

小麦高分子量谷蛋白亚基基因片段的体外扩增*

顾其敏 李育庆 曹凯鸣 忻 骅 孙崇荣

(复旦大学生物化学系, 上海)

生物体尤其是高等动植物, 绝大多数基因的拷贝数是很低的, 如果没有基因扩增的手段, 几乎无法研究基因的结构及其与表达的关系。当今分子生物学发展中最基本的技术之一基因克隆, 实际上就是基因体内扩增 (in vivo amplification) 的技术。近年来发展了一种基因体外扩增 (in vitro amplification) 的新技术, 又称多聚酶链反应法 (Polymerase chain reaction PCR)。特别当引入了耐热性 DNA 多聚酶后, 使该方法具有了更加广泛的应用价值^[1]。与常规的基因克隆相比较, 它具有快速、简易和高度灵敏的优点。在研究小麦贮藏蛋白基因结构的工作中, 我们应用这项技术从小麦核 DNA 中成功地扩增到高分子量 (HMW) 谷蛋白基因的数个片段, 并测定了其中被克隆的片段顺序。

进行多聚酶链反应, 关键是要使用两个特定的探针, 处于有关基因片段的两侧, 并分别与正反义链互补。为此, 我们利用编制的软件 Homology^[2] 和国外已发表的 HMW 谷蛋白基因的顺序^[3-5]相比较, 找出了 HMW 谷蛋白基因中高度保守顺序和重复保守顺序的区域, 合成了两个正义链的探针 FD1 和 FD2 以及两个反义链的探针 FD3 和 R5。它们的顺序和特点分别如下:

FD1 5'ATCATCACCCACAACACCGAG-CA3': 正义链方向, 处于启动子区域, 基因间同源性达 100%

FD2 5'TGAACCTTCACCACGTCCCTA-TAAAAGC3': 正义链方向, 处于启动子区域, 基因间同源性达 93%

FD3 5'GTAGTACCCTTGTTGCCCTTG-TCC3': 反义链方向, 编码区内重复顺序

R5 5'AGTTGGGTAGTATCCTTGTTGT-CC3': 反义链方向, 编码区内重复顺序

我们以扬麦四号 (*Triticum aestivum*) 为材料, 用 CTAB 选择性沉淀法制得小麦核 DNA。取 0.01 μ g 核 DNA, 分别加入一对以不同正反义链探针组合的引物如 FD1 与 FD3、FD2 与 FD3、FD1 与 R5 以及 FD2 与 R5, Taq DNA 多聚酶 (Cetus 公司) 以及 4 种 dNTP。在下述条件下进行多聚酶链反应: 93°C 变性 1.5min, 53°C 退火 3min, 72°C 链反应 15min, 共进行 35 个循环。扩增后的产物经电泳检测, 表明在 FD1 与 FD3 和 FD2 与 FD3 这两对引物的链反应系统中都扩增得到约 0.6kb、1.3kb 和 1.7kb 等大小不同的片段。

上述扩增得到的约 0.6kb 的片段克隆到 Blue script 载体上并测定了顺序。结果表明 FD2 位于 HMW 谷蛋白基因启动子 CAAT box 下游区和 TATA box 之间, FD1 顺序位于 TATA box 的下游区, 而 FD3 则位于 FD2 下游约 580bp 处。FD2 与 FD1 间的顺序正是扬麦四号 HMW 谷蛋白基因的启动子区域, 与已报道的 HMW 谷蛋白基因的启动子区顺序同源性达 90% 以上。而 605bp 的顺序包括 HMW 谷蛋白基因的启动子区和部分氨基酸编码顺序, 与已报道的 HMW 谷蛋白基因顺序比较同源性达到 80% 以上。予期应用这些扩增得到的基因片段作为探针, 有可能从基因文库中筛到含有完整基因的重组子。

参 考 文 献

- [1] Saiki, R. K. et al.: *Science*, 1988, **239**, 487.
- [2] 陶 芸、金惠生、易 莹、顾其敏: 《生物化学与生物物理进展》, 1988, **15**(4), 289.
- [3] Forde, J. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 1985, **13**(19), 6817.

[本文于 1989 年 3 月 10 日收到]

* 国家高技术和“七五”攻关项目