

经验交流

提高 PCR 产物克隆效率的几种途径*

史艳红 赵世民 孙勇如

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要 从提高 PCR 产物纯度, 增加产物特异性入手, 较详细地分析了影响 PCR 产物克隆效率的四个主要因素, 并就每种影响因素给出了较为详尽的提高克隆效率的途径。

关键词 PCR (多聚酶链式反应), 克隆效率, 连接作用

多聚酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增 DNA 已成为分子生物学的一个核心技术。如何提高 PCR 产物的克隆效率则是 PCR 产物克隆的一个关键问题。影响 PCR 克隆效率的因素主要有: a. PCR 产物的纯度; b. 非特异性扩增; c. PCR 产物 3' 端残基的影响; d. 平末端连接的困难。围绕这四个方面, 近年来一些实验室对如何提高 PCR 产物的克隆效率, 从不同的角度进行了探索, 找到了一些行之有效的方法。本文就这些技术与方法进行简要的论述。

1 提高 PCR 产物的纯度

PCR 产物的不纯, 对克隆效率影响很大。常规的纯化 DNA 片段方法应用于 PCR 产物纯化时, 往往难如人意。但使用 PCR 产物纯化试剂盒, 甚至短到 15min 内就能有效地从 PCR 产物中除去杂质, 这些杂质包括引物二聚体和扩增引物。当有不需要的非特异性扩增产物存在时, 可先从低熔点琼脂糖中纯化 DNA, 然后再用 Magic PCR prep 系统进一步纯化。

PCR 产物中残存的 Taq 酶也对克隆效率影响很大。原因是 Taq 聚合酶继续结合在 DNA 上, 造成了克隆的困难。这一点已被 Crowe 等^[1]工作所证实。因此对 PCR 产物限制性内切处理时, 克隆到相应载体之前, 加入蛋白酶 K 处理, 即可提高其克隆效率。

2 消除非特异性扩增

在用基因组 DNA 进行 PCR 扩增产生假带, 而用增加 Mg^{2+} 浓度、延长延伸时间、提高退火温度都不能克服非特异性扩增的情况下, 用适当的限制性内切酶消化基因组 DNA, 在待扩增区域之外切割环形或高分子量基因组 DNA, 用消化后的 DNA 作为 PCR 扩增的模板。这一步骤的效果是将引物可能错误结合的位点切开。而且, 切割以后靶 DNA 也更容易与寡核苷酸引物退火, 这样不仅有利于消除非特异扩增, 并且有利于更好地扩增靶 DNA。

为了减少由引物降解而导致的非特异性扩增, Bjourson 等^[2]报道了一种从非特异性扩增的 PCR 产物的混合物中进一步扩增特异片段的简单方法: 取部分 PCR 产物电泳后, 用滤纸去掉凝胶表面的溶液, 用皮下注射针头在所要的带上扎一小孔, 然后浸入新鲜的 PCR 反应混合物中进行扩增。用此法可在不到 1h 内分离出单一的 PCR 产物。此法简单易行, 可直接扩增目的带, 免去额外纯化步骤。

3 去除 3' 端单碱基突出 (over hangs)

PCR 产物从原理上讲应该是平末端, 然而直接平端克隆 PCR 产物的效率非常低。这是

*国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1993-10-20, 修回日期: 1994-03-09

因为 Taq 聚合酶具有将一个不依赖模板的核苷酸加到产物 3' 端的活性, 这样就导致了一个单碱基的 3' 端突出^[3]. 这些突出直接影响了平末端克隆.

去除这些单碱基突出, 可以利用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段的 3' — 5' 外切酶活性, 除去 PCR 产物上的 3' 端单碱基突出. 当然直接用带有 3' — 5' 外切酶活性的热稳定 DNA 聚合酶进行 PCR 反应也是方法之一.

Happi^[4]的方法更为省时简便, 只需调整 PCR 的程序: 去掉常规 PCR 反应最后的 7min 延伸, 然后将 PCR 产物直接连到平端载体上, 即可提高克隆效率.

由于 Taq 聚合酶在 PCR 产物的 3' 端加上的多余碱基主要是 A, David 等^[5]设计了一种 T 型载体, 通过适当的内切酶消化载体, 使载体带上单碱基 T. 这样任何带有 3' A 突出的 PCR 产物, 都可利用 AT 配对而直接克隆到这种 T 型载体上. 其效率可比平端克隆提高 50 倍.

4 改变连接反应提高克隆效率

4.1 应用 PEG (聚乙二醇) 的连接方法

Upcroft 等^[6]使用 15% PEG (Mr 为 2000), 将目的片段与载体形成多聚体, 然后用载体特异的限制性内切酶从多聚体上切下单个的重组分子, 用 PEG 连接环化, 可使平端连接效率大大提高.

4.2 采用粘末端克隆

通常在 PCR 引物设计时, 都在引物 5' 端引入适当的限制性内切酶位点, 用相应的内切酶消化产物后, 就可以利用产生的粘性末端克隆. 这种方法存在如下缺点: a. 目的片段内部可能存在相应位点; b. 为了保证有效的切割, 位点两端还要加上几个额外的核苷酸, 使引物合成费用增加; c. 有些限制性内切酶, 对处于 DNA 片段末端的识别序列作用效率极低; d. 有些限制性内切酶的缓冲液不相容, 消化要依次进行. 针对上述缺点, Kaluz 等^[7]用外切核酸酶 III (exonuclease III) 活性部分消化代替限制性内切酶消化, 在两端带有适当限制性内切

酶位点的 PCR 产物上, 产生相应的 5' 粘末端. PCR 产物经外切核酸酶 III (exonuclease III) 部分消化 (4℃ 约 30s) 后, 与相应的双酶解处理的载体连接, 克隆效率比直接用平端克隆高百倍以上.

Shuldiner 等^[8]的方法与众不同, 它绕过了连接反应这一难关. 设计两对引物: 一对 (a, b) 扩增目的基因; 一对 (c, d) 扩增线性质粒载体. a, b 的 5' 端与 c, d 的 3' 端有 24 个核苷酸互补, 得到的目的基因的 PCR 产物与线性质粒载体混合, 分成二等分, 一份以 a, c 引物扩增, 一份以 b, d 引物扩增, 扩增结果是 PCR 产物“连到”了质粒载体的互补 3' 端. 将两份混合经变性处理, 异源互补链退火, 线性重组质粒环化. 采用这种方法克隆, 转化效率可达 $5 \times 10^3 - 5 \times 10^4 / \mu\text{g}$ PCR 插入片段. Aslandiis 等^[9]的方法更为简便, 他们在目的片段与载体扩增引物的 5' 端各加上 12 个互补核苷酸, 扩增后分别用 T4 DNA 聚合酶的 3' — 5' 外切核酸酶活性处理, 使目的片段与载体都带上 12 个核苷酸的互补粘末端, 通过非共价连结, 目的片段与载体环化.

尽管目前已有许多改进 PCR 产物克隆效率的方法, 但进一步提高 PCR 产物的克隆效率, 仍然是一个需要努力达到的目标.

参 考 文 献

- 1 Crowe J S, Cooper H J, Smith M A *et al.* Nuclie Acids Res, 1991; **19**: 184
- 2 Bjourson A J, Cooper J E. Nuclie Acids Res, 1992; (**17**): 4675
- 3 Clark J M. Nuclie Acids Res, 1988; **16**: 9677
- 4 Happi T M. Nuclie Acids Res, 1992; **20**: 6427
- 5 David A M, Per N K, Herrnstadt C *et al.* Bio/technology, 1991; **9**: 657
- 6 Upcroft I, Healey A. Gene, 1987; **51**: 69
- 7 Kaluz S, Koelble K, Reid K B M. Nuclie Acids Res, 1992; **20**: 4369
- 8 Shuldiner A R, Scott L A, Roth J. Nuclie Acids Res, 1990; **18**: 1920
- 9 Aslandiis C, de Jong P J. Nuclie Acids Res, 1990; **18**: 6069

deaminase (ADA) mRNA, which included cleavage site selection, secondary structure analysis, biological function and homology analysis of the gene fragment around the cleavage site, four hammerhead ribozymes were designed. These ribozymes targeted sequence around the cleavage site have hairpine structure in which the cleavage site is in the ring part. This gene fragment is of biological importance in ADA gene. No homologies were found between these gene fragments and other murine genes. These characteristics of the gene fragment make them easy to be paired and cleaved by their respective ribozymes.

Key words adenosine deaminase, ribozyme, computer design

GST- π Gene Expression in Gastric Tumor. Qi Chunhui, Li Chunhai. (*Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (5): 463—466

Increased expression of the glutathione S-transferase (GST; E. C. 2. 5. 1. 18) π class isoenzyme is associated with both tumor and preneoplastic tissues. In order to further characterize the alteration of GST- π gene expression during progression of carcinoma, both the levels of GST- π DNA in one normal gastric tissue and 20 gastric tumor with perineoplastic normal tissue, and the GST- π RNA in the normal gastric tissue and 12 gastric poorly differentiated adenocarcinomas with corresponding perineoplastic normal tissues were tested using Dig-GST- π cDNA probe by Dot blot hybridization. No significant change of GST- π DNA level, but the expression level of GST- π RNA in 6 of eight gastric tumors was higher than in normal gastric tissue, and in 7 perineoplastic normal tissue of twelve poorly dif-

ferentiated adenocarcinoma was higher than that in its corresponding tumor. This suggests that the elevation of GST- π gene expression is related to gastric tumor, and earlier than the changes of cell morphology.

Key words human placental glutathione S-transferase, gastric tumor, gene expression

A Study of the Solution Behavior of Bovine Serum Albumin by Viscosimetry. Zuo Ju, Wang Zhigang, Liang Bo, Ouyang Di, Zhou Yongqia. (*Chemistry Department of Nankai University, Tianjin 300071*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (5): 466—469

The various differences of the hydrodynamic behavior of bovine serum albumin in NaCl, KSCN and KI solutions were evidenced by viscosimetry. Based on the empirical formula and viscosity data, the apparent axial ratios and apparent molecular volumes were calculated, which were also affected by the salt properties, correspondingly.

Key words bovine serum albumin, relative viscosity, intrinsic viscosity, apparent axial ratio, apparent molecular volume

The Ways to Enhance Cloning Efficiency of PCR Amplification Products. Shi Yanhong, Zhao Shimin, Sun Yongru. (*Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (5): 470—471

Some ways are introduced to enhance the cloning efficiency of PCR amplification products. The purification of PCR products, the speciality of PCR amplification, the remainder of Tag polymerase, the 3'-end projection of PCR products and the blunt end ligation are the main factors to affect the cloning efficiency.

Key words PCR, cloning efficiency, ligation