

TAIL-PCR 的改良及其在分离小麦基因启动子中的应用

仇艳光^{1,2}, 田景汉¹, 葛荣朝¹, 赵宝存¹, 沈银柱¹, 黄占景¹

1 河北师范大学生命科学院, 石家庄 050016

2 白求恩医学院, 石家庄 050081

摘要: 在经典 TAIL-PCR(Thermal asymmetric interlaced PCR)的基础上, 对其进行了如下四处改进: 用 10 个碱基的 RAPD 引物代替 16 个碱基的随机兼并引物作为 PCR 中的随机引物; 将较低特异性循环的复性温度由 44°C 降至 29°C; 增加 5 个高特异性反应循环, 减少 5 个较低特异性反应循环; 用单引物对第三轮 PCR 产物进行初步鉴定。利用改进的 TAIL-PCR 方法分离了小麦 X 基因的 5' 未知的侧翼序列, 与 GUS 基因融合后转入拟南芥, 通过组织化学检测分析表明分离到的 5' 侧翼序列具有启动子功能, 同时说明改进的 TAIL-PCR 能更好地应用到较复杂基因启动子的分离。

关键词: 热不对称交错 PCR, 随机引物, 启动子

A Modified TAIL-PCR and Its Application in Isolating Gene Promoter of Wheat

Yanguang Qiu^{1,2}, Jinghan Tian¹, Rongchao Ge¹, Baocun Zhao¹, Yinzhu Shen¹, and Zhanjing Huang¹

1 College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

2 Bethuen Military Medical School, Shijiazhuang 050081, China

Abstract: Using a modified TAIL-PCR technique, the 5'-flanking region of the X gene in wheat was successfully isolated. Two novel modifications of the TAIL-PCR were introduced here: using a battery of random 10-mers as the short arbitrary primers instead of three degenerate 16-mers; using 29°C instead of 44°C as the annealing temperature for the low-stringency cycle; increasing five high-stringency cycles and reducing five low-stringency cycles; and using single primers for the third round of product identification. Isolated 5'-flanking region was fused to the GUS gene, and tested for expression in Arabidopsis plants. Histochemical analysis of the transgenic plants showed the report gene was driven by isolated 5'-flanking region. Modified TAIL-PCR technique could isolate rapidly the promoter of any gene from organisms with large genomes.

Keywords: TAIL-PCR, RAPD (random amplified polymorphic DNA), promoter

刘耀光等^[1]1995 年设计并发展的热不对称交错 PCR (Thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR) 方法, 最初用于 YAC 和 P1 载体克隆基因的分离。其基本原理是利用 3 个嵌套的载体序列特异性引物和一个短的随机简并引物(Arbitrary degenerate primer,

AD)组合, 进行 3 次 PCR 反应。特异性引物的 T_m 值一般在 57~62°C 之间, 而 AD 引物的 T_m 值则在 44~46°C, 采取高温特异性扩增与低温随机扩增相间进行的特殊的热循环程序以达到特异产物扩增的同时, 抑制由随机引物产生的非特异性扩增的目的。

Received: September 4, 2007; **Accepted:** December 13, 2007

Supported by: the Natural Foundation of Hebei Province, China (No. 2007000250).

Corresponding author: Zhanjing Huang. E-mail: huangzhanjing@sohu.com

河北省自然科学基金项目(No. 2007000250)资助。

Liu YG 等用这种方法成功分离了 YAC、Pl^[1]和 BAC^[2]载体的插入序列和拟南芥 T-DNA 插入的侧翼序列^[3]。经典的 TAIL-PCR 中用特异引物和 AD 引物进行组合, 引发 PCR 反应。

特异性引物和简并引物的选择直接影响扩增的效果。而 AD 引物的设计要参考密码子使用表, 注意生物的偏好性。因为许多兼并混合物中的引物不是特异性针对目的模板, 所以使用时需要较高引物浓度(2.5~5 μmol/L)。再有由于 AD 引物存在有限的结合位点, 对于个别的侧翼序列, 即使使用不同的简并引物也难以扩增到阳性结果。基于以上 TAIL-PCR 中存在的问题, 我们进行了新的改进。结果表明, 改进后的 TAIL-PCR 方法可以更好的用来从较大复杂基因组中分离基因的 5 侧翼序列。

1 材料和方法

1.1 材料

普通小麦(*Triticum aestivum*)、Columbia 野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)。

1.2 方法

1.2.1 小麦 *Triticum aestivum* 基因组 DNA 的提取

用经典的 CTAB 法提取小麦基因组 DNA。

1.2.2 TAIL-PCR 扩增小麦耐盐相关基因 X 的 5 侧翼序列

为扩增小麦耐盐相关新基因 X(未发表)的 5'未知侧翼序列, 我们对经典的 TAIL-PCR 进行了改进。第一: 用 10 个碱基的 RAPD 引物代替了 16 个碱基的随机兼并引物作为 PCR 中的随机引物; 第二: 将较低特异性循环的复性温度由 44°C 降至 29°C; 第三: 增加 5 个高特异性反应循环, 减少 5 个较低特异性反应循环; 第四: 用单引物对第三轮 PCR 产物进行初步鉴定。

根据已知的 X 基因序列, 在基因的 5 端设计 3 个长约 21 bp 的特异性巢式引物 SP1、SP2、SP3(Sp1: 5'-CGCCAACCACAACACAACATT-3', Sp2: 5'-GCACAGACGCACCAGGAAATC-3', Sp3: 5'-CCCCATCTCGCTCAATCAAAC-3')(图 1)。用 10 个碱基长的 RAPD 引物代替原来 TAIL-PCR 中 16 个碱基的随机兼并引物。

以 100 ng 的小麦基因组 DNA 为模板, 3 个特异性的巢式引物和 RAPD 引物进行 TAIL-PCR 扩增。将第一轮的 PCR 产物稀释 50 倍作为第二轮 PCR 反应的模板, 第二轮 PCR 产物稀释 50 倍作为第三轮

PCR 反应的模板。各轮 PCR 反应体系见表 1, 反应条件见表 2。用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳对第二轮和第三轮 PCR 产物进行检测。



图 1 X 基因 5' 端结构图(阴影部分为起始密码子)

Fig. 1 Structure of X 5' region(the start codon shown by shadow)

表 1 TAIL-PCR 反应混合液的组成

Table 1 Composition of TAIL-PCR reaction mixture

Reagent	Amount in primary Reaction/μL	Amount in secondary reaction/μL	Amount in tertiary reaction/μL
10×PCR buffer	2	2	2
2 mmol/L dNTPS	2	2	2
10 μmol/L gene specific Primer	1	1	1
10 μmol/L RAPD Primer	4	4	4
Template	1	1	1
Taq DNA polymerase (5u/μL)	0.2	0.2	0.2
ddH ₂ O to	20 μL	20 μL	20 μL

表 2 改进后的 TAIL-PCR 反应条件

Table 2 Modified cycling conditions used for TAIL-PCR

Reaction	File No.	Cycle No.	Standard thermal condition
Primary	1	1	92°C(3 min), 95°C(1 min)
	2	10	94°C(30 s), 58°C(1 min), 72°C(2 min)
	3	1	94°C(30 s), 25°C(3 min), ramping to 72°C over 3 min, 72°C(2 min)
	4	5	94°C(30 s), 29°C(1 min), 72°C(2 min)
	5	12	94°C(30 s), 58°C(1 min), 72°C(2 min)
Secondary	6	1	94°C(30 s), 58°C(1 min), 72°C(2 min)
	7	12	94°C(30 s), 59°C(1 min), 72°C(2 min)
	6	1	94°C(30 s), 29°C(1 min), 72°C(2 min)
Tertiary	8	10	94°C(30s), 58°C(1 min), 72°C(2 min)
	6	1	94°C(30 s), 58°C(1 min), 72°C(2 min)
	6	1	94°C(30 s), 29°C(1 min), 72°C(2 min)

1.2.3 第三轮 PCR 产物的克隆和测序

经琼脂糖凝胶电泳检测, 将大于 300 bp 的 TAIL-PCR 扩增产物进行凝胶回收, 用单引物再一次验证扩增产物的特异性, 然后连到测序载体 pGM-T vector。鉴定后对阳性克隆进行测序。

1.2.4 启动子启动功能鉴定

(1) 表达载体构建和转化拟南芥: 对测序产物与 X 基因序列进行同源性比对, 确认为 X 基因 5'侧翼序列后, 设计合成上游引物 promoter-S: 5'-AAGCTTTCCTCTACTCCTCGCT ATC-3', 引入 *Hind* III 位点, 下游引物 promoter-AB: 5'-GGATCCCTCGCTCAATCAAACCTCTA-3', 引入 *Bam*H I 位点。然后以小麦基因组 DNA 为模板, 利用高保真的 Pfu DNA 聚合酶进行 PCR 反应, 反应条件为 95°C 5 min; 94°C 30 s, 59°C 1 min, 72°C 2 min; 共 35 个循环, 72°C 延伸 10 min。将扩增产物经琼脂糖凝胶电泳、回收加 A 后连到载体 pGM-T vector, 获得 pT-D18。鉴定后对阳性克隆进行测序。

用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切 pT-D18 质粒, 将切下的 X 基因启动子插入到用同样的内切酶去除 CaMV35S 启动子的植物表达载体 p1300-35S-GUS

中, 转化大肠杆菌, 筛选阳性克隆, 得到 X 启动子驱动基因的植物表达载体 p1300-Xpro-GUS。用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切鉴定该重组体后, 通过液氮冻融法转化到根癌农杆菌 GV3101 中。然后用 Floral Dip 法^[4]转化拟南芥, 收集种子, 在潮霉素抗性培养基 (1×MS +25 mg/L Hyp) 上筛选转基因植株。提取转基因植株的总 DNA 为模板, 用 promoter-S 和 promoter-AB 做引物进行转基因植株的 PCR 检测。

(2) 转基因拟南芥植株 GUS 基因表达检测: 将潮霉素抗性培养基上培养 14 d 的阳性苗转入 X-Gluc 溶液中, 37°C 保温 2 h, 取出后用 70%酒精褪色, 观测植株染色情况。

2 结果

2.1 小麦基因组 DNA 的提取

用 CTAB 法^[4]提取小麦基因组 DNA, 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测发现基因组 DNA 比较完整(图 3)。

2.2 小麦耐盐相关基因 X 的 5'侧翼序列分离

用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳对第二轮和第三轮 PCR 产物进行检测。在所选的 20 个 RAPD 引物和基因的特异巢式引物(SP1、SP2、SP3)组合中, 多数

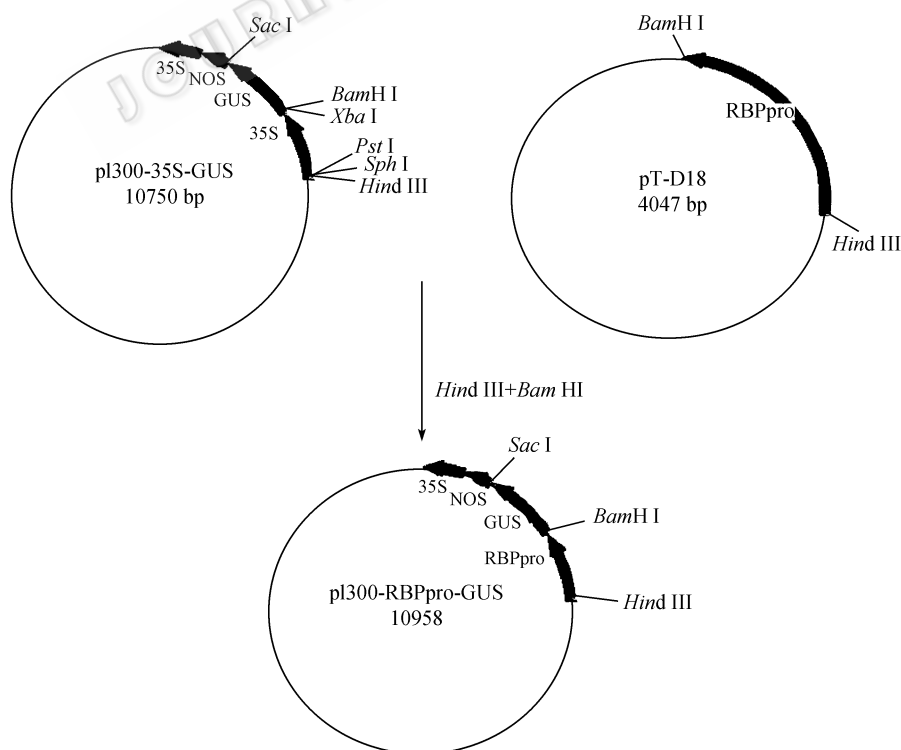


图 2 p1300-Xpro-GUS 表达载体的构建

Fig.2 Construction of p1300-Xpro-GUS expression vector

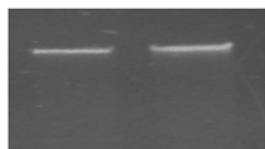


图3 小麦基因组 DNA 的电泳检测

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of wheat genomic DNA

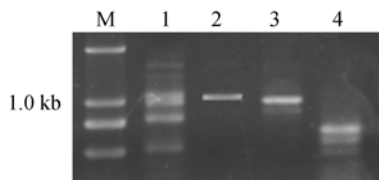


图4 TAIL-PCR 产物的电泳分析

Fig. 4 Analysis of TAIL-PCR products by agarose electrophoresis

M: DNA marker; 1: products of the secondary PCR by D18; 2: products of the tertiary PCR by D18; 3: products of the secondary PCR by A11; 4: products of the tertiary PCR by A11

能扩出不同大小和亮度的产物, PCR 扩增产物大小从 300 bp 到 1200 bp 左右。以 RAPD 引物 A11 和 D18 为例, 这两种引物组合在第三轮 PCR 反应中均有清晰的扩增带(图 4)。将 D18 第三轮 PCR 产物中 1.1 kb 条带进行回收连接后测序, 去除载体序列后得到 1077 bp 的 DNA 序列。通过把第三轮 PCR 产物序列和 X 基因序列进行比对, 发现所得序列的 3' 端与 X 基因 5' 端序列相互重叠, 说明扩增得到 1077 bp DNA 序列确实为 X 基因的 5' 侧翼序列。

2.3 p1300-Xpro-GUS 酶切鉴定和转基因植株的 PCR 检测

将构建好的 p1300-Xpro-GUS 用 *Hind* III 和 *Bam*HI 双酶切后, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 样品均切出了约 1077 bp 的片段, 说明构建成了由 X 5' 侧翼序列驱动的 GUS 表达载体。

采用 X 5' 侧翼序列引物 promoter-S 和 promoter-AB 进行 PCR 检测, 转基因拟南芥 DNA 样品均能扩出 1077 bp 的片段(图 5), 表明 p1300-Xpro-GUS 表达载体得到成功构建。

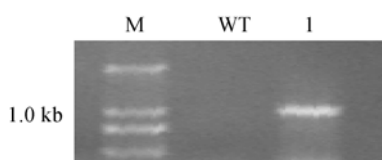


图5 转基因拟南芥基因组的 PCR 检测

Fig. 5 Identification of transgenic plants by PCR

M: DL2000 marker; WT: columbia *Arabidopsis*; 1: transgenic *Arabidopsis*

2.4 转基因拟南芥植株 GUS 基因组织化学染色

为确定 X 5' 侧翼序列的启动子活性, 对转基因拟南芥植株进行组织化学染色。将在潮霉素抗性培养基上培养 14 d 的阳性苗转入含有 X-Gluc 的溶液中, 37°C 保温 2 h, 用 70% 酒精脱去叶绿素, 可以观察到整个植株不同部位呈现蓝色(图 6)。说明我们用改良的 TAIL-PCR 扩出的 X 基因启动子具有启动功能。

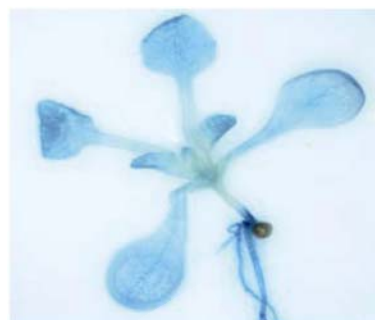


图6 转基因拟南芥植株的 GUS 染色

Fig. 6 Histochemical analysis of transgenic *Arabidopsis* plants

3 讨论

TAIL-PCR 技术最初用来分离 P1 和 YAC 末端, 是扩增与已知 DNA 序列邻近的未知侧翼序列非常有效的方法^[1]。在本实验中我们进行了一些改进。

首先是用 10 个碱基的 RAPD 引物代替了传统 TAIL-PCR 中 16 个碱基的随机兼并引物作为 PCR 短的引物。这种方法可以利用实验室原有 RAPD 引物或直接从生物公司购买, 省去了费时随机兼并引物的设计, 比较经济。最主要的可以通过筛选大量的 RAPD 引物以扩增到更长的目的序列。通过初步鉴定也增加了测序的目的性和有效性。并且用改进的 TAIL-PCR 技术成功快速的分离了小麦 X 基因的 5' 侧翼序列。转基因拟南芥植株 GUS 基因组织化学染色表明该基因的 5' 侧翼序列具有启动子活性。

第二是将较低特异性循环的复性温度由 44°C 降至 29°C。通过多次 TAIL-PCR 和测序, 我们发现多数情况下, 由于整个 TAIL-PCR 程序中, 较低特异性反应的温度为 29°C, 往往是 RAPD 引物 3' 末端 3~4 个碱基和目标序列配对, RAPD 引物和特异性引物就可以在目标序列之间进行延伸。那么理论上, 在基因组 DNA 上每 64(4³) 或 256(4⁴) 个碱基就应有我们所需的特异性产物, 这样就极大的增加了经典 TAIL-PCR 的扩增效率。

第三是增加 5 个高特异性反应循环, 减少 5 个较低特异性反应循环。进行此项改进的原因是因为小麦基因组较大, 本实验 PCR 程序调整后, 可以增多含有目的序列的 DNA 片段, 更有利于特异性产物的获得。

另外本实验中采用了单引物扩增对第三轮 PCR 产物进行特异性鉴定。即在 PCR 体系中仅加入基因特异引物 sp3 或 RAPD 引物, 如果扩增结果中不出现和目的片段大小一样的条带, 则确定第三轮的 PCR 产物为特异性扩增产物。对第三轮产物做的单引物对照, 进一步验证了扩增产物的特异性, 测序结果也表明验证的扩增产物均为目的片段。

综上所述, 与传统的 TAIL-PCR 相比, 经过改良的 TAIL-PCR 除了具有其原有的特异性高, 快速等优点外, 更简单、高效。现在利用 RAPD 引物和 3 个巢式基因特异性引物组合的 TAIL-PCR 技术, 已从基因组复杂的六倍体小麦中成功克隆了 5 个新基

因的启动子(待发表), 长度多在 1~1.5 kb 左右。

REFERENCES

- [1] Liu YG, Whittier RF. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, 1995, **25**: 674-681.
- [2] Liu YG, Huang N. Efficient amplification of insert end sequences from bacterial artificial chromosome clones by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1998, **16**: 175-181.
- [3] Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J*, 1995, **8**: 457-463.
- [4] Heliport SL, Wood J, Hicks JB. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Bio Rep*, 1983, **1**: 19.
- [5] Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J*, 1998, **16**: 735-743.

Millipore 2008 亚洲生物高峰论坛在京举办

为了加强与全球用户学术和技术的沟通与交流, 密理博中国有限公司联合北京大学干细胞研究中心和北京大学生命科学院干细胞与再生细胞生物学实验室于 2008 年 3 月 5 日在京主办了“Millipore 2008 亚洲生物高峰论坛——表观遗传学与干细胞研究的科学前沿”, 本次盛大的高峰论坛特邀维也纳医学院 Egon Ogris 博士和南加州医学院 Martin Pera 博士, 以及北京大学邓宏魁教授、军事医学科学院输血医学研究所裴雪涛教授、中科院上海生化所徐国良教授等国内外在该领域的权威学者作了精彩的学术报告, 报告内容主要涉及了“Protein Phosphatase 2A (PP2A): Biogenesis of an enzyme involved in signal transduction; Role of DNA Methylation in Mammalian Development; Epigenetic Regulation of Fibulin5 in Lung Cancer Metastasis; Characterization, Genetic Stability, and Differentiation of Human ES cell; Directed differentiation of human embryonic stem cells”等方面的最新研究进展。国内近 300 名表观遗传学和干细胞研究的知名学者参加了此次盛会。本次北京站论坛活动的成功举办促进了中外表观遗传学与干细胞研究学者的学术交流, 也充分体现了该公司“共同推动生命科学的发展”的企业愿景。

密理博(Millipore)公司成立于 1954 年, 总部位于美国麻省, 在全世界设有 47 个办事处, 为 100 多个国家提供产品和服务。目前全球雇员超过 6000 人, 在美国、法国和日本等国家拥有 7 家大型生产工厂, 主要生产过滤膜及膜过滤产品。20 世纪 80 年代, 密理博公司进入中国市场。先后在香港、北京、上海、广州及成都设立了办事机构, 并于 2000 年 4 月在上海浦东外高桥保税区建立了密理博(上海)贸易有限公司。欲了解公司更多详情, 请登陆密理博中国主页 www.millipore.com/cn。