaction with single-sided specificity: Analysis of T cell receptor α chain. *Science*, 1989, 243: 217~220
- 15 Ohara O, Dorit R E, Gilbert W. One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 5673~5677

(2004-04-06 收稿, 2004-05-16 收第 1 次修改稿, 2004-06-30 收第 2 次修改稿)

· 书 讯 ·

《组织工程》(影印版)

编者: (美) B. Ø 帕尔森, S. N. 巴蒂

出版: 科学出版社 2004 年 6 月

定价: 55.00 元

本书是 Prentice Hall 出版社新近推出的生物工程原理与应用丛书之一, 全面阐释了主要生理组织的当前生物医学工程研究, 包括心血管、内分泌、神经、视觉、听觉、消化和呼吸系统. 主要分为 4 部分: 定量细胞和组织生物学, 包括组织块、组织动力学、形态发生、干细胞、细胞程序与调和等; 细胞和组织分化, 包括高通量生物学数据、细胞和组织特性、细胞和组织培养和基因转移等; 工程学方法与设计, 包括时间常数、缩放比例、细胞分离、生物材料成型与制作等; 临床应用, 包括常规方式、宿主适应

和治疗性组织的生产等.

本书为读者提供了众多实用的定义、生理基础数据表格以及参考书目、索引. 同时, 还介绍了骨髓、骨骼肌和软骨等组织器官的组织工程. 此外, 本书还提出了组织工程研究中的一些难点和重点问题. 通过阅读本书, 读者会对组织工程及其细胞生物学基础有一个全面清晰的了解, 也会获得更多创新的想法来进一步探索这一日益发展并且壮大的研究领域.

本书适合生物工程、生物材料、生物医学、生物化学、分子生物学以及医学等相关研究领域的高年级本科生、研究生以及教学科研人员参考使用.