

# 小立碗藓 *C3H* 基因敲除载体的构建及 *C3H1-nptII-C3H2* 目的片段最佳 PCR 条件筛选

崔彩云, 晏国洪, 姜山

(贵州师范大学 生命科学院, 贵州 贵阳 550001)

**摘 要:**以小立碗藓作为试材,将总长为 1 981 bp 的小立碗藓 *C3H* 基因分为上游片段(1 000 bp),下游片段(981 bp),并以此设计引物,得到上游臂(*C3H1*, 735 bp)、下游臂(*C3H2*, 700 bp)。在 *C3H1* 引物设计时引入 *XhoI*、*EcoRV* 酶切位点到两端, *C3H2* 设计时引入 *NdeI*、*BamHI* 酶切位点到两端。以小立碗藓总 DNA 为模板,通过 PCR 扩增得到 *C3H1* 和 *C3H2* 片段。将 *C3H1* 和 *C3H2* 插入到 pTN182 载体中,获得敲除载体(*C3H1-pTN182-C3H2* 质粒),通过 PCR 获得 *C3H1-nptII-C3H2* 目的片段,并且采用单因素方法研究引物浓度与退火温度对 PCR 产物浓度及特异性的影响。结果表明:引物浓度为 0.20  $\mu\text{mol/L}$ ,退火温度为 58.7 $^{\circ}\text{C}$ ,PCR 产物特异性最高且产物浓度较高。

**关键词:**小立碗藓 *C3H* 基因;基因敲除;载体构建;退火温度

**中图分类号:**S 781.42 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)05-0113-06

小立碗藓 (*Physcomitrella patens*) 属葫芦藓目 (Funariales) 葫芦藓科 (Funariaceae) 小立碗藓属 (*Physcomitrium*)<sup>[1]</sup>。小立碗藓具有较高的同源重组率,已成为植物生物学和功能基因组研究的一个模式系统<sup>[2]</sup>。

课题组在前期工作中发现,小立碗藓能够被灰霉菌感染,且出现细胞壁加厚及乳突状结构。在维管束植物的诱导抗病性反应中,植物通过细胞壁加厚及乳突结构抵御病原菌的入侵。研究结果还表明,木质素参与维管束植物细胞壁加厚及乳突的形成<sup>[3]</sup>。虽然苔藓植物是否能够合成木质素还存在一定的争议,但是经木质素特异性染料  $\text{KMnO}_4$  染色后在电子显微镜下观察发现,在小立碗藓的细胞壁加厚和乳突结构处的颜色加深(未发表),说明小立碗藓可能合成了木质素或类木质素。另外,有文献报道,小立碗藓有除 *F5H* 以外的合成木质素

的全套基因,具备合成木质素的生理基础<sup>[4]</sup>。还发现小立碗藓被灰霉菌感染后与木质素合成相关的关键酶基因上调表达(未发表)。以此为前提,课题组试图通过基因敲除的方法探究小立碗藓与病原菌互作过程中这些上调表达的酶是否参与合成木质素或类木质素。在木质素苯丙烷合成途径中香豆酸-3-羟基化酶基因(*C3H*)催化苯环 C3-位羟基化反应,最近有研究表明降低 *C3H* 活力一般会导致维管束植物木质素含量的降低以及木质素组成发生变化<sup>[5]</sup>。该试验构建了 *C3H* 基因的敲除载体,并对影响 PCR 产物特异性的引物浓度与退火温度进行了优化。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料小立碗藓由首都师范大学何奕骢教授提供。小立碗藓于 PPNH4 培养基上进行组织培养(25 $^{\circ}\text{C}$ ,光照期为 16 h 光照/8 h 黑暗,光照强度为 8 000 lx)。该试验的材料为培养 25 d 的小立碗藓。

*E. coli* DH5 $\alpha$  由贵阳医学院提供,用于制备感受态大肠杆菌。

质粒 PTN182 由首都师范大学何奕骢教授提供,作为基因敲除的原始质粒,PTN182 质粒中含有 *nptII* 基因,该基因在大肠杆菌中表现为抗卡那霉素。

**第一作者简介:**崔彩云(1990-),女,河北沧州人,硕士研究生,研究方向为资源植物工程学。E-mail:ccydywe@sohu.com.

**责任作者:**姜山(1969-),男,贵州贵阳人,博士,教授,研究方向为植物病理学。E-mail:kyosan200312@hotmail.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30860158);贵州省自然科学基金资助项目(31260426)。

**收稿日期:**2015-09-24

Taq PCR Master Mix、DNA Marker DL 15 000、限制性内切酶(XhoI、EcoRV、NdeI、BamHI)、T4-DNA 连接酶均购自宝生物工程(大连)有限公司;PCR 引物由宝生物工程(大连)有限公司;质粒提取试剂盒(OMEGA Biotek 公司);其它试剂均为国产分析纯。

## 1.2 试验方法

1.2.1 设计引物 在 GenBank 中找到维管植物 *Ginkgo biloba* C3H 基因的蛋白序列,以蛋白序列比对出 C3H 基因的 mRNA 序列,在 BLAST-*Physcomitrella patens* 1.1 网站中找到小立碗藓 C3H 基因的 DNA 全序列,全长 1 981 bp。然后,将小立碗藓 C3H 基因的 DNA 序列分成 2 个部分,前一部分 1 000 bp,后一部分 981 bp,并分别以其为模板利用 Primer5-Cracked 软件设计引物,为提高基因重组率,重组基因在 1 500 bp 重组率较高,因此最终设计得到:前一部分称为上游臂(C3H1,735 bp)、后一部分称为下游臂(C3H2,700 bp)。再利用 DNA-MAN 软件列添加酶切位点、保护碱基<sup>[6]</sup>。最终合成的引物序列见表 1。

表 1 引物序列

名称	序列	酶切位点
上游臂	C3H1-F 5'-CACCTCGAGCTCATTGATGGTTGGGTCA-3'	XhoI
	C3H1-R 5'-GCGGATATGCTTCATTCTTGCGATA-3'	EcoRV
下游臂	C3H2-F 5'-TCTCATATGAGAGCTGGATCAGGTGAGG-3'	NdeI
	C3H2-R 5'-TTGGATCTCTGAAATGGGAGGTGGAGA-3'	BamHI

1.2.2 上、下游臂基因片段的扩增 采用改良 CTAB 法提取总 DNA<sup>[7]</sup>,并用琼脂糖凝胶检测 DNA 条带是否提取成功。以提取的小立碗藓基因组 DNA 为模板,C3H1-F、C3H1-R 为引物进行 PCR 扩增上游臂基因片段<sup>[8]</sup>,反应体系见表 2;以 C3H2-F、C3H2-R 为引物进行 PCR 扩增下游臂基因片段,PCR 反应体系见表 2。上、下游臂的 PCR 反应条件均为:预变性 94℃ 5 min,变性 94℃ 30 s,退火 55℃ 30 s,延伸 72℃ 1 min,35 个循环,再延伸 72℃ 10 min,保存于 4℃。PCR 反应得到的目的基因产物用琼脂糖凝胶电泳检测。检测后,加入 4 μL 乙酸钠、120 μL 无水乙醇,-20℃,放置 1~2 h,终止反应;离心,12 000 r/min,12 min,倒掉上清;加 120 μL 70%乙醇,离心,12 000 r/min,12 min,重复 2 次,吹干。最终溶于无菌去离子水中,放置于-20℃冰箱备用。

表 2 PCR 反应体系

上游臂			下游臂		
药品	体积/μL	总体积/μL	药品	体积/μL	总体积/μL
C3H1-F	1		C3H1-F	1	
C3H1-R	1		C3H1-R	1	
小立碗藓基因组 DNA	3	50	小立碗藓基因组 DNA	1	50
Premix Taq™	25		Premix Taq™	25	
无菌去离子水	20		无菌去离子水	22	

1.2.3 C3H1-PTN182-C3H2 敲除载体的构建 采用分步酶切方法<sup>[9]</sup>,使用 XhoI、EcoRV 2 种限制性内切酶,分别酶切上游臂和 pTN182 原始质粒,酶切体系见表 3;酶切后在管中加入 4 μL loading buffer,44 μL 10%乙酸钠,120 μL 无水乙醇,-20℃,1~2 h 终止反应;离心,12 000 g,12 min,倒掉上清;加 120 μL 70%乙醇,离心,12 000 g,12 min,重复 2 次,吹干,最终溶于无菌去离子水中。取目的基因片段 9 μL,质粒 3 μL,连接液 12 μL 混匀,16℃ 过夜连接。取 0.5 μL 过夜连接产物,加入到 50 μL 大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,轻旋,冰浴 30 min,放入 42℃ 水浴锅热激 90 s,立即冰浴 3 min,加入 LB 液体培养基 1 mL,37℃ 振荡培养 1 h。取 500 μL 转化液涂布于含有卡那霉素(0.03 g/L)的 LB 固体平板培养基上,37℃ 将平板正置 20 min,待菌液完全被吸收后倒置过夜培养。将长出的菌落转移到新的含有卡那霉素的 LB 固体培养基并编号,待其长成单个菌落再进行验证。挑取再长出来的菌落液体培养,提取质粒(质粒 DNA 提取试剂盒),采用琼脂糖凝胶电泳的方法,将提取出来的质粒与原始质粒对比,选出比原始质粒条带高的菌落,将其质粒进行酶切验证和质粒 PCR 验证。以已经插入上游臂的质粒(pTN182-C3H1)为载体,使用 NdeI、BamHI 2 种限制性内切酶,酶切体系见表 3,采用与插入上游臂相同的方法插入下游臂并进行验证。最终构建好 C3H1-PTN182-C3H2 敲除载体,见图 1。为进一步验证载体构建是否成功,以 C3H1-PTN182-C3H2 质粒为模板,PCR 扩增出 C3H1-nptII-C3H2 目的基因片段送到上海生工进行测序。

表 3 酶切体系

药品	体积/μL	总体积/μL
酶(XhoI、EcoRV、NdeI、BamHI)	2	
buffer	4	
质粒(PTN182、pTN182-C3H1)	16	40
无菌去离子水	18	

1.2.4 C3H1-npt II -C3H2 基因 PCR 条件设计 通过 PCR 方法获得 C3H1-npt II -C3H2 目的基因片段,研究影响 PCR 产物特异性的引物浓度和退火温度。引物浓度分别选择 0.08、0.10、0.12、0.14、0.16、0.18、0.20、0.22 μmol/L;退火温度设置温度梯度为 56~60℃(表 4)。PCR 反应后,取一定量的 PCR 产物采用琼脂糖凝胶检测。以上 PCR 条件重复进行 3 次以确认重现性。

表 4 PCR 温度梯度

序号	1	2	3	4	5	6
温度/℃	56.0	56.3	57.0	57.8	59.1	60.0

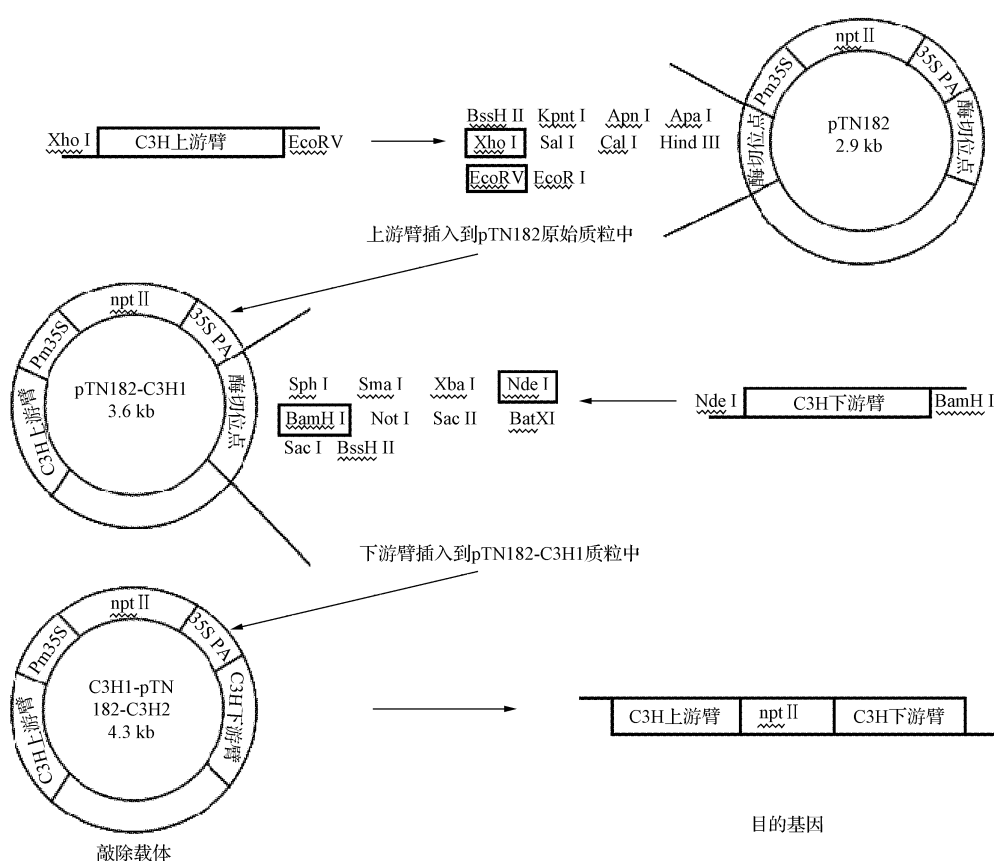
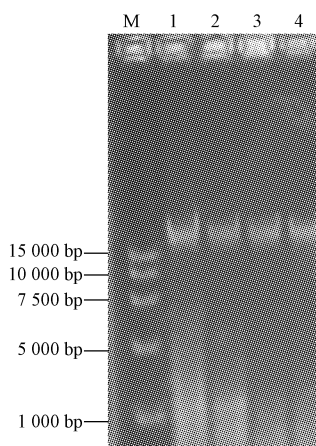


图1 C3H基因敲除载体构建策略图

## 2 结果与分析

### 2.1 小立碗藓总DNA与原始质粒检测

由图2可知,经过0.7%的琼脂糖凝胶电泳检测,小立碗藓基因组DNA条带清晰,可以看到点样孔有一定的亮度,推测可能有少量蛋白质的残留。以此为模板进行PCR扩增,可以扩增出目的基因片段。因此,蛋白质的少量残留对目的基因的扩增影响不大,可以用来做PCR反应的模板。



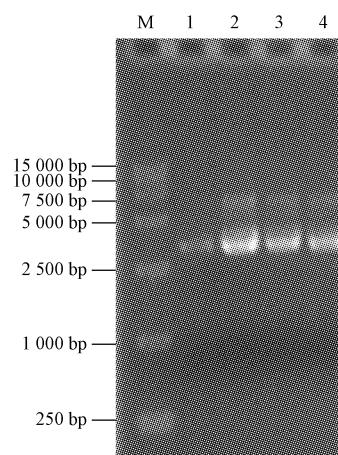
注:M,DNA Marker,1~4为提取小立碗藓总DNA。

图2 小立碗藓总DNA电泳图

由图3可知,经过0.7%的琼脂糖凝胶电泳检测,用质粒提取试剂盒提取的pTN182原始质粒条带清晰,可以用来做酶切。

### 2.2 C3H基因上、下游臂PCR扩增产物测定

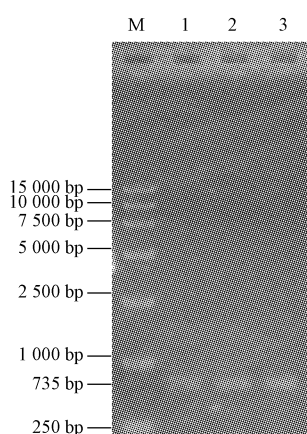
由图4、5可知,PCR产物经过0.7%的琼脂糖凝胶电泳检测,分别获得1个特异性条带,图4条带大小与上游臂735 bp相符,图5条带大小与下游臂700 bp相符,



注:M,DNA Marker,1为pTN182原始质粒,2~4为大肠杆菌扩增得到的pTN182原始质粒。

图3 提取pTN182原始质粒电泳图





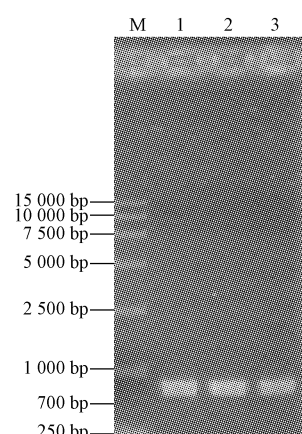
注:M, DNA Marker, 1~3 为 C3H 基因上游片段 PCR 产物。

图 4 C3H 基因上游片段 PCR 产物电泳图

上、下游臂的 PCR 产物电泳条带单一,没有引物二聚体。因此,可以用此 PCR 产物进行酶切反应。

### 2.3 C3H 基因上游臂插入结果鉴定

将第 2 次在含卡那霉素的 LB 培养基上长出的单个的菌落,挑到含卡那霉素的液体 LB 培养基中进行过夜培养,提取质粒验证结果如图 6。1 泳道的是 pTN182 原始质粒,2 泳道是为提取的阳性菌落的质粒,2 泳道的质粒条带位置明显的高于 1 泳道的质粒条带,说明 2 泳道的质粒的长度要大于 1 泳道的,上游臂可能插入到了原

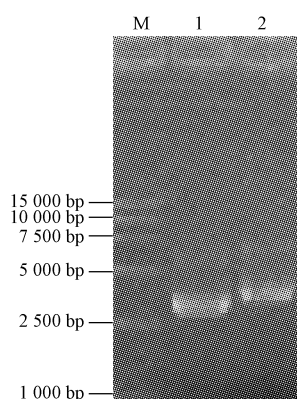


注:M, DNA Marker, 1~3 为 C3H 基因下游片段 PCR 产物。

图 5 C3H 基因下游片段 PCR 产物电泳图

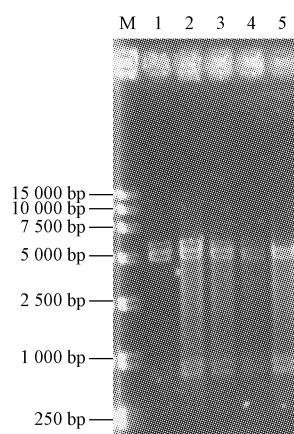
始质粒中。

以 XhoI、EcoRV 2 种限制性内切酶酶切图 5 中 2 泳道的提取质粒并采用琼脂糖凝胶验证,图 7 表明,酶切质粒可以切下 2 种长度的片段,较长的与 pTN182 原始质粒长度相当,短的与上游臂的长度相仿。以图 6 中 2 泳道提取质粒为模板、C3H1-F、C3H1-R 为引物进行 PCR 验证,图 8 显示,PCR 产物的长度也与上游臂长度相当。通过上述验证,证明上游臂插入到了 pTN182 原始质粒中。



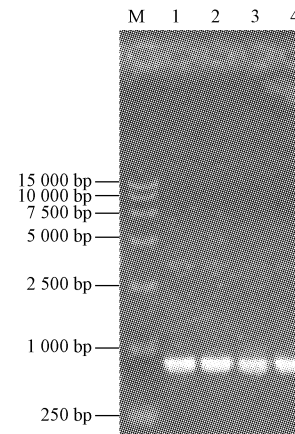
注:M, DNA Marker, 1 为 pTN182 原始质粒,2 为提取阳性菌落质粒。

图 6 质粒验证电泳图



注:M, DNA Marker, 1 为 pTN182 原始质粒, 2~5 为酶切产物。

图 7 酶切验证电泳图



注:M, DNA Marker, 1~4 为 PCR 产物。

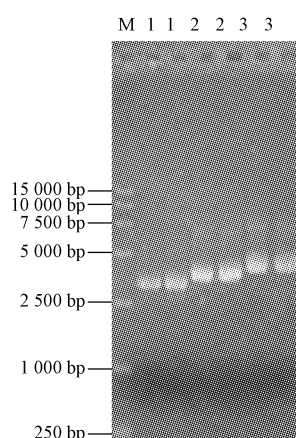
图 8 PCR 验证电泳图

### 2.4 C3H 基因下游臂插入结果鉴定

将已经插入上游臂的质粒 pTN182-C3H1 作为插入下游臂的载体。将第 2 次在含卡那霉素的 LB 培养基上长出的单个菌落,挑到含卡那霉素的液体 LB 培养基中进行过夜培养,提取质粒验证结果如图 9,1 泳道的是 pTN182 原始质粒,2 泳道是含有上游臂的 pTN182-C3H1 质粒,3 泳道为提取的阳性菌落的质粒,3 泳道的条带位置明显高于 2 泳道的质粒。下游臂可能

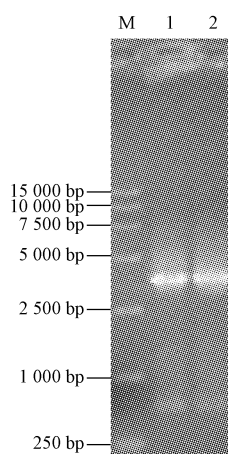
插入到含有上游臂的 pTN182-C3H1 质粒中。

以 NdeI、BamHI 2 种限制性内切酶酶切图 9 中 3 泳道中提取的质粒进行验证,图 10 表明,经过酶切在提取的质粒中切下 2 种长度的片段,较长的与 pTN182-C3H1 质粒长度相当,短的与下游臂的长度相仿。以图 9 中 3 泳道的提取质粒为模板、C3H2-F、C3H2-R 为引物进行 PCR 验证,图 11 表明,PCR 产物的长度与下游臂长度相当。通过上述验证,证明下游臂插入到了 pTN182-C3H1



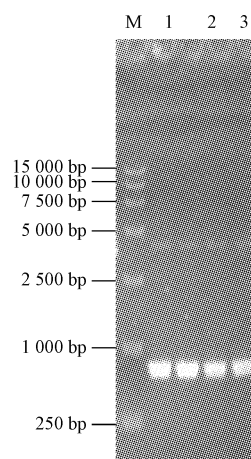
注:M, DNA Marker, 1 为原始质粒, 2 为 pTN182-C3H1 质粒, 3 为提取阳性菌落质粒。

图 9 质粒验证电泳图



注:M, DNA Marker, 1~2 为酶切产物。

图 10 酶切验证电泳图



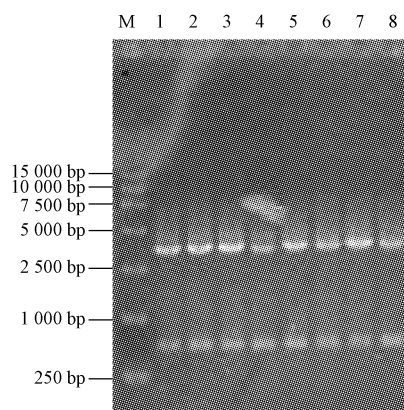
注:M, DNA Marker, 1~4 为质粒 PCR 产物。

图 11 PCR 验证电泳图

质粒中,上、下游臂均插入到 pTN182 载体中。

## 2.5 C3H1-pTN182-C3H2 目的基因最佳 PCR 条件的筛选

2.5.1 引物浓度 由图 12 可知,采用不同浓度的引物进行 PCR 仍出现非特异性的条带,说明改变引物的浓度不能提高 PCR 产物的特异性。



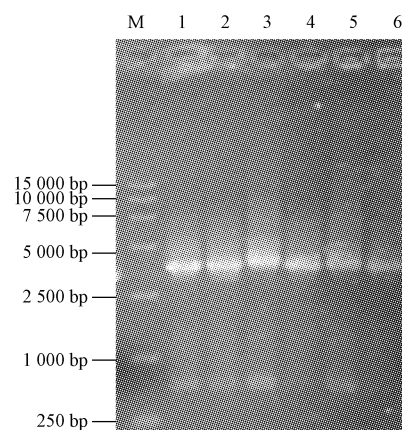
注:M, Marker, 1~8, 引物浓度为 0.08、0.10、0.12、0.14、0.16、0.18、0.20、0.22  $\mu\text{mol/L}$ 。

图 12 不同的引物浓度 PCR 产物电泳图

2.5.2 退火温度 不同的退火温度对 PCR 反应的影响结果见图 13。PCR 反应中退火温度决定反应的灵敏性和特异性,试验中退火温度为 56~60℃,在 57.8℃和 60.0℃特异性最高,同时 57.8℃比 60℃时目的条带更明亮,说明 PCR 产物浓度更大。因此,选择 57.8℃作为 PCR 反应的退火温度。

## 3 讨论

3.1 酶切位点的选择及 C3H1-nptII-C3H2 载体的构建 通过基因重组来取代小立碗藓中的 C3H 基因,将小立



注:M, Marker, 1~6, 退火温度分别为 56.0、56.3、57.0、57.8、59.1、60.0℃。

图 13 不同的退火温度对 PCR 产物电泳图

碗藓 C3H 的全基因分成上游臂(C3H1)和下游臂(C3H2)分别插入到 pTN182 质粒 *nptII* 基因的两端,最终得到与小立碗藓 C3H 基因进行重组替换的 C3H1-*nptII*-C3H2 基因。

在构建载体的过程中发现,酶切位点的设计对载体构建效率的影响很大。由于考虑到选择比较常用的酶切位点和其它一些问题,上游臂选择 *XhoI*、*EcoRV* 2 种酶切位点。总共挑取 20 个阳性单菌落液体培养,提取 20 个单菌质粒,其中 5 个单菌落中提取的质粒电泳条带高于原始 pTN182 质粒,插入率为 25%。下游臂选择 *NdeI*、*BamHI* 2 种酶切位点,以已经插入上游臂的 pTN182-C3H1 质粒作为插入下游臂的载体,操作与上游臂相同,经过多次试验都没有筛选得到插入下游臂的菌株,有阳性菌株但都是只插入了上游臂的菌株。排除菌株、转化等问题,通过查找文献,考虑最有可能的原因是



酶切反应出问题。原因可能为限制性内切酶失活;酶切反应时间;单酶切过程 2 种限制性内切酶酶切顺序;酶切位点设计<sup>[8]</sup>。验证 2 种限制性内切酶活性:采用一种限制性内切酶(2 种酶都验证)酶切环状质粒,将产物采用凝胶电泳验证只得到单一的条带,证明质粒被切开,限制性内切酶活性没有问题。通过上述试验说明酶切时间也没有问题。

改变单酶切过程 2 种限制性内切酶酶切顺序:其中先用 NdeI 酶切,再用 BamHI 酶切,得到 60 个阳性单菌落,其中只有 1 个阳性菌落提取的质粒通过验证插入了下游臂,插入率仅为 1.7%。先用 BamHI 酶切,再用 NdeI 酶切,并未筛选到插入了下游臂的菌株。虽然最终筛选得到插入下游臂的菌株,但工作量大且插入率太低,增加了构建载体的工作量。

酶切位点的设计,通过查找文献发现:下游臂选择 2 个酶切位点相邻太近,虽没有共用碱基但仍影响酶切的效率<sup>[9]</sup>。因此,在选择酶切位点时尽量选择有间隔的酶切位点,如若只能选择挨着的酶切位点,可以采用单酶切方法,尝试改变单酶切过程 2 种限制性内切酶酶切顺序以提高试验成功的概率,同时也提高载体构建的效率。

### 3.2 目的基因 PCR 条件的筛选

C3H1-nptII-C3H2 基因长度约为 3.5 kb,以质粒为模板,C3H1-F、C3H2-R 为引物 PCR 扩增,通过凝胶电泳检测发现,除目的条带外,同时还出现 1 条非特异性的条带,浓度低于目的条带,影响 PCR 产物的质量。为提高 PCR 反应的特异性,在不重新设计引物的前提下,考

虑影响最大的 2 个因素:引物浓度和退火温度。

从结果中可以看到,通过改变引物浓度来提高目的基因特异性效果不明显,但引物的浓度会影响产物的 PCR 产物的浓度,因此在设计 PCR 反应体系是要充分考虑到引物浓度的问题。退火温度的选择最终决定 PCR 产物的特异性,同时也影响到了 PCR 产物的浓度。因此,在 PCR 反应中如果有目的条带但同时出现非特异性条带,为提高试验效率可以先考虑改变退火温度来提高特异性。

### 参考文献

- [1] 刘艳,曹同,陈静文.有前景的模式植物小立碗藓的研究新进展[J].广西植物,2007,27(1):90-94.
- [2] 赵兔,赵晓刚,何奕昆,等.植物分子生物学研究极具前景的模式系统:小立碗藓[J].植物学通报,2004,21(2):129-138.
- [3] 蒋挺大.木质素[M].北京:化学工业出版社,2008:7-9,98.
- [4] XU Z,ZHANG D,HU J,et al. Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom[J]. BMC Bioinformatics, 2009,10(Suppl 11):S3.
- [5] VON ARNIM A C,DENG X W,STACEY M C. Cloning vector for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants[J]. Gene,1998,221:35-43.
- [6] 林万明.PCR 技术操作与应用指南[M].北京:人民军医出版社,1993.
- [7] 李荣华,郭培国.改进的 CTAB 提取植物 DNA 的方法[J].实验技术,2009,28(9):14-16.
- [8] SCHUETTE S,WOOD A M,GEISLER-LEE J,et al. Novel localization of callose in the spores of *Physcomitrella patens* and phylogenomics of the callose synthase gene family[J]. Annals of Botany,2009,103:749-756.
- [9] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W.分子克隆实验指导[M].金东雁,黎孟枫,侯云德,等译.2 版.北京:科学出版社,1992.

## The Construction of *Physcomitrella patens* C3H Gene Knock Out Vector and Optimum Condition of PCR for C3H1-nptII-C3H2 Target Fragment

CUI Caiyun, YAN Guohong, JIANG Shan

(School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550001)

**Abstract:** Taking *Physcomitrella patens* as experimental materials, the full gene sequence of C3H that was 1 981 bp in the *Physcomitrella patens* would be divided into upstream fragment (1 000 bp), the downstream fragment (981 bp). Primers were designed with upstream and downstream fragment, respectively. The first half was named upstream arm (C3H1, 735 bp) and the latter half was called downstream arm (C3H2, 700 bp). Using the total DNA of *Physcomitrella patens* to template and the designed primer of C3H1 and C3H2, amplified C3H1 which was adding restriction site was XhoI and EcoRV and C3H2 which was adding restriction site was NdeI and BamHI by PCR. The C3H1 and C3H2 were inserted into the pTN182 vector and knockout vector (C3H1-pTN182-C3H2 plasmid) was succeed. C3H1-nptII-C3H2 fragment was obtained by PCR. The research of the primer concentration and annealing temperature that had an effect on the concentration and specific of the PCR product was by the single factor method. The results showed that the specificity and concentration of PCR product was higher when primer concentration was 0.20  $\mu\text{mol/L}$  and annealing temperature was 58.7°C.

**Keywords:** *Physcomitrella patens* C3H gene; gene knock out; vector construction; annealing temperature