

三步法扩增高变异区 DNA

邱 钢, 曾庆韬, 金 珊, 钱远槐

(湖北大学生命科学院, 武汉 430062)

摘 要:分子进化研究中所遇到的一个常见问题是某些基因的目标区域进化较快而难以用特定引物在不同种属间进行有效扩增,而这将影响到整个实验的进程和全部结果的综合分析。虽然巢式和半巢式 PCR 等能显著提高扩增的特异性,但应用于高变异区的扩增结果仍是杂带多或涂抹严重,不能满足后续实验需要。在果蝇 *Fak56D* 基因的研究中需要扩增不同属及黑腹果蝇种组不同种亚组的相关片段,由于该 DNA 区域变异较显著,常用扩增方法对大部分材料的效果都很不理想。实验创造性组合了一套经济实用的扩增方法,即巢式或半巢式 PCR 结合定向 DNA 片段胶回收技术后再扩增的三步扩增法,得到了令人满意的扩增结果,为下一步的克隆、测序等研究创造了必要条件。

关键词:高变异区;PCR;三步法

中图分类号:Q75

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2005)03-0442-05

Three Steps for Amplifying Quick Evolving Region of DNA

QIU Gang, ZENG Qing-Tao, JIN Shan, QIAN Yuan-Huai

(Faculty of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: A common problem in research of molecular evolution is difficult to efficiently amplify quick evolving target sequence of genes in different species or genus using specific primers, thus making experimental process and final analysis of total results delayed. Although using nested or semi-nested PCR can prominently increase PCR specificity, it really cannot efficiently amplify quick evolving region of DNA in our research of gene *Fak56D*. In this research, we need PCR products corresponding to gene *Fak56D* of different species of *Drosophila melanogaster* or other genus of *Drosophila*. For the high evolutionary rate, most materials did not produce qualified PCR products. To solve this problem, we initially used a combination method of three steps, i. e. semi-nested PCR taken together with orientational gel extraction, which satisfactorily met the demands of next cloning and sequencing steps.

Key words: quick evolving region; PCR; three steps

生物间亲缘关系的研究在现代已经离不开分子进化方面的佐证^[1~3],作为提供分子进化证据的分子系统学所做的常规研究之一是选择进化速率适当的 DNA 片段为分子标记,并搞清待研究物种该 DNA 片段的序列后用专业软件在分子水平上分析

彼此间的进化关系^[4],而 DNA 片段序列的获取主要依靠设计适当引物后通过 PCR 扩增出片段,再经直接测序或克隆后测序而得。然而,目的片段的扩增在 DNA 序列差异显著的某些物种间难以获得有效 PCR 产物,原因是引物与目标序列碱基配对时差异

收稿日期:2004-11-18;修回日期:2004-12-08

基金项目:国家自然科学基金重点项目(编号:39930100)[Supported by National Science Foundation of China (No. 39930100)]

作者简介:邱 钢(1971—),男,湖北十堰人,讲师,硕士研究生,郟阳医学院在职教师,研究方向:遗传学与发育生物学。E-mail: qiugang1997

@163.com

过大而无法正常退火。上述情况下设计简并引物费时费力且效果难以预测,有杂带可通过胶回收来去除,但在目的带极弱和只出现涂抹带时该如何处理呢?普通 PCR 基础上衍生出的巢式 PCR (nested PCR) 技术能有效提高 PCR 的特异性和灵敏度^[5~7],其原理是针对目的基因区域设计两对引物,即一对外侧引物和一对内侧引物,内侧引物扩增片段比外侧的稍短并完全位于外侧引物扩增区域内,这样通过先外侧后内侧二次 PCR 反应对特定 DNA 片段进行特异性扩增。通常第一次扩增经历 20~30 次循环,再将第一次扩增的产物取少许作为模板进行第二次扩增。半巢式 PCR (semi-nested PCR) 的原理与巢式 PCR 基本相同,只是半巢式 PCR 的引物为一对半,即一对外侧引物和一个内侧引物,外侧引物之一被用于第二次 PCR 反应中。这两种方法不但可以减少假阳性的出现,而且在目的片段检出中能使灵敏度提高几个数量级^[6,7]。可见,巢式和半巢式 PCR 能显著增加目的基因片段的定向扩增效率,在非特异扩增带较多的情况下不失为一种增加 PCR 特异性的手段。然而,在我们在对果蝇 (*D. melanogaster*) *Fak56D* 基因 (GenBank accession number: AE003796) 的研究中,实验要求得到数

十种果蝇(大部分属黑腹果蝇种组)该基因的部分片段,其中 21 种用包括巢式 PCR 的常规 PCR 方法都未能得到有效的目的片段,而且特别是有些种的多次扩增结果全是涂抹带。为解决这一问题,我们应用半巢式 PCR 结合定向胶回收的三步法成功获得了有效的目的片段,经克隆后测序,证实获得了目的片段。该方法经济实用,在本实验室推广后效果甚好,值得推广。

1 材料和方法

1.1 材料和主要试剂

黑腹果蝇种组 (*D. melanogaster*) 及其他果蝇亚属果蝇由本实验室采集并保存,所有 21 种材料列于表 1 (其中 1 号属筋果蝇种组,2 号属黑斑果蝇种组,其余全部属于黑腹果蝇种组)。PCR 扩增所需 Buffer、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶以及胶回收试剂盒 (CASpure Gel Extraction Kit) 为上海中科开瑞生物工程公司产品,扩增用 Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 9600 型 PCR 仪(美国制)和 PTC-200 梯度 PCR 仪(德国制)。电泳槽是 EmbiTec 公司的 RunOne™ Electrophoresis Cell(美国制)。DNA 染色是在琼脂糖中按比例加入赛百盛公司销售的 Goldview 染料。

表 1 实验材料

Table 1 Experimental materials

编号 Num.	种名 Species	编号 Num.	种名 Species	编号 Num.	种名 Species
1	筋果蝇 <i>D. funebris</i>	8	拜迈氏果蝇 <i>D. baimaii</i>	15	梯额果蝇 <i>D. trapezitrons</i>
2	海德氏果蝇 <i>D. hydei</i>	9	泊果蝇 <i>D. barbara</i>	16	艳丽果蝇 <i>D. pulchrella</i>
3	双栉果蝇 <i>D. bipectinata</i>	10	包克氏果蝇 <i>D. bocki</i>	17	铃木氏果蝇 <i>D. suzukii</i>
4	马勒哥果蝇 <i>D. malerkotliana</i>	11	吉川氏果蝇 <i>D. kikawai</i>	18	黑端翅果蝇 <i>D. prostipennis</i>
5	付双栉果蝇 <i>D. parabiptectinata</i>	12	莱果蝇 <i>D. leontia</i>	19	三暗黄果蝇 <i>D. trilineata</i>
6	拟嗜凤梨果蝇 <i>D. pseudoananassae</i>	13	林氏果蝇 <i>D. lini</i>	20	细针果蝇 <i>D. eugracilis</i>
7	白颜果蝇 <i>D. auraria</i>	14	谈氏果蝇 <i>D. tani</i>	21	嗜凤梨果蝇 <i>D. ananassae</i>

1.2 DNA 模板的制备

取成年活体果蝇 4~6 只, -20 °C 冻 10 min 后放入 1.5 mL 离心管中,加入 STE 缓冲液 (0.1 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA pH 8.0) 30 μL 并用枪头彻底捣碎,补加

STE 缓冲液 370 μL 和 100 μL 10 % SDS,置于 60 °C 水浴中 5 h。接下来用酚/氯仿/异戊醇抽提,异丙醇沉淀 DNA 并用 70% 乙醇洗后于烘箱中 50 °C 烘干,加入 50 μL ddH₂O 溶解,稍加震荡,离心后存于 -20 °C 备用。

1.3 引物设计及 PCR 扩增

1.3.1 引物设计

所用引物(5'→3')由 Dnastar 之 Primer select 软件设计。引物设计依据的序列是黑腹果蝇(*D. melanogaster*) *Fak56D* 基因的 DNA 序列(GenBank accession number: AE003796)。巢式 PCR 外围引物对上游引物记为 FAK-I : tcccgccttcagtgtctcc, 下游引物记为 FAK-II : ctgccggctgttatcaaa, 产物长 1 424 bp。因为该区域引物设计困难故采取半巢式 PCR, 内侧引物对上游仍为 FAK-I, 下游记为 FAK-III : gacgctcgggtccaataaat, 产物长 1 328 bp。由于该区域可能存在小片段的缺失, 目的扩增带的实际大小并不确定。

1.3.2 PCR 扩增体系及循环条件

PCR 反应体系为: 10 × PCR 反应缓冲液 5.0 μL ; dNTP (10 mmol/L each) 1.0 μL ; 果蝇 DNA 1.5 μL ; 上游引物和下游引物(10 μmol/L) 各 1.2 μL ; ddH₂O 39.8 μL, *Taq* polymerase (5 U/μL) 0.3 μL。循环条件为: 94 °C 变性 3.5 min, 94 °C 40 s, 退火在二次或巢式 PCR 中第一轮是 55 °C 20 cycles, 第二轮是 58 °C, 时间全为 30 s, 35 cycles, 72 °C 延伸为 50 s, 最后的 72 °C 延伸 6 min 只在巢式 PCR 第一轮中略去。后一轮皆取前一轮反应液 1.5 μL 为模板液, 回收后取 2 μL 回收液为模板液用于下一轮扩增。

1.4 PCR 产物检测回收及纯化

1.4.1 PCR 产物检测

扩增产物按顺序取 5 μL 混合 0.5 μL 标准上样缓冲液后上样于 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳, 缓冲液为 1 × TAE, 电压 5 V/cm, 凝胶成像系统照相并记录。所用 DNA Marker 是 TaKaRa 公司的 DL-2000(2 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp), 阳性对照采用黑腹果蝇(*D. melanogaster*) DNA 为模板。

1.4.2 PCR 产物回收及纯化

在 1.2% 的琼脂糖回收胶上电泳分离后于紫外灯下切得目的条带, 纯化步骤按照 CASpure Gel Extraction Kit 的说明书进行, PCR 产物最终洗脱于 30 μL 三重蒸馏水中。

2 结果与讨论

2.1 结果及分析

本实验所用材料(21 种果蝇)是全部 30 余种果蝇材料该区域扩增实验中无法用常规 PCR 方法得到满意结果的品种。如图 1 之 a 和 b 所示。a 图: 1~10、20、21 号 12 种果蝇用引物 FAK-I 和 FAK-II 扩增的结果, 除 6 号有极弱近似目的带大小的扩增带(1 424 bp), 1、5、20 号只显示出弱杂带, 其余未见扩增结果; b 图: 11~19 号 9 种果蝇经 FAK-I 和 FAK-II 扩增结果(从左至右依次为: 阳性对照、11~

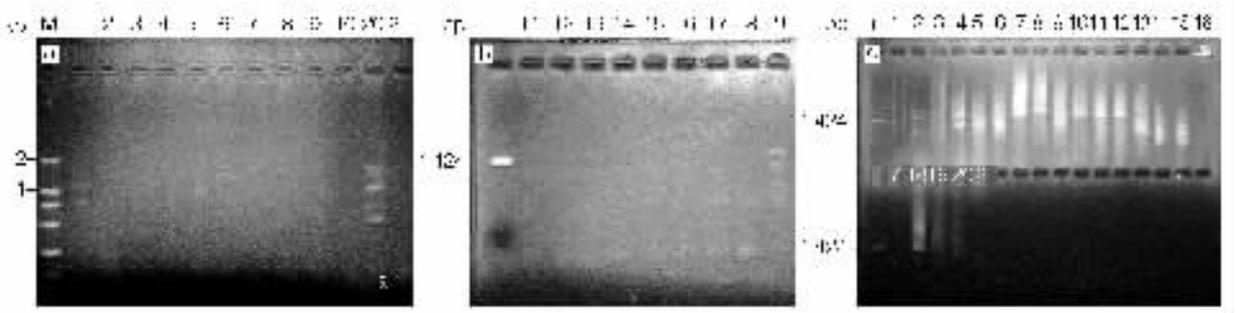


图 1 全部材料的常规 PCR 和二次 PCR

a: 1~10、20、21 号 12 种果蝇用 FAK-I 和 FAK-II 扩增的结果(M:Marker)。b: 11~19: 9 种果蝇经 FAK-I 和 FAK-II 扩增结果(+ : 1 424 bp 的阳性对照)。c: 1~21: 果蝇经外侧引物对二次 PCR 结果(上下两排上样, + : 1 424 bp 的阳性对照)。

Fig.1 Normal and repeat PCR with all materials

a: samples 1~10, 20 and 21 for PCR using FAK-I and FAK-II. b: samples 11~19 for PCR using FAK-I and FAK-II (+ : 1 424 bp positive control). c: samples 1~21 for repeat PCR using FAK-I and FAK-II (two rows: 1 424 bp positive control).

19)。除 19 号有弱目的带(1 424 bp)和杂带外,其余有极弱杂带或未见扩增结果。为提高特异性,二次 PCR 和巢式 PCR 都是理想的候选方法。图 1,c 是这 21 种果蝇经 FAK-I 和 FAK-II 二次 PCR 的结果(每轮 20 个循环):上下两排同时上样,最左边皆是阳性对照(1 424 bp),上排依次为 1~16 号,下排依次为 17~21 号。可见各材料大部分即使有近似目的带的扩增带,拖带及涂抹现象亦十分严重(1、3、19~21 号),而 16、17 号甚至涂抹带也未能见。这种结果表明虽然采用二次 PCR 且控制第一轮循环数防止错配产物的放大,但效果并不令人满意。究其原因可能是该目标区域的 DNA 序列差异较大,以已公布的黑腹果蝇该区域 DNA 序列为蓝本设计的引物无法在单一正确位点退火,导致杂带和涂抹现象严重。那么巢式 PCR 呢:图 2 是这 21 种果蝇半巢式 PCR 的结果,除 4、5、8、9、14~17 号是全涂抹带外(这 8 个种对巢式 PCR 不敏感)其余多有杂带出现,大部分非目的杂带还亮于目的区的带型。从以上结

果来看,改进方法后各材料即使有扩增条带出现,部分种还出现了近似目的带片段大小的扩增带,但拖带及涂抹现象十分严重,无法满足克隆或直接测序的要求。即便是出现了的极弱的目的带,在回收时跑长胶(分出大小相近的杂带)后在紫外灯下已很难看得见扩增带,加上回收时还要损失 20%~30%,成功克隆的机会微乎其微。至此,寻找新的方法来解决这一问题成为该项研究的关键。总结前面实验结果,解决这一扩增难题的关键是扩出目的带并去除杂带。首先我们用黑腹果蝇(*D. melanogaster*) DNA 为模板进行预实验来优化 PCR 的多种条件,50 μ L 的反应体系中各成分的浓度被固定下来(如前述),而 T_m 值在 58 $^{\circ}$ C 时扩增效果最好。接下来我们在半巢式 PCR 的基础上结合定向胶回收技术对相应目的区的 DNA 回收,从而纯化模板,随后是新一轮由引物 FAK-I 和 FAK-III 完成的 35 个循环的扩增。结果如图 3,可见除 12、15 号目的区带型较弱外,绝大部分的扩增结果是明亮的目的带,部分样

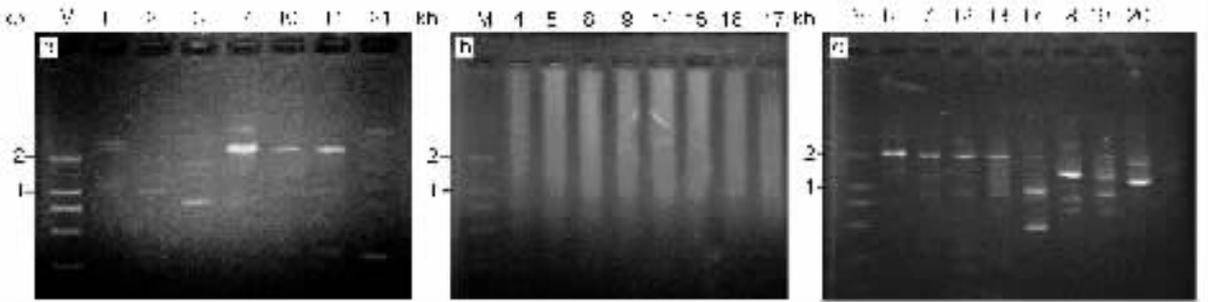


图 2 全部材料的半巢式 PCR
Fig.2 Semi-nested PCR with all materials

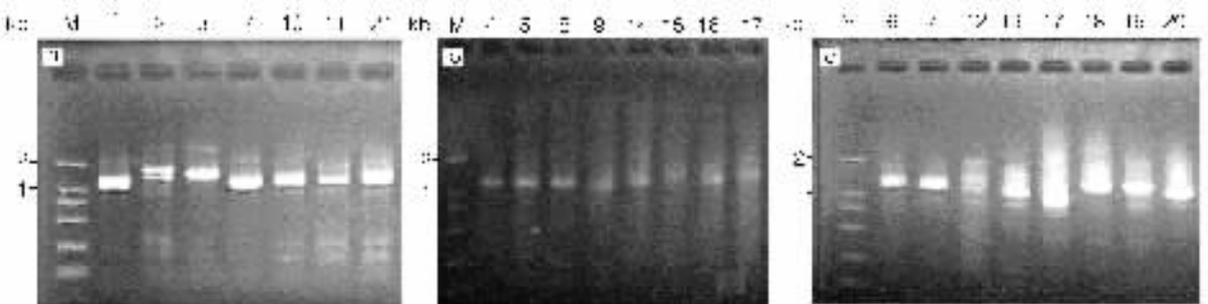


图 3 全部材料的三步法扩增结果
Fig.3 Three step-amplification of all materials

品虽然仍有杂带但比目的带要弱很多(扩增带不整齐是因为目的扩增片段的大小存在 60 bp 左右的差异),且数量也明显减少。这些扩增产物在克服跑胶和回收等损失后仍能轻松满足后续克隆的需要。后经测序,扩增片段中全部含有目的片段(金珊等,待发表)。

2.2 讨论

巢式 PCR 后回收相应区段再次扩增的三步法是解决差异显著 DNA 区域扩增难题实验中诸多组合方法中最满意的一种,也就是说每一步实验中我们除作温度、模板量和循环数的梯度外还实验了不同 PCR 方法不同的组合。例如在降低退火温度后先用外侧引物扩增 35 个循环,无论有无结果全部胶回收目的区后再用内侧引物扩 35 个循环,结果多是涂抹带或没有任何结果,原因之一应是第一轮循环数过多;再如巢式 PCR 中若第一轮大幅度降低退火温度,其效应在大多数情况下是非目的带的扩增被加强。值得特别注意的是 4、5、8、9、14~17 号果蝇在本方法中经巢式 PCR 后却涂抹严重,但在对相应区域定向胶回收后再用内侧引物扩增,取得了较满意的效果,这应当是本方法的最大亮点,即通过定向回收限制模板片段大小在一定区域后,即使涂抹带的回收产物只要 PCR 反应已优化也能出结果。

在此类实验中还有几点需要注意:一,第一轮退火温度的设定很重要。由于引物与模板存在碱基的不完全匹配,首轮扩增时把 T_m 值设定在低于最佳 T_m 值 3~10℃ 都是可取的,这样虽然增加了杂带出现的可能性但目的扩增带一定包含于其中,这也是降低退火温度的目的所在。本实验中引物的最佳 T_m 值是 58℃,而首轮采用 55℃ 就是基于此因。那么是不是降的越低越好,答案是否定的,第一轮退火温度的设定应以目的带出现为准。二,巢式 PCR 两轮扩增的循环数都不能过多,本实验中 20 个循环取得了很好结果。三,采用巢式还是半巢式 PCR 方法对实验结果没有明显影响。这在本实验室其他实验中被证明,本项实验采用半巢式 PCR 法完全是由于该 DNA 区域引物设计困难所致。四,胶回收前巢式第二轮时直接取多少前一轮 PCR 的反应液为模板,我们的经验是 0.5~2 μL 较好;另外胶回收后取 2~

10 μL 回收液用于最后一轮的扩增在我们的实验中都取得了较好效果,这一体积的变动对最终结果影响不大,实际操作中取多少应取决于回收前条带的亮度和回收中的损失情况。最后,高质量的 PCR 反应液可直接送出测序,但在本类实验中直接测序结果皆为套峰,无法得到准确 DNA 序列,原因还是引物与扩增片段匹配性差,所以产物必须经克隆后再测序。

参考文献(References):

- [1] XU Hong-Fa, WANG Jing-Bo. Advances in molecular systematics. *Chinese Journal of Ecology*, 2001, 20 (3): 41~46.
徐宏发,王静波. 分子系统学研究进展. 生态学杂志, 2001, 20 (3): 41~46.
- [2] ZHANG Ya-Ping, Oliver A Ryder. Molecular phylogeny of Arctoidea. *Acta Genetica Sinica*, 1997, 24 (1): 15~22.
张亚平, Oliver A Ryder. 熊超科的分子系统发生研究. 遗传学报, 1997, 24 (1): 15~22.
- [3] LU Jian, LÜ Jing, CHEN Hui-Xian, ZHANG Wen-Xia, DAI Zhuo-Hua. Molecular phylogeny of *Drosophila auraria* species complex. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29 (1): 39~49.
陆剑,吕静,陈慧贤,张文霞,戴灼华. 金色果蝇复合种 (*Drosophila auraria* species complex) 的分子系统学研究. 遗传学报, 2002, 29 (1): 39~49.
- [4] YANG Zhi-Heng. Statistical estimation of molecular evolutionary trees. *Hereditas* (Beijing), 1995, 17 (Suppl.): 92~96.
杨子恒. 分子进化树的统计推断. 遗传, 1995, 17 (增刊): 92~96.
- [5] HUANG Kun-Lun, LUO Yun-Bo. Detecting genetically modified soybean roundup ready ingredient in foodstuffs by nested PCR and sime-nested PCR. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2003, 11 (5): 461~466.
黄昆仑,罗云波. 用巢式和半巢式 PCR 检测转基因大豆 Roundup ready 及其深加工食品. 农业生物技术学报, 2003, 11 (5): 461~466.
- [6] Stina Englund, Andra's Ballagi-Porda'ny, Go"ran Bo" Iske, Karl-Erik Johansson. Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Paratuberculosis*. *Mycobacteriology*, 1999, 33: 163~171.
- [7] Jaber Aslanzadeh, Barbara B Padilla2, John D Shanley2. Evaluation of PCR and nested PCR for laboratory diagnosis of hepatitis C virus infection. *Molecular and Cellular Probes*, 1996, 10: 173~178.