

一步 PCR 法进行基因片段高效融合

陈国梁^{1,2}, 苗娜¹, 张金文¹, 王蒂¹

(1. 甘肃农业大学 农学院 甘肃 兰州 730070 2. 延安大学 生命科学学院 陕西 延安 716000)

摘要:采用一种不需要限制核酸酶和连接酶的方法:一步重叠 PCR 法将马铃薯块茎 2 种淀粉合成关键酶 gbss 和 ssII 的基因片段融合,该方法在一个 PCR 反应体系中通过 4 个引物 2 个模板一次扩增得到一个含有马铃薯块茎 2 种淀粉合成关键酶 gbss 和 ssII 片段的融合基因 gs3。结果表明:一步重叠 PCR 法是一种简便、经济、有效的融合基因构建方法。

关键词:重叠 PCR; RNAi; 基因融合

中图分类号:S 603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)08-0169-03

RNA 干涉(RNAi-RNA interference)是由同源性 dsRNA 引起的序列特异性基因沉默现象,在动、植物和真菌中广泛存在并被证实。与反义 RNA 表达技术以及基因敲除技术相比, RNA 干扰能够强有力地抑制序列特异的基因表达,具有抑制效率高,操作简便、迅速等优点。其优越性不仅表现在可操作基因的范围和突变的种类扩大了,而且对目的基因的表达有了可控性,是一种比反义 RNA、共抑制方法更为有效的下调基因表达的技术^[1],该技术在研究植物基因功能和改良作物品质等领域有良好的应用前景。研究表明^[2-3]以 98~1 000 bp 碱基大小为靶标构建的植物 dsRNA 的表达载体,均能产生有效干扰。因此,利用 RNAi 技术静默一个、甚至整个基因家族的多个基因或几个基因家族的基因已不再是难题^[4],使得用一含有多基因靶位点的 RNAi 载体进行遗传转化获得同时改变多个品质性状的转基因作物成为可能,那么高效、快速多个基因片段的融合技术也就成为实现这一设想的关键。

传统的基因片段的重组构建以限制性内切酶和 DNA 连接酶为基础,通过一系列的酶切连接反应将各片段逐步连接起来。这种方法费时费力,不但在连接过程中引入了不必要的酶切位点碱基序列,而且对于过长片段连接有时难以找到合适的酶切位点,过短的片段又增加了连接和鉴定的难度。为了克服传统的重组构建方法的缺陷,出现了以聚合酶链式反应为基础的片段拼接技术—融合 PCR 技术。但其在应用过程中还有很多方面需要改进,如首先必须应用特异性引物,对各片段

进行独立扩增、分别纯化、回收才能进行融合扩增;一般要进行两步 PCR 反应,延长了试验时间,增加了实验成本及操作程序等。基于以上现实,采用了重叠 PCR 一步法成功构建了一个含 gbss 和 ssII 基因片段的融合基因 gs3,用于 RNAi 植物表达载体的构建,由于该方法不需要限制性内切核酸酶和连接酶对基因进行酶切、连接及筛选,与传统的融合 PCR 技术相比只需要一个 PCR 反应就可以得到融合基因,大大缩短了反应所需时间,降低了反应操作难度,方便了融合基因的构建,为基因片段重组提供了快速简捷的途径。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

菌株 E. coli DH5 α ; 质粒 LS-9(含 gbss 基因)、质粒 pEGS3(含 ssII 基因)均为课题组从马铃薯“陇薯 3 号”品种中克隆出的目的基因 cDNA,克隆载体 pGEM-T Vector 购自 Promega 公司。

1.2 工具酶和试剂

试验所需的限制性内切酶和 Taq 聚合酶均购自宝生物工程(大连)有限公司,小量 DNA 胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物技术公司,抗生素及标准 DNA 分子量 Marker 购自天为时代公司,其他试剂均为进口或国产分析纯,PCR 引物合成和 DNA 序列测定由上海生物技术有限责任公司完成。试剂均为进口或国产分析纯,PCR 引物合成和 DNA 序列测定由上海生物技术有限责任公司完成。

1.3 引物设计

以 gbss(gi:21470)和 ssII(gi:1911165)基因的 cDNA 全序列为依据,考虑到采用 PCR 拼接 2 个基因片段及最终实验目的,确定选择用于拼接的 cDNA 片段 gbss 基因的为 ORF 中 1~261 之间的片段(261 bp),ssII 基因的为 ORF 中 2 164~2 407 之间的片段(244 bp)。用于扩增 gbss 基因、ssII 基因片段的引物采用 Oligo6.0 分析软件

第一作者简介:陈国梁(1974),男,陕西定边县人,讲师,在读硕士,研究方向为植物生物技术。E-mail: glc9359@163.com.
通讯作者:张金文。E-mail: jwzhang305@163.com.
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471101)。
收稿日期:2008-02-24

设计, 依次为命名为 gl-1、gl-2; gl-3、gl-4, 4 条引物构成如图 1 所示, 其组成如下:

gl-1 5'GC GGA TCC CTC GAG ATG GCA AGC ATC ACA GCT TC 3',

gl-2 构成(含 ssII 基因片段非编码链 5' 端 23 bp gbss 基因片段非编码链 5' 端 22 bp),

5'CAT TTT CAG CAG GCG ACA TTT TAC CCA CAA AGA TCA AGT TCA TTC 3',

gl-3 构成(含 gbss 基因片段编码链 3' 端 22 bp 和 ssIII 基因片段编码链 5' 端 22 bp),

5'GAA TGA ACT TGA TCT TTG TGG GTA AAA TGT CGC CTG CTG AAA ATG 3',

gl-4 引物构成(ssII 基因片段非编码链 5' 端 22 bp 及 22 bp 碱基序列),

5' TTC GAT TCA TCA GCA CTT GCA GTA ACA ACA TCA CCA AGG CCT CC 3'.

以上引物中, 为了后续试验得以顺利进行, 分别在融合基因上、下游引物中引入酶切位点和一 22 bp 碱基序列(见引物中下划线部分序列)。

1.4 DNA 的酶切、连接、转化

常规分子生物学操作均按文献[5]进行。

1.5 gbss、ssII 基因片段的 PCR 一步融合扩增

在基因片段的 PCR 融合扩增试验中, 以含目的基因的质粒为模板进行片段融合, 即以质粒 LS-9、质粒 pEGS3 为模板, 配成 25 μ L 的反应体系(含 Taq 酶缓冲液、dNTP、Taq 酶、gbss 与 ssII 基因的各个基因片段的上下游引物各 1 μ L, 浓度为 20 nM), 94 $^{\circ}$ C 4 min、95 $^{\circ}$ C 55 s、50 $^{\circ}$ C 45 s、72 $^{\circ}$ C 50 s, 进行 5 个循环 72 $^{\circ}$ C 3 min 后, 反应参数变为 95 $^{\circ}$ C 55 s、54 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 2 min, 循环 5 次, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 另加入 25 μ L 的反应溶液(含 Taq 酶缓冲液、dNTP、Taq 酶、所设计融合基因的 5' 端片段的上游引物及 3' 端片段的下游引物各 1 μ L, 浓度为 10 μ M); 95 $^{\circ}$ C 55 s、54 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 2 min, 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 融合产物命名为 gs₃。

1.6 基因融合产物的酶切检测与测序

将融合产物 gs₃ 的 PCR 产物回收, 与 T-easy 载体连接、转化, 通过 PCR 和酶切筛选出阳性重组质粒(命名为 pGEM-TR)并测序。

2 结果与分析

2.1 PCR 一步法构建融合基因的原理

以含有目的基因的质粒为模板进行基因片段融合扩增过程如图 1 所示。以质粒 LS-9、质粒 pEGS3 为模板, 进行 5 个循环扩增, 目的是分别扩增出 gbss、ssII 基因片段; 接下来的 5 个循环扩增是在提高退火温度的条件下(由 50 $^{\circ}$ C 提高到 54 $^{\circ}$ C), 利用已经扩增出来的 2 个片段互为模板和引物, 进行基因融合扩增, 形成融合基因。

同时抑制了 2 个片段的单独扩增; 第 2 次 30 个循环, 以形成的融合基因为模板, 融合基因的 5' 端片段的上游引物及 3' 端片段的下游引物各即 gl-1、gl-4 为引物扩增融合基因全长序列。

2.2 gbss、ssII 片段的一步 PCR 融合扩增结果

利用 1.5 的方法进行 2 片段的 PCR 融合扩增, 扩增产物 gs₃ 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 观察到大小为 560 bp 的特异条带(图 2), 其大小与预期片段大小相符合。初步表明以含目的基因的质粒为模板, 通过重叠 PCR 一步法可以构建含目的基因片段的融合基因。

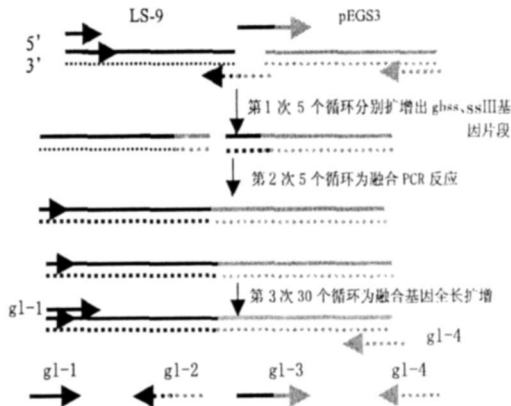


图 1 PCR 一步法构建基因融合原理图

注: 实线代表编码链 虚线代表非编码链

2.3 基因融合产物的酶切与测序结果

将阳性重组质粒 pGEM-TR 通过 PCR 和双酶切进行重组质粒的筛选。结果(图 3)表明, pGEM-TR 质粒的 PCR 扩增片段以及酶切片段的大小与预期结果相符, 说明该质粒已经重组上融合基因。经测序与原序列比较表明, 与 GenBank 中已公布的序列的完全一致。进一步确定以含目的基因的质粒为模板, 通过一步重叠 PCR 法可以成功地构建含 gbss 和 ssII 基因片段的融合基因。

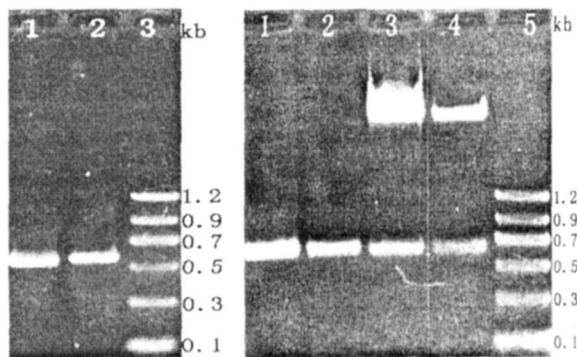


图 2 以含 gbss、ssII 基因的质粒为模板进行两片段融合扩增

注: 1,2 gs₃, 3 MarkerII

图 3 重组质粒 pGEM-TR 的酶切与 PCR 鉴定

注: 1,2 PCR 鉴定,

3,4 酶切, 5 MarkerII。

3 讨论

融合基因构建常用方法多是通过限制酶将 2 个 DNA 片段进行酶切, 然后通过连接酶将 2 个具有相同末端酶切位点的 DNA 片段进行连接。这不仅需要对 DNA 片段的限制性酶切位点有所了解, 而且有时很难找到合适的内切酶对 DNA 片段进行酶切, 因此某种程度上限制了该方法的应用。重叠 PCR 通过精心设计引物只在一个 PCR 反应中将 2 个、甚至 2 个以上的基因构建成融合基因, 同时还可在中间加入所需的特殊序列及所需酶切位点, 或者引入突变碱基, 进行单核苷酸突变。还可以利用该方法在所期望的一些位点将 2 种 DNA 片段连接起来, 而不需知道 DNA 片段的限制性位点, 这为构建没有适宜酶切位点的融合基因提供了便利, 方便了基因重组操作。

在应用重叠 PCR 一步法构建融合基因时, 所得融合基因条带单一、无杂带。可见直接以质粒为模板进行基因融合, 简便、快捷、有效。但应用时需要注意以下几点: ①在设计引物时, 尽可能使各个片段的引物 T_m 值接近或者一致, 同时各个片段引物的 T_m 值尽可能低于或高于融合基因上下游引物的 T_m 值, 以便在进行融合基因全长扩增时通过退火温度减少或抑制各个组成片段的扩增, 降低非特异性条带扩增, 这是保证融合基因构建成功的关键。②必须精心地调节引物的浓度比例, 这是融合 PCR 反应成功的另一个关键因素, 由于中间引物和融合基因的上、下游引物既能够扩增融合基因本身以又能扩增各个基因序列, 因此要适当调节中间引物的比例, 使得 PCR 反应获得最理想的结果。试验结果表明, 中间引物浓度为末端引物的 1/500 时, 主带明显, 没有非特异性扩增条带。③由于重叠 PCR 主要是利用融合片段的 3' 端的互补序列进行融合, 所以待融合的片段越长, 完整的融合产物的量越少, 可以通过适当的将待融合的片段间的同源互补区延长来提高产物的量^[9]。

虽然重叠 PCR 技术在实验室中已广泛应用, 如

Kuwayama^[7] 等将该技术应用到 *Dictyostelium discoideum* 的 *pkaC* 基因的敲除, 范宝昌^[8] 等应用该技术获得了登革热 2 型病毒的全长 cDNA 分子; Charlier^[9] 等用融合 PCR 构建了 MOC/ 黄热嵌合体病毒。但他们都是将单个序列回收后再融合, 而直接应用原始模板将 2 个片段通过一步 PCR 融合在一起的研究报道也有^[10], 但从结果看, 其目的产物甚少。该试验不仅通过一步法构建了一 560 bp 大小的融合基因片段, 而且该课题组还利用该方法获得了一 1 671 bp 大小的融合基因片段(相关论文待发表), 表明该方法至少对小片段基因的融合是有效的。

参考文献

- [1] Waterhouse P M, Graham M W, Wang M B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA[J]. PNAS, 1998, 95: 13959-13964.
- [2] Wesley S V, Helliwell C, Wang M B et al. Posttranscriptional gene silencing in plants[J]. Methods in Molecular Biology, vol. 265.
- [3] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, et al. Construct design for efficient, effective and highthroughput gene silencing in plants[J]. The Plant Journal, 2001, 27(6): 581-590.
- [4] Lawrence R J, Pikaard C S. Transgene-induced RNA interference: a strategy for overcoming gene redundancy in polyploids to generate loss-of-function mutations[J]. plant J, 2003, 36(1): 114-121.
- [5] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002: 762-774.
- [6] 黄留玉. PCR 最新技术原理、方法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [7] Kuwayama H, Obara S, Morio T, et al. PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vector[J]. Nucleic acid Res, 2002, 30(2): E2.
- [8] 范宝昌, 赵卫, 胡志君, 等. 扩增我国登革 2 型病毒的全长 cDNA 分子的融合 PCR 方法[J]. 军事医学科学院刊, 2001, 25(2): 137-139.
- [9] Charlier N, Molenkamp R, Leyssen P, et al. A rapid and convenient variant of fusion-PCR to construct chimeric flaviviruses[J]. Virol Methods, 2003, 108(1): 67-74.
- [10] 刘和, 陈英旭, 张文波, 等. PCR 一步法构建融合蛋白基因 fpg[J]. 遗传, 2004, 26(4): 525-528.

Construction of a Fused Gene from Two Kinds of Starch Synthases of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Stem Tuber by Using Overlap Section-PCR Method

CHEN Guo-liang^{1,2}, MIAO Na¹, ZHANG Jin-wen¹, WANG Di¹

(1. Agronomy Faculty of Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China; 2. College of Life Science, Yan'an University, Yan'an, Shanxi 716000, China)

Abstract: Overlap section-PCR, a method developed for fusion gene construction without the use of endonuclease and ligase, was performed to construct a fused gene. The Overlap section-PCR reaction system contained four primers and two templates and resulting PCR product, fused gene-gs3, consists of two sections: gbss and SS II's fragments gene, which was responsible for Starch Synthases. Thereafter this paper showed that the Overlap section-PCR method is one of rapid and convenient methods for fused gene construction.

Key words: Overlap polymerase chain reaction; Starch Synthase; Fusion gene; Potato