

反向 PCR 分离侧翼序列技术研究进展

王 静

(内蒙古大学 生命科学院生物工程中心, 内蒙古自治区牧草与特色作物生物技术重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010021)

摘 要:反向 PCR(inverse PCR, IPCR)是第一个依赖于 PCR 反应扩增旁侧序列的实验技术。IPCR 可以在一个反应过程中,同时扩增已知序列两端的旁侧序列,省时简便,结合 LR-PCR, RACE, SMART 等技术,应用范围日益广泛;但 IPCR 也存在一些缺点,酶切、自连过程受到很多不确定因素的影响。现总结 20 a 来利用该技术克隆旁侧序列的研究成果,并提出优化的反应体系,以期对此项技术有更加系统的认识。

关键词:IPCR;克隆;旁侧序列

中图分类号:Q 943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)03-0200-03

分子生物学研究过程中,阐明病毒、转座子的整合机理,寻找已知基因的启动子,分离基因调控区,分析转基因生物基因组中外源基因的插入位点,以及发现插入突变导致的新基因等研究都有赖于旁侧序列克隆技术的发展^[1]。因此,对侧翼序列克隆方法进行研究具有重要的理论与现实意义。

在聚合酶链式反应(PCR)技术发明前,筛选基因组文库是分离侧翼序列的唯一方法,然而,这种方法过程繁琐、效率低下。1985 年,美国 PE-Cetus 公司的 Mullis 等发明了 PCR 技术^[2],使体外扩增 DNA 序列成为现实。Ochman^[3]等发明了反向 PCR(inverse PCR, IPCR)技术,这是依赖 PCR 反应首次成功克隆已知序列旁侧序列的报道。随后,应用 IPCR 克隆旁侧序列的报道越来越多,方法也日趋成熟。现总结 IPCR 的研究现状、发展趋势和主要应用领域,以期使人们对此项技术有更加系统的认识。

1 反向 PCR 技术的原理

反向 PCR(inverse PCR,简称 IPCR)是克隆已知序列旁侧序列的一种方法,主要原理是用一种在已知序列中无切点的限制性内切酶消化基因组 DNA,后酶切片段自身环化,以环化的 DNA 作为模板,用一对与已知序列两端特异性结合的引物,扩增夹在中间的未知序列(如图 1 所示)。该扩增产物是线性的 DNA 片段,大小取决于上述限制性内切酶在已知基因侧翼 DNA 序列内部的酶切位点分布情况。用不同的限制性内切酶消化,可以得到大小不同的模板 DNA,再通过反向 PCR 获得未知片段^[4]。

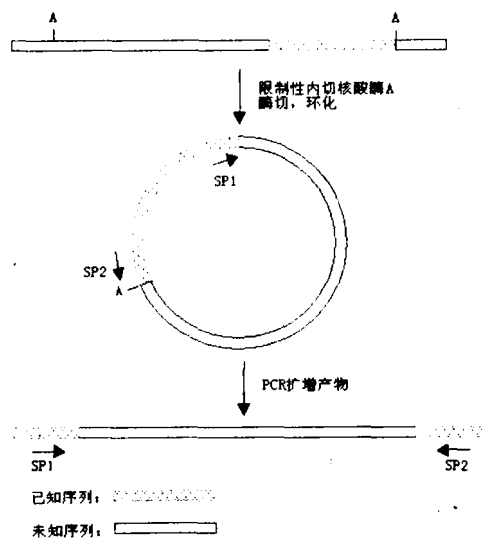


图 1 IPCR 原理图

2 反向 PCR 技术的发展

2.1 经典的 IPCR 技术

经典的 IPCR 过程包括:选择已知序列中不存在酶切位点的酶切基因组 DNA,以已知序列设计的探针进行 southern 杂交,确定含有已知序列的酶切片段,酶切片段自连接成环,特异性引物与已知序列的两末端结合,对夹在中间的未知序列区域进行扩增^[4]。1988 年 Ochman^[3]等第一次利用 IPCR 技术成功克隆旁侧序列。几乎同时,Triglia^[5]等,克隆旁侧序列试验中使用该方法也获得成功。

2.2 改进的 IPCR 技术

2.2.1 对 IPCR 技术过程的改进 环化后的闭环环状 DNA 在 PCR 变性反应中可能由于变性不彻底,使引物

作者简介:王静(1984-),女,在读硕士,主要研究方向为植物分子生物学及基因工程。E-mail:wangjing_imu@gmail.com。

收稿日期:2009-11-20

不能完全退火,PCR扩增效率下降,Silver和Keerikatte^[6]在分离BALB/c鼠病毒整合位点旁侧序列中,改进了经典IPCR技术。选择在已知序列内具有单一酶切位点的酶,将自连后的环状DNA再切成线状,显著提高了IPCR的扩增效率。若已知序列内没有合适的酶切位点,加热使环状DNA产生缺口,也可达到提高扩增效率的目的。Mirjam^[7]等采用改进的IPCR技术,在克隆农杆菌介导的转基因烟草T-DNA插入位点旁侧序列试验中,扩增出目的条带,并判断了转入植物内的T-DNA拷贝数。结果表明,基因组DNA经酶切环化后,再切成线状反向扩增,对特异性条带的产生必不可少。若已知序列较长,无合适的限制性内切酶切割基因组DNA,一般选择在已知序列中具有单一酶切位点的酶,将其切成2部分,再单独建立自连、PCR体系,扩增一端的未知序列(原理如图2所示)。Vincent^[8]使用这种方法成功克隆转座子Tn5(5 810 bp)插入序列的旁侧序列。Huang G^[9]等在克隆转座子元件Tn5插入序列旁侧序列的试验中,通过巢式PCR比较两轮扩增产物的有无和大小,替代了southern杂交检测目的片段的步骤,简化了IPCR反应。甲酰胺、二甲基亚砜(DMSO)等可在不影响Taq酶活力的情况下降低非特异性扩增。李竹红^[10]等在利用巢式PCR扩增哺乳动物基因组含量极微的靶序列实验中,加入5%甲酰胺,使IPCR体系的灵敏性和特异性显著提高,克隆出了2个KB(人口腔癌细胞)细胞中Tcl(线虫转座子,其2个反转重复末端旁两侧各含400 bp的线虫基因组DNA)转座子左侧末端的旁侧序列,该法重复性较好,耗时短,可用于克隆哺乳动物基因组中其它已知序列的旁侧序列。若研究材料序列复杂,对基因组DNA应用IPCR不能得到好的结果,以mRNA或cDNA为模板进行反应,可提高试验成功率。王莹等^[11]成功克隆出人宫颈癌单克隆抗体重链可变区基因。克隆表达基因的旁侧序列,也可采用此法,陆合等^[12]扩增出黑根霉R306的 Δ^6 -脂肪酸脱饱和酶基因的全序列。

2.2.2 IPCR技术与其它分子试验技术结合应用
IPCR克隆旁侧序列技术日趋成熟,但在实际应用中,有效扩增的旁侧序列较短,这导致IPCR过程是一个缓慢、重复性的工作。Benkel B F, Ying F^[13]首先将LR(long range)PCR和IPCR结合,扩增出鸡内生病毒的侧翼序列,最长的片段约6 kb。LR-PCR在理想状态下可扩增的DNA序列长达40 kb。洪宇植^[14]进一步改进技术,利用25~30 nt的序列特异性长引物,特异性的扩增出长达16 kb的序列,引物的高Tm值还可克服试验中假阳性高的不足。王德培^[15]等利用35 nt的长引物,成功克隆雅致枝霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因上游4 kb序列,经分析知该段序列为潜在启动子。将IPCR技术与

RFLP、RACE、SMART等技术结合形成新的试验体系,为满足不同试验提供了技术支持。IPCR与RFLP技术结合可定位外源基因插入位点,最早Knapp^[16]等将该技术应用于番茄转座子DS^{HPT}元件整合方式的研究中。Liu W H^[17]等首次应用以IPCR为基础的RFLP(iFLP)技术,确定结肠细胞、肿瘤细胞中一些低变异水平(MF<10⁻²)位点。Rossetti L C^[18]运用SMART技术得到硬骨鱼ds-cDNA后,结合IPCR克隆出了肾上腺皮质激素前体基因全长,比传统的RACE方法更快捷有效。IPCR技术应用范围日益广泛,可用于获得染色体步移的末端特异性探针^[6]、从总RNA中克隆未知cDNA序列、研究病毒序列、转基因及转座子的整合位点区域序列^[3,5-6]、医疗诊断^[17,19]等,是一种有潜力的旁侧序列克隆方法。但反向IPCR反应的酶切、自连接、PCR过程都受到很多不确定因素的影响,优化的体系对试验成功尤为重要。

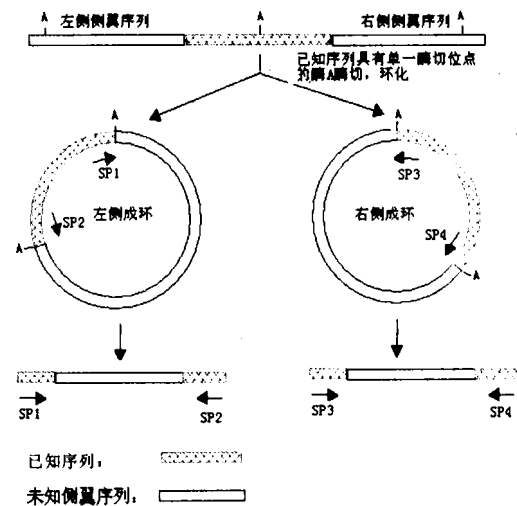


图2 改进的IPCR原理图

3 反向PCR反应体系的优化

3.1 基因组的提取

完整基因组DNA是IPCR成功的基础,在提取过程中应尽量避免对DNA的损伤,保证基因组完整性,得到高质量的基因组DNA^[11]。保证纯度,将杂蛋白含量降到最低,防止杂质成分影响后续酶切及连接反应。

3.2 酶切反应

要选用已知序列中不存在酶切位点或只具有单一酶切位点的酶,选用酶切效率高,特异性好,能产生粘性末端的常用酶。在试验中用过量的限制性内切酶,大的酶切反应体系和长时间处理对后续试验极为重要。也可选择使用不同的限制性酶分别进行酶切,建立酶切片段库,进行PCR,提供平行对照,增加试验准确性。

3.3 连接反应

线状 DNA 在低浓度下有利于自身环化连接。在酶切片段自连接反应中,若 DNA 浓度高或反应体积小,则可能生成多种串联多聚体,这是反应中扩增出多个产物的一个原因,所以,试验应采用大体积低浓度的连接体系,酶解片段浓度低于 $3 \mu\text{g/mL}$,对自身环化有利。将环化的 DNA 模板再切成线状,有利于 PCR 反应的扩增,此方法要求已知序列中有合适的酶切位点,不具通用性。采用 94°C 加热 10 min,使之产生缺口,可达到同样效果。

3.4 PCR 反应过程

试验中,可选用几个连续浓度梯度作为模板,摸索 PCR 反应的最佳模板浓度。采用巢式引物可降低 PCR 反应过程中非特异条带的扩增。由于模板较复杂,采用热启动 PCR 和降落 PCR,以提高反应灵敏性,使目的产物得到最大限度扩增。若扩增片段较长,引物一般要设计 25~35 bp,高的 T_m 值,可以减少非特异扩增产生的假阳性片段。

IPCR 技术的不断成熟,被越来越多地应用于生物研究各领域。IPCR 技术与其它分子生物学试验技术结合使用,使其应用前景越来越广阔。

参考文献

- [1] 韩志勇,王新其,沈革志. 反向 PCR 克隆转基因水稻的外源基因旁侧序列[J]. 上海农业学报,2001,17(2):27-32.
- [2] 洪登峰,万丽丽,杨光圣. 侧翼序列克隆方法评价[J]. 分子植物育种,2006,4(2):280-288.
- [3] Ochman H, Gerber A S, Hanl D L. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction[J]. Genetics, 1988, 120: 621-623.
- [4] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 671-672.
- [5] Triglia T, Peterson M G, Kemp D J. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequence[J]. Nuclear Acid Research, 1988, 16: 8186.
- [6] Silver J, Keerikate V. Novel use of polymerase chain reaction to amplify

cellular DNA adjacent to an integrated provirus [J]. Journal of Virology, 1989, 63: 1924-1928.

- [7] Mirjam P D, Ben M M, Dekker, et al. A quick method to estimate the T-DNA copy number in transgenic plants at an early stage after transformation, using inverse PCR[J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17: 151-153.
- [8] Vincent J J, Martin, William W M. An alternative inverse PCR (IPCR) method to amplify DNA sequences flanking Tn5 transposon insertions[J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 35: 163-166.
- [9] Huang G, Zhang L, Birch R G. Rapid amplification and cloning of Tn5 flanking fragments by inverse PCR[J]. Letters in Applied Microbiology, 2000, 31: 149-153.
- [10] 李竹红, 刘德培, 梁植权. 改进的反向 PCR 技术克隆转移基因的旁侧序列[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(6): 600-602.
- [11] 王莹, 李旭, 陈藏. 以反向 PCR 扩增抗人宫颈癌单克隆抗体重链可变区基因[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(5): 489-499.
- [12] 陆合, 朱钰, 黄尤田. 反向 PCR 克隆黑根霉 R306 $\Delta 6$ -脂肪酸脱饱和酶基因[J]. 微生物学杂志, 2008, 28(1): 24-27.
- [13] Benkel B F, Ying F. Long range-inverse PCR (LR-IPCR): extending the useful range of inverse PCR[J]. Genetic Analysis: Biomolecular Engineering, 1996, 13: 123-127.
- [14] 洪字植, 肖亚中, 房伟, 等. 长距离反向 PCR 技术高效扩增已知 DNA 片段的侧翼序列[J]. 激光生物学报, 2006, 15(2): 46-49.
- [15] 王德培, 孙伟, 李明春, 等. 利用长引物嵌套式反向 PCR 方法克隆雅致枝霉 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因上游序列[J]. 生物工程学报, 2006, 22(4): 581-586.
- [16] Knapp S, Larondelle Y, Rossberg M, et al. Transgenic tomato lines containing Ds elements at defined genomic positions as tools for targeted transposon tagging[J]. Mol Gen Genet, 1994, 243: 666-673.
- [17] Liu W H, Kaur M, Wang G, et al. Inverse PCR-Based RFLP Scanning Identifies Low-Level Mutation Signatures in Colon Cells and Tumors [J]. Cancer Research, 2004, 64(4): 2544-2551.
- [18] Hisato K, Yukio F, Yoichi S. Cloning of Full-Length cDNA of Teleost Corticotropin-Releasing Hormone Precursor by Improved PCR[J]. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 2006, 70(8): 1983-1986.
- [19] Liliana C R, Claudia P R, Irene B L, et al. Genotyping the Hemophilia Inversion Hotspot by Use of Inverse PCR[J]. Clinical Chemistry, 2005, 51: 1154-1158.

Research Progress of IPCR on Cloning Flanking Sequence

WANG Jing

(Inner Mongolia Key Laboratory of Herbage and Endemic Crop Biotechnology, Biotechnology Center, College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021)

Abstract: IPCR is the first flanking cloning technique, which relied on PCR. Using one reaction, IPCR process could clone two flanking ends of the known sequence. Combined with the technique of LD-PCR, RACE and SMART, it is widely used. However, in IPCR process, there are some problems such as the insensitivity of the reaction system and some unknown reasons which influenced the reaction process. This report summarized the achievement and the development of the IPCR during the past two decades, and proposed the improvement reaction system in order to give some inspirations for the future.

Key words: IPCR; clone; flanking sequence