

经验交流

PCR 产物末端性质的分析研究*

夏庆杰 张思仲 武 辉 肖翠英

(华西医科大学附属第一医院, 成都 610041)

摘要 利用 PCR、UT-PCR、克隆及测序等技术, 对强直性肌营养不良基因 (MT-PK) 3'-非翻译区分别用 Taq, Taq+ Pwo DNA 聚合酶进行了扩增、克隆和测序, 研究了 PCR 产物末端组成情况, 并比较了上述两种 DNA 聚合酶对 PCR 产物末端的影响。结果在用 Taq DNA 聚合酶扩增的 PCR 产物主要得到 3' 端突出 1 个 A (占 67.3%, 35/52); 在 Taq+ Pwo DNA 聚合酶扩增的 PCR 产物末端中得到 3' 端+ A 的仅占 17.4%, 而- 1 的占 34.8%, 与前者显著不同。表明 PCR 扩增产物的末端是复杂多样的。

关键词 PCR 产物末端, UT-PCR, Taq DNA 聚合酶, Pwo DNA 聚合酶

学科分类号 Q782

PCR 反应过程及产物是很复杂的, 其中包括 PCR 产物末端的多样性。Sara^[1]发现 PCR 产物末端有附加的 A/T 对。James 则报道了 Taq DNA 聚合酶能够在平端双链 DNA 的 3' 端加上一个 A^[2]。但目前对 PCR 产物末端的复杂性只有定性的认识, 尚未见有定量研究。为此, 我们利用了在整个克隆过程中能够有效保全 PCR 产物末端的克隆新方法——同端化 PCR (uniformed terminal PCR, UT-PCR) 法^[3], 对 MT-PK 3'-UTR 的 CTG 重复序列 PCR 产物进行了克隆和测序, 对 PCR 产物末端的组成进行了定量研究。

1 材料与方法

1.1 材料

基因组 DNA 来自本室健康成年人外周血, 经本室常规方法制备。

MT-PK 3' 端非翻译区 CTG 重复序列及其旁侧序列^[4,5]扩增所用引物 JM169、JM170 由波士顿人类遗传中心黄新力先生和加拿大多伦多病儿医院遗传室胡修原先生惠赠。序列: JM169 5'-GAAGGGTCCTTGTAGCCGGGAA-3'; JM170 5'-GGAGGATGGAACAGGGACGG-3'; 用于 UT-PCR 的回文引物接头 (palindromic primer linker, PPL): 5'-CGGTACCAAAGCTTTGGATCCGNNN-3'; 回文引物 (palindromic primer, PP): 5'-CGGTACCAAAGCTTTGGATCCG-3'。由上海生工生物工程公司合成。Taq DNA 聚合酶亦购自上述公

司; T4 DNA 连接酶, Pwo DNA 聚合酶分别购自 BRL 公司和德国宝灵曼公司。克隆载体为 pBluescript KS⁺ 质粒, ALFexpress DNA 自动测序仪及测序试剂为 Pharmacia 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 MT-PK 3'-UTR 的 PCR 产物的获得: 用 JM169、JM170 及 Taq DNA 聚合酶对基因组 DNA 进行 PCR, 在 100 μ l 体系中, 含 10 $\times$ PCR 缓冲液 10 μ l, Mg²⁺ 1.5 mmol/L, dNTP 200 μ mol/L, 引物 JM169、JM170 各为 0.5 μ mol/L, 基因组 DNA 50 ng, Taq DNA 聚合酶 2 U。于 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min 后, 按 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s 循环 35 个周期, 再于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳纯化回收, 得 PCR 产物 a。以 Taq DNA 聚合酶 1.4 U, Pwo 0.6 U 的组合酶代替单一的 2 U Taq DNA 聚合酶, 其他同获得产物 a 的方法所述。回收 PCR 产物得 PCR 产物 b。

1.2.2 上述 PCR 扩增产物的克隆: 首先将 PPL 与 PCR 产物 a 和 b 进行连接: 冰浴中混匀 9 μ l/管连接酶反应体系, 内含 5 $\times$ T4 DNA 连接酶缓冲液 2 μ l, ATP 1 mmol/L, T4 DNA 连接酶 2 U, PPL 1 μ mol/L, 加入经 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冷乙醇中淬冷后的上述 PCR 产物 1 μ l (1 ng), 14 $^{\circ}$ C 连接 4 h, 得

* 国家自然科学基金 (39880025)、四川省计划生育委员会科研基金资助项目。

Tel: (028) 5422749, E-mail: zszg@wcums.edu.cn

收稿日期: 1999-01-10, 修回日期: 1999-07-21

到连接产物 a1 和 b1. 其次以 a1 和 b1 为模板, 进行 UT-PCR 扩增: 100 μ l 扩增体系内含 $10 \times$ PCR 缓冲液 10 μ l, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, 引物 PP 0.8 μ mol/L, dNTP 200 μ mol/L, a1 或 b1 1 μ l (0.1 ng), Taq DNA 聚合酶 2 U. 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min 后, 按 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s 循环 35 个周期, 再 72 $^{\circ}$ C 10 min. 乙醇沉淀, 溶于 15 μ l 超纯水中, 用于 *Bam*H I 切割, 低熔点琼脂糖凝胶电泳纯化回收大片段, 与 *Bam*H I 酶切并碱性磷酸酶去磷酸化处理的 pBluescript KS⁺ 质粒连接, 转化 JM107. 重组质粒和感受态细胞制备及细菌转化参照 Sambrook 等^[6] 介绍的方法. 结果分别得到两种转化平板 a 板和 b 板.

1.2.3 插入片段的测序统计与分析: 从 a 板和 b 板中随机挑取白色菌落, 在 LB (Amp⁺) 液体培养基中于 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜培养, 提取质粒 DNA 并电

泳鉴定, 含有插入片段者在 DNA 自动测序仪上用 Cy5 AutoReadTM 试剂盒及其所介绍的操作程序进行测序. 将 PCR 产物末端序列与 JM169 或 JM170 (或它们的互补序列) 及 PP 序列 (或其互补序列) 比较, 判断并记录其末端组成, 计算各类末端的百分比. 并对结果进行统计学处理.

2 结 果

从 a 板中随机挑取 78 个白色单菌落, 从 b 平板中随机挑取 29 个白色单菌落, 在 LB (Amp⁺) 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养, 提取的质粒 DNA 经酶切鉴定, 107 个克隆中除 4 个不含插入片段外, 其余均含预期大小的插入片段. 随机取 38 个来自 a 板和 14 个来自 b 板的含插入片段的质粒进行序列分析, 分别获得了 52 个和 23 个可确读的末端序列 (图 1). 统计结果见表 1.

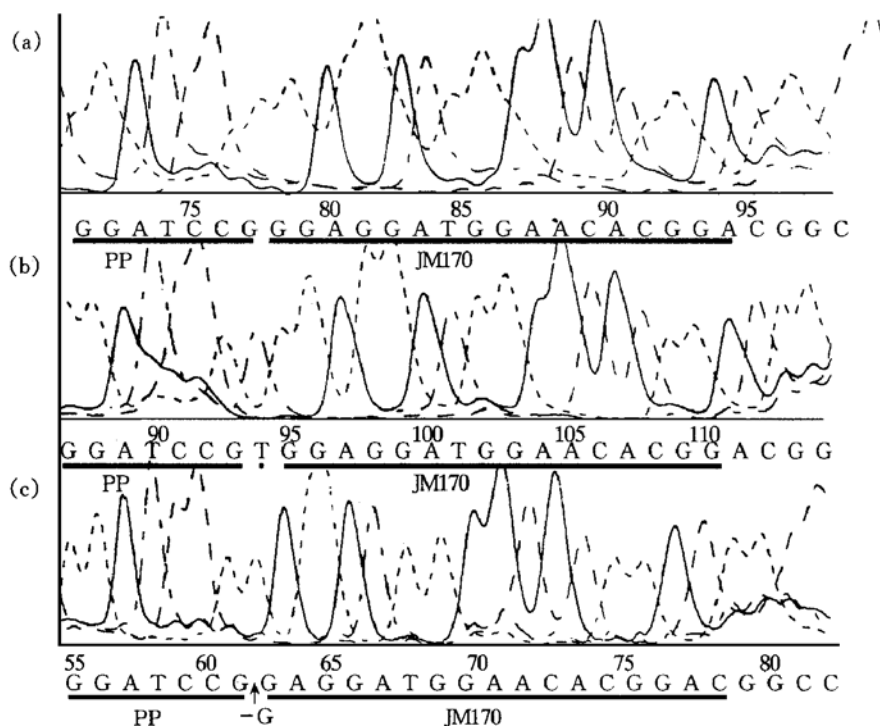


图 1 部分克隆的测序结果

(a) PP 与 JM170 直接衔接, 对应 PCR 产物为平端 (+ 0); (b) PP 与 JM170 的衔接处多了一个 T, 对应 PCR 产物 3' 端多了一个 A (+ A); (c) PP 与 JM170 的衔接处少了一个 G, 对应 PCR 产物 3' 端少了一个 C (- 1).

由表 1 可见, Taq DNA 聚合酶 PCR 扩增产物主要含有 3' 突出 A 的末端, 具有 3' 校正功能的 Pwo DNA 聚合酶虽然能有效地除去 PCR 产物 3' 端

的突出碱基, 但在本实验条件下未见有效地产生平端 PCR 产物, 而是代之以 5' 突出端的产物.

表 1 PCR 产物 3' 末端组成分布表

组别	末端组成							合计
	+ A	+ G	+ C	+ 0	- 1	- 2	- 3	
a 组	数目	35 ¹⁾	2	1	14	0 ²⁾	0 ³⁾	52
	百分率/ %	67.3	3.8	1.9	26.9	0	0	100
b 组	数目	4 ¹⁾	0	0	6	8 ²⁾	4 ³⁾	23
	百分率/ %	17.4	0	0	26.1	34.8	17.4	100

a 组: Taq DNA 聚合酶 PCR 扩增产物, b 组: Taq+ Pwo DNA 聚合酶 PCR 扩增产物. + A、+ G、+ C: PCR 产物的 3' 端突出一个 A、G、C; + 0: PCR 产物的一个末端为平端; - 1、- 2、- 3: PCR 产物的 3' 端缺一个、二个、三个碱基; ¹⁾: a 组与 b 组在 + A 数目上差异显著 ($P < 0.05$); ²⁾: a 组与 b 组在 - 1 数目上差异极显著 ($P < 0.001$); ³⁾: a 组与 b 组在 - 2 数目上差异显著 ($P < 0.05$).

3 讨 论

DNA 聚合酶有两种聚合活性, 一种是模板依赖型 (template-directed) 的, 这是其主要的聚合活性^[3]; 另一种是非模板依赖型 (nontemplate-directed) 的, 即末端转移酶样聚合作用. 本文结果证实了 PCR 产物主要含有非平整末端, 并且主要是 3' 端突出一个 A. 这与 James 的结果是一致的^[2]. 但同时也显示, PCR 产物中仍有相当比例的含一个或两个平端的分子 (平端占总末端的 26.9%), 且 3' 端突出部分也有 + G 或 + C 者. 这也许是由于二者反应条件和检测方法不同所致.

本文结果还显示, Pwo DNA 聚合酶能够有效降低 3' 端突出产物的比例. 但在本实验条件下, 它未能象 Klenow 酶那样有效地产生平端产物. 原因可能是 Klenow 酶的反应温度较低 (37℃), 底物 DNA 末端的解链与复性 (‘‘呼吸作用’’) 的平衡点更靠近最后一个碱基, 结果主要产生平端产物. 相反, Pwo DNA 聚合酶由于反应温度较高 (72℃), 底物 DNA 末端的解链与复性的平衡点未在最后一个碱基, 结果主要产生 3' 端突出的产物. 降低反应温度是否有助于提高 Pwo DNA 聚合酶产生平端产物的比率, 以及是否可能存在其他的机制有待进一步研究. 在 Taq+ Pwo DNA 聚合酶扩增的 PCR 产物中, 3' 突出端, 平端及 5' 突出端产物并存, 原因可能是在 PCR 体系中 Taq 和 Pwo 两种酶的作用达到了某种平衡.

参 考 文 献

- 1 Sara E M, Richard D I, David P L. Using the polymerase chain reaction to modify expression plasmids for epitope mapping. *Nucl Acid Res*, 1989, **17** (8): 3319
- 2 Klark J M. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucl*

Acid Res, 1988, **16** (20): 9677~ 9681

- 3 夏庆杰, 张思仲, 肖翠英, 等. UT-PCR ——一种扩增未知序列微量 DNA 片段的方法. *中华医学遗传学杂志*, 1997, **14** (3): 170~ 173
Xia Q J, Zhang S Z, Xiao C Y, *et al.* *Chin J Med Genet*, 1997, **14** (3): 170~ 173
- 4 Mahadevan M, Amemiya C, Jansen G, *et al.* Structure and genomic sequences of myotonic dystrophy (DM kinase) gene. *Hum Mol Genet*, 1993, **2** (3): 299~ 303
- 5 潘阿根, 张思仲. 中国汉族人强直性肌营养不良基因 CTG 重复序列多态性的初步研究. *中华医学遗传学杂志*, 1996, **13** (3): 138~ 142
Pan A G, Zhang S Z. *Chin J Med Genet*, 1996, **13** (3): 138~ 142
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Labortary, 1989. 1. 74

Studies on Termini of PCR Products. XIA Qing-Jie, ZHANG Si-Zhong, WU Hui, XIAO Cui-Ying (*The First University Hospital of West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China*).

Abstract PCR products amplified with Taq and Taq + Pwo DNA polymerase were reamplified by using UT-PCR and then cloned and sequenced. The termini of the original PCR products were analyzed. In the group of Taq amplification, the termini were chiefly sticky ones with 3'-protruding A (67.3%); the next majority of termini were blunt ones (26.9%). In the other group, the proportion of blunt-ends was almost the same as that in the group of Taq amplification (26.1%). However, the 3'-protruding termini decreased (17.4%), instead of additional 3'-recessive ones (- 1, - 2, - 3; 57.0%). The results reveal that the ends of PCR products are complicated.

Key words termini of PCR products, UT-PCR, Taq DNA polymerase, Pwo DNA polymerase