

经验交流

两步 PCR 快速扩增东亚钳蝎 BmKIT3
3' cDNA 末端序列*朱顺义 李文鑫¹⁾

(武汉大学生命科学院病毒及分子生物学系, 武汉 430072)

摘要 对 3'-RACE 方法进行了修改, 采用一条特异性引物和一条通用 Oligo dT 引物成功地克隆了东亚钳蝎 BmKIT3 3' cDNA 末端, 与常规 3'-RACE 方法相比, 两步 PCR 方法具有节约成本、节省时间、增加反应特异性等优点, 尤其适用于生物活性肽基因的快速克隆和鉴定.

关键词 聚合酶链式反应, 3' cDNA 末端序列, 东亚钳蝎

学科分类号 Q78

PCR 是一种广泛应用于体外扩增特定 DNA 序列的方法, 具有快速、灵敏等优点, 目前已成功地运用于扩增和克隆 cDNA 或基因组基因以及分析 RNA 表达、遗传学诊断、突变检测、遗传工程等领域^[1]. 3'-RACE (快速扩增 3' cDNA 末端) 结合 5'-RACE 技术能够在几天之内获得全长的目的 cDNA^[2], 常规的 3'-RACE 技术存在着需要多条引物 (oligo dT-衔接头引物和衔接头引物或巢式引物), 必须多轮反应以及非特异性扩增等缺点^[2,3]. 我们在克隆东亚钳蝎毒素蛋白 3' cDNA 末端序列时, 发展了一种两步 PCR 的方法, 该法仅需一条特异性的上游引物, 结合下游通用引物 Oligo dT 一次 PCR 反应就能获得 3' cDNA 末端序列. 应用此法, 我们获得了东亚钳蝎软瘫型昆虫毒素 BmKIT3 的 3' UTR, 并发现 C 端第 3 个氨基酸编码序列与已报道的^[4]不同.

1 材料和方法

1.1 蝎毒腺组织总 RNA 的分离

采用热酚法制备总 RNA^[5].

1.2 第一链 cDNA 的合成

12 μ l 总 RNA (30 μ g), 加上 4 μ l (2 μ g) Not I Primer-adaptor (GIBCOBRL 公司) 和 32 μ l DEPC-双蒸水, 70 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 冷却后依次加入 16 μ l 5 $\times$ 第一链缓冲液, 8 μ l 0.1 mol/L DTT, 4 μ l 10 mmol/L dNTPs, 4 μ l 反转录酶 (GIBCOBRL 公司), 37 $^{\circ}$ C 作用 1.5 h, 用 RNase A 降解 RNA, 再用 Amersham 公司的 nucleon extraction and purification

试剂盒纯化第一链 cDNA, 用作 PCR 模板.

1.3 PCR 反应

根据 BmKIT3 和 AEP 的同源氨基酸区段 (YGASYGYC) 设计上游引物 5' pACGGTGC-CTCTTATGGTTATTG 3', 通用引物为 5' GAGCGGCCGCCCT₁₅. PCR 组分为: 2.5 μ l 10 $\times$ PCR 缓冲液, 2 μ l 2.5 mmol/L dNTPs, 1.5 μ l 25 mmol/L MgCl₂, 1 μ l 12.5 μ mol/L 上游引物, 1 μ l 第一链 cDNA, 2U Taq DNA 聚合酶, 加双蒸水至 25 μ l. 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 60 s, 58 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 120 s, 15 个循环后加入 1 μ l 6.25 μ mol/L 通用引物, 将复性温度提高到 64 $^{\circ}$ C, 其他条件不变, 继续进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min.

1.4 PCR 产物克隆、鉴定和测序

PCR 产物经琼脂糖电泳回收后, 用 Klenow 片段补平, 与 EcoR V 平端化的 pBluescript 载体连接, 转化感受态 DH5 α . 挑取白色菌落培养后提取质粒, 用 PvuII 酶切鉴定. 用 Promega 公司的银染测序试剂盒进行手工测序和用自动测序仪进行自动测序.

2 结 果

2.1 PCR 结果

PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 结果为一条均一的条带, 大小约 200 bp 左右 (图 1).

* 国家医药技术创新博士基金 (96-901-11-033) 及武汉市晨光计划 (965001037-24) 资助项目.

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (027) 87686509; E-mail: wxli@whu.edu.cn

收稿日期: 1998-12-21, 修回日期: 1999-04-20

2.2 重组质粒的鉴定

因 pBluescript 载体的 MCS 两侧各有一个 *Pvu* II 位点, 相距 448 bp, 所以用 *Pvu* II 酶切片段大小约 650 bp 左右的克隆用于测序 (图 2).

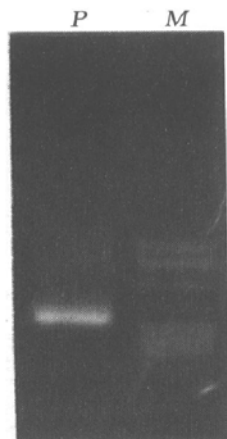


图 1 PCR 反应结果电泳检测

M: 分子质量标准 (pBR322/ *Msp* I); P: PCR 产物.

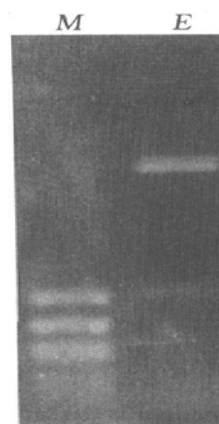


图 2 重组质粒酶切鉴定

M: 分子质量标准 (pBR322/ *Msp* I); P: *Pvu* II 酶切.

2.3 序列分析

该序列包括 BmKIT3 C 端 36 个氨基酸编码序列, 终止密码子, 拖尾序列 (包括加尾信号 AATAAA 和 poly (A) 尾, 图 3).

```

5'   AC GGT GCC TCT TAT GGT TAT TGC TGG ACC TGG GGA CTT GCA TGC TGG TGT GAA GGC
氨基酸   G  A  S  Y  G  Y  C  W  T  W  G  L  A  C  W  C  E  G
      CTT CCT GAT GAT AAG ACA TGG AAA TCT GAA AGT AAT ACA TGC GGT GGC AAA AAG TAA
氨基酸   L  P  D  D  K  T  W  K  S  E  S  N  T  C  G  G  K  K  *
      TTTTGTTTAAAAGTACATGTTAAAATAATCAAGTAAATACAGATAAAATAAAGAACCTTCACAAAAA
                                     加尾信号      poly(A)尾
      AAAAA 3'
  
```

图 3 BmKIT3 3' cDNA 末端核苷酸序列

3 讨 论

为了获得低丰度目的基因的 3' cDNA 末端序列, 通常采用常规的 3'-RACE 方法, 设计两个通用引物, 一个为 Oligo dT-衔接头引物, 另一个为衔接头引物. 首先采用特异性引物和 Oligo dT-衔接头引物进行扩增, 再将扩增的产物用作模板, 将 Oligo dT-衔接头引物换成衔接头引物再次 PCR^[2]; 或者设计两个上游特异性引物, 采用巢式 PCR, 减少非特异性扩增^[3]. 上述策略一方面需要合成更多的引物, 同时, 采用多轮扩增, 增加了 PCR 反应的错掺率, 而且比较费时, 特异性亦较差. 采用两步 PCR, 一次就可以获得包括整个 3' UTR 在内的 3' cDNA 末端序列, 并且特异性非常强. 对于小分子活性肽 (如蝎毒素蛋白) 的功能克隆, 该策略尤为适用. 因为只需根据有限的氨基酸序列 (8 个左右的氨基酸即可) 设计简并引物, 采用两步 PCR 就可以快速获得该蛋白质的 C 端完整序列.

两步 PCR 的第一步采用特异性引物进行单侧扩增, 增加目的序列的拷贝数, 第二步加入 Oligo dT 通用引物, 使其优先与目的序列结合, 从而达到扩增特定基因的目的. 本研究采用该法快速获得了 BmKIT3 的 3' cDNA 末端序列, 除获得了 3' UTR 外, 还发现 C 端第三个氨基酸序列与已报道的不同^[4].

参 考 文 献

- 1 Wu W. Rapid isolation of specific cDNAs or genes by PCR. In: Wu W, Welsh M J, Kautman P B, eds. Methods in Gene Biotechnology. Florida: CRC Press, 1997. 15~ 28
- 2 Michael A F, Michael K D, Gail R M. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, **85**: 8998~ 9002
- 3 Osamu O, Robert L D, Walter G. One-sided polymerase chain reaction: The amplification of cDNA. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, **86**: 5673~ 5677
- 4 朱新生, 张庭芳, 朱玉贤. 两个东亚钳蝎抑制型昆虫毒素 cDNA 的克隆及序列分析. 科学通报 (Zhu X S, Zhang T F, Zhu Y X. Chin Sci Bull), 1996, **41** (20): 1882~ 1886

- 5 Feramisco J R, Smart J E, Burrige K, *et al.* Co-existence of vinculin and a vinculin-like protein of higher molecular weight in smooth muscle. *J Biol Chem*, 1982, **257** (18): 11024~ 11031

Rapid Amplification of 3' cDNA End of BmKIT3 by Two-step PCR. ZHU Shun-Yi, LI Wen-Xin (Department of Virology and Molecular Biology, Wuhan University, Wuhan 430072, China).

Abstract A modified method of 3'-RACE (rapid amplification of 5'-cDNA ends) can rapidly amplify

3'-end of a cDNA only by using a specific primer and Oligo dT. Contrast with the typical 3'-RACE, two-step PCR not only have the advantages of less cost and shorter experimental time, but can also improve specificity of PCR. This method especially fits for rapid cloning and characterization of the genes encoding the peptides with biological activity.

Key words PCR, 3' cDNA end, *Buthus martensii* Karsch

一种快速简便的 CaCl_2 质粒转化方法

肖庚富 齐义鹏¹⁾ 李莉 易巍

(武汉大学病毒学及分子生物学系, 武汉 430072)

摘要 介绍一种质粒 DNA 快速转化方法. 质粒 DNA 加入感受态细胞, 冰浴 3~ 10 min, 涂布预热至 37℃ 的平板, 即可获得与常规转化方法相当的转化效率. 操作步骤由 5 步减至 2 步, 时间由 2 h 减至 3~ 10 min. 同时探讨了 Ca^{2+} 浓度、4℃ 保存时间等因素对感受态细胞转化效率的影响.

关键词 质粒, 转化, 感受态细胞

学科分类号 Q785

质粒转化是分子克隆中最常用的关键技术之一. 1972 年、1973 年 Cohen^[1,2] 用 CaCl_2 法成功地将 R 因子和重组质粒 DNA 导入大肠杆菌细胞. 此后, CaCl_2 法作为一项经典转化技术沿用至今, 其间虽有小的改进, 但都旨在提高转化效率. 转化过程一般需要 2 h 左右. 本文对大肠杆菌感受态细胞的制备、保存、质粒转化条件进行了较为系统的研究, 提出了快速、简便的质粒转化方法.

1 材料和方法

1.1 材料

受体菌 TG1、DH5 α 由本室常规保存. 质粒 pBlue 为 Stratagene 公司产品; 质粒 pCA13、pBHG11 为 Microbix Biosystems 公司产品; 质粒 pC53-SN3 由约翰·霍普金斯肿瘤中心 Vogelstein 教授赠送.

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌感受态细胞的制备

常规法: 取活化菌液 1.5 ml, 10 000 r/min 离心 15 s, 加冰预冷的 75 mmol/L CaCl_2 500 μl 重悬细胞, 冰浴 30 min, 再 10 000 r/min 离心 15 s, 加

CaCl_2 100 μl 重悬细胞. 用前新制或 4℃、-70℃ 冻存. 参见文献 [4, 5].

后冰浴法: 同上, 但在第一次离心加钙后, 省去冰浴 30 min 程序, 再次离心加钙, 置入 4℃ 冰箱, 保存 30 min 以上后使用.

1.2.2 质粒的转化

常规法: 100 μl 感受态细胞中加质粒 DNA 0.5 μl (0.01 ng), 冰浴 30 min, 42℃ 休克 90 s, 再冰浴 2 min, 加 400 μl LB 培养基, 37℃ 复苏 45 min. 取适量 (本实验中用 50 μl) 涂布抗生素平板. 37℃ 培养 12~ 16 h. 参见文献 [3, 4].

快转法: 100 μl 感受态细胞中加质粒 DNA 0.5 μl (0.01 ng), 冰浴 3~ 10 min. 取适量 (本实验中用 10 μl 或 50 μl) 涂布已预热至 37℃ 的抗生素平板. 37℃ 培养 12~ 16 h.

2 结果和讨论

Ca^{2+} 浓度是影响转化的重要因素. 我们首先比较了不同 Ca^{2+} 浓度制备的感受态细胞大肠杆菌

¹⁾ 通讯联系人. E-mail: mvlwu@whu.edu.cn

收稿日期: 1999-01-10, 修回日期: 1999-04-13