

简 报

单引物连接法对未知 DNA 序列的 PCR 扩增

安 新* 朱特贵 程在玉* 吴 旻

(中国医学科学院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

关键词 PCR 引物, DNA 粘端填平, 接头连接, PCR 扩增

有文章报道^[1]: 将未知序列的待扩 DNA 经限制性内切酶消化, 产生 3' 端突出的粘末端, 再设计一 PCR (聚合酶链反应) 引物, 其 3' 端含有与该酶切口互补的序列, 以引物作接头, 用 Taq 连接酶直接将其连到待扩片段的粘端上, PCR 扩增成功. 但我们试验中所用 T4DNA 连接酶不能连接靠近单链区域的缺口, 因而需在此设计基础上做些改进 (图 1): 将接头 (即 PCR 引物) 与内切酶 Nsp I 切出的 DNA 粘端复性, 用 Klenow 酶填平复性后的末端, 使之成为双链, 这样, 连接酶就可把接头与 DNA 片段间的缺口连好, 末端填平时合成了与引物 5' 端互补的序列, 这段序列正好是 PCR 反应中模板与引物的复性位置. 目前已在 λ DNA 和人基因组 DNA 中得到了满意的扩增结果.

1 材料与方法

1.1 用限制性内切酶 Nsp I (Boehringer Mannheim) 分别对 λ DNA (BRL) 和人基因组 DNA 进行消化, 反应缓冲液含: 10mmol/L Tris, HCl pH7.5, 10mmol/L MgCl₂, 50mmol/L NaCl 和 1mmol/L DTE (二硫赤藓糖醇). 37℃ 反应过夜. 72℃ 保温 10min, 使内切酶失活.

1.2 接头连接: 取 Nsp I 消化后的 DNA 0.1 μ g, 与人工合成的单链寡核苷酸引物约 50ng 混合, 选用 T4 DNA 连接酶的缓冲系统 (50mmol/L Tris · HCl pH7.8, 10mmol/L MgCl₂, 20mmol/L DTT (二硫苏糖醇), 1mmol/L ATP, 50 μ g/ml BSA (小牛血清白蛋白), 加四种 dNTP 各 2nmol 和 1 μ l Klenow 酶 (5U/ μ l, BRL), 终体积为 19 μ l, 在 4℃ 保温 4h, 补加 1 μ l T4DNA 连接酶 (200U/ μ l, New England Biolabs), 12℃ 保温 12h.

1.3 PCR 扩增: 取连上接头的 DNA 25ng, 充分变性, 加入与上述反应相同的引物 50pmol, 再与

dNTP (终浓度各为 150 μ mol/L)、5× 缓冲液及 2U Taq DNA 聚合酶 (复旦大学遗传所) 混合, 反应体积为 100 μ l, 覆以石蜡油. 93℃ 1min, 55℃ 1.5min, 70℃ 3min, 循环 30 周期. 取出 5—10 μ l 反应液, 在 1.6% 琼脂糖凝胶中进行电泳.

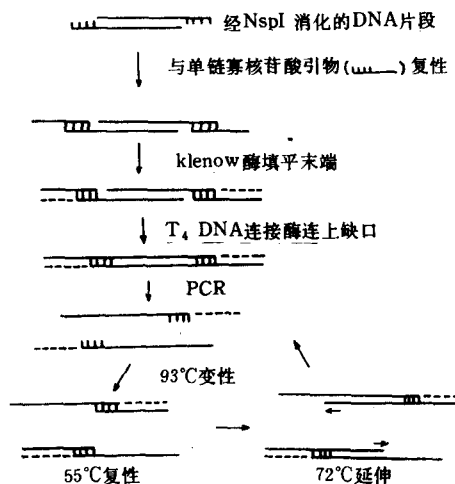


图 1 单引物连接法进行 PCR 扩增的原理

引物序列: $[^{32}P]$ CGGGAATTCTGCTCGA CATG

Nsp I 识别位点: $\begin{pmatrix} A \\ G \end{pmatrix}$ CATG/ $\begin{pmatrix} T \\ C \end{pmatrix}$

2 结果和讨论

2.1 结果见图 2. λ DNA 扩增片段的大小已超过 3.5kb, 人基因组 DNA 扩增片段也可接近 2kb. 此方法简便易行, 又因适合 Klenow 酶工作的离子浓度范围较广^[2], 所以可省去各步骤间的 DNA 纯化过程. 还可用

* 中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005

收稿日期: 1992-03-05 修回日期: 1992-06-26

T4 DNA 连接酶的缓冲液将 Klenow 酶和连接酶配在一起成为工作液 (含引物和 dNTP), 使反应再简化一步。特别是在待扩 DNA 不足 1ng 时, 需按比例压缩连接接头反应的体积, 以保证连接有效, 甚至可在显微镜下 (100×) 取一定的工作液, 调节反应终体积在 100μl 左右, 使 pg 水平的微量 DNA 操作成为可能。

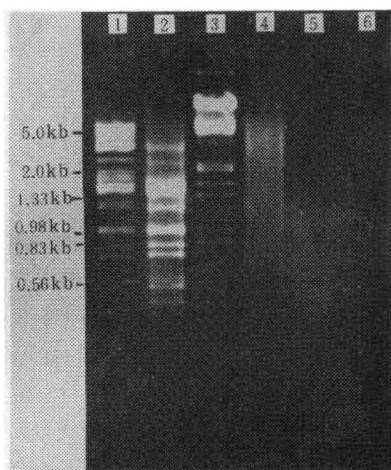


图 2 单引物连接法对 λ DNA 和人基因组 DNA 进行 PCR 扩增的结果

(1) λ DNA 经 Nsp I 消化后的情况, (2) λ /Nsp I 连接引物接头后 PCR 扩增产物, (3) λ DNA/Hind III-EcoR I 片段, (4) 人基因组 DNA 经 Nsp I 消化的情况, (5) 人基因组 DNA/Nsp I 连接引物接头后 PCR 扩增产物, (6) 人基因组 DNA/Nsp I 连接引物接头, 未经 PCR。

连接反应中适当提高引物浓度, 有助于减少被扩 DNA 的自身连接。

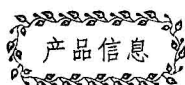
为了进一步说明反应中 Klenow 酶的作用, 我们把只连上接头, 而未进行 PCR 的人基因组 DNA 也做了电泳对照 (图 2 中第 6 行), 未见有扩增现象。

2.2 用人工合成的寡核苷酸双链接头, 也可对未知序列的 DNA 进行扩增^[3], 这样做虽省去了 Klenow 酶的作用, 但双接头中一条需 5' 端磷酸化, 而且也不及单链经济。

感谢吴冠芸教授和刘敬忠教授对本工作的关心和有益的建议。

参 考 文 献

- 1 邓汉湘, 何小轩等. 人类高分辨染色体显微切割、体外扩增及微克隆技术. 中华医学杂志, 1991; 71 (2): 84
- 2 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning, A laboratory manual*. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: p5. 40
- 3 Johnson D H. Molecular cloning of DNA from specific chromosomal regions by microdissection and sequence-independent amplification of DNA. *Genomics*, 1990; 6: 243



您想提高实验室的工作效率吗?

请选用 XZ-6 型旋转蒸发器

中国科学院生物物理研究所科龙仪器厂最新研制成 XZ-6 型旋转蒸发器, 并且已批量生产, 投放市场。

该产品是综合过去本厂生产的各型号的旋转蒸发器的优点, 并吸收国内外各厂家产品的长处, 最新设计精心制造的出口型产品。无论是产品外观, 还是内在质量, 甚至整机性能, 都令人耳目一新, 受到使用者的好评。

旋转蒸发器是生物化学、有机化学等实验室必备的仪器。无论是快速精馏, 还是回收、制备等使用它都

能极大地加快液体蒸发速度, 提高效率。本仪器操作简便安全可靠。您如果需要可直接与该厂联系。

中国科学院生物物理研究所科龙仪器厂

地址: 北京海淀中关村北一条 4 号

通讯地址: 北京海淀区中关村北一街 3 号

科龙公司收转

邮码: 100080 电话: 256. 3923