

# 利用交错延伸剪接 PCR 技术扩增油菜花粉育性基因 *MS2Bnap* 全长 cDNA 序列

李德谋, 罗小英, 侯磊, 裴炎, 方卫国, 杨光伟

(西南农业大学生物技术中心, 重庆北碚 400716)

**摘要:**交错延伸剪接 PCR 是一种用于分子进化研究的 DNA 改组技术。本实验利用其原理, 将已获得的油菜花粉育性基因 *MS2Bnap* 有部分序列重叠的三段 PCR 产物作为模板进行扩增, 获得了花粉育性基因 *MS2Bnap* 的全长 cDNA 序列。

**关键词:**交错延伸剪接 PCR; 花粉育性基因 *MS2Bnap*; 全长 cDNA 序列

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2001)06-0553-03

## Amplification of Pollen Fertility Gene *MS2Bnap* Full-length cDNA from *Brassica napus* Using SOE by PCR

LI De-mou, LUO Xiao-ying, HOU Lei, PEI Yan, FANG Wei-guo, YANG Guang-wei

(Center for Biotechnology, SUTH west Agricultural University, Chongqing 400716, China)

**Abstract:** SOE by PCR is one of DNA shuffling technologies for molecular evolution engineering. Using the theory of SOE by PCR, the full-length cDNA sequence of pollen fertility gene *MS2Bnap* of *Brassica napus* was amplified with three obtained fragments as templates which have part overlapping of *MS2Bnap* sequence.

**Key words:** Splicing by overlap extension by PCR (SOE by PCR); Pollen fertility gene *MS2Bnap*; Full-length cDNA

交错延伸剪接 PCR (splicing by overlap extension by PCR, SOE by PCR) 技术是用于分子进化工程研究的一种 DNA 改组技术<sup>[1,2]</sup>。在 cDNA 克隆过程中, 获取全长 cDNA 序列是我们的最后目标。现有 oligo(dT) 引导合成法、载体合成法、置换合成法、3'-RACE 等合成全长 cDNA 序列主要技术途径<sup>[3]</sup>。但这些技术操作较复杂, 技术含量高, 对于初学者来说, 难以成功。在本实验中, 我们根据 SOE by PCR 的技术原理, 将植物花粉育性基因 *MS2Bnap* 序列人为分成互有部分序列重叠的三段, 设计二对引物进行两次扩增, 以期获得 *MS2Bnap* 全长 cDNA 序列。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

甘蓝型油菜隐性核不育系 S45A 及其表型正常的姊妹系 S45B 由西南农大油菜育种研究室提供。

### 1.2 油菜花蕾 mRNA 的制备

取减数分裂期和单核期的花蕾各 5g, 按照 mRNA 分离纯化试剂盒 (LIFE TECHNOLOGY Inc.) 的步骤操作纯化 mRNA。

### 1.3 cDNA 的合成

合成 cDNA 用 Mannheim Boehringer 公司的 cDNA 合成试剂盒。

收稿日期: 2001-01-10; 修回日期: 2001-04-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39570467)

作者简介: 李德谋 (1972.09-), 男, 贵州遵义人, 助教, 硕士, 专业方向: 植物遗传育种与生物技术。E-mail: luoxxy@swau. cq. cn

通讯作者: 杨光伟 (1958.07-) 男, 重庆南岸人, 副研究员, 硕士, 专业方向: 植物遗传育种与生物技术。E-mail: yanggw@swau. edu. cn

### 1.4 引物设计及扩增程序

根据 GeneBank (基因编号 X99922) 提供的 *MS2Bnap* 基因的全长序列, 为便于测序将 *MS2Bnap* 基因分成互有部分序列重叠的三段, 长度依次为 799bp, 761bp, 487bp。按此三段的序列分别设计特异引物进行扩增(表 1)。

扩增体系均采用宝生物工程的高保真扩增试剂盒(TAKARA LA PCR Kit Ver2.1)。扩增循环参数为: 94℃ 3min; 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 1min 35cycles; 72℃, 10min。

表 1 引物序列及其在 *MS2Bnap* 基因全序列中的位置

Table 1 Sequence of primers and its site in the <i>MS2Bnap</i> complete sequence		
引物编号 No. of primer	引物序列 Sequence of primers	在 <i>MS2Bnap</i> 基因中的位置 Primers' site in the sequence of <i>MS2Bnap</i> (bp)
引物 1	5'-aatggaatggacagtttactgtc-3'	1~23
引物 2	5'-gaaggttgattggcagctgag-3'	778~799
引物 3	5'-cagattcagaggagattgc-3'	732~753
引物 4	5'-gaagctcagctaagtctctcg-3'	1483~1502
引物 5	5'-cgtgatcagatcgttc-3'	1441~1458
引物 6	5'-tttgacctaacccctcc-3'	1909~1927

### 1.5 扩增产物的克隆与测序

按分子克隆实验指南的方法<sup>[4]</sup>, 将扩增产物克隆到载体 pGEM™-T 上, 寄到大连宝生物工程有限公司进行测序。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *MS2Bnap* 的扩增结果

以可育株和不育株减数分裂期花蕾的 cDNA 为模板扩增, 均扩出预期长度的三段产物(图 1), 分别将其编号为 I、II 和 III。

### 2.2 全长 cDNA 的扩增

利用现有的三段扩增产物(I、II 和 III)和引物 1 和引物 6, 直接进行扩增。因已扩增出的三段产物互有部分碱基重叠, 重叠部分可互为引物和模板, 在反应体系中加入与两末端碱基序列配对的引物, 在 Taq 酶的作用下, 则有可能扩增出全长 cDNA。在第一次扩增产物中, 除出现了两条约 800bp 和 500bp 的条带外, 在 1600bp 和 2000bp 间呈现拖带现象。回收 1600~2000 间的产物作模板, 再以引物 1 和 6 进行第二次扩增, 结果扩增出一条长度约 1.

9kb 与已报道的 *MS2Bnap* 基因的核苷酸长度相符的条带(图 2)。

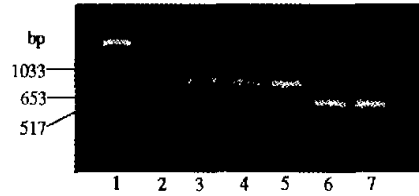


图 1 三对引物的扩增结果

1; DNA 分子量标准; 2, 4, 6; 可育株扩增产物  
3, 5, 7; 不育株扩增产物; 2, 3; 引物 1 和 2 扩增产物(I)  
4, 5; 引物 3 和 4 扩增产物(II); 6, 7; 引物 5 和 6 扩增产物(III)

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis pattern of three pairs primer

Lane 2 and 3; The products of PCR with Primer1 and Primer2 for fragment I(1~799bp);  
Lane 4 and 5; The products of PCR with Primer3 and Primer4 for fragment II(732~1502bp);  
Lane 6 and 7; the products of PCR with Primer5 and Primer6 for fragment III(1441~1927bp);  
Lane 1; Marker, Lane 2, 4, 6; products of male fertile lane, Lane 3, 5, 7; products of male sterile lane.

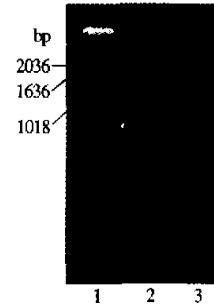


图 2 以混合的三段扩增产物为模板, 引物 1 和 6 扩增的全长序列

1; DNA 分子量标准; 2; S45B 可育株的扩增产物  
3; S45A 不育株的扩增产物

Fig. 2 Results of amplified with mixture of three amplification products, using Primer1 and Primer6

Lane 1; Marker; Lane 2; Products of PCR in S45B;  
Lane 3; Products of PCR in S45A.

### 2.3 测序结果

将扩增、克隆的长约 1.9kb 的片段进行测序, 此片段共有 1925bp(图 3)。并和 *MS2Bnap* 原始序列进行比较, 它们之间的同源性为 99%, 这些结果显示已扩出全长的 cDNA 序列。

在扩增过程中, 采用分段扩增 *MS2Bnap* cDNA 的策略, 主要原因在于前期直接扩增全长 cDNA 失

败。失败的原因可能在于以下几个方面:提取的 mRNA 质量不好,在 cDNA 的合成过程中,未能合成全长的 cDNA 或合成量很少;*MS2Bna p* cDNA 全长约 2kb,在扩增目的产物中属于较长范畴,给扩增带来一定的困难;也很可能 *MS2Bna p* 是低丰度表达基因<sup>[3]</sup>,转录形成的 mRNA 较少,所以难以合成足够数量的 cDNA 用于扩增。就本实验来说获取全长 cDNA 可采用以下一些途径:一是构建 cD-

NA 文库,然后利用现有的扩增产物作探针去筛选文库获得全长 cDNA;此途径需构建 cDNA 文库,工作繁琐,但最为可靠。其二是分离制备高质量的 mRNA,关键是获取足够长度的 mRNA,用已有的引物 1 和 6 直接扩增,获取全长 cDNA。其三是利用现有的三段扩增产物和引物 1 和 6,直接进行扩增。其中第三条技术较为简单快速,且经过测序确定为我们所需的全长 cDNA 序列。

```

ATGGAATGGACAGTTTACTGCTTATGCTAAAAATGAACCTTTCTTATTCTTATTTCTAGTTTGTGATGGAAGCTCTCTTCT
TGAGTTCITCTCTCCTCCTCCATTGCTGCTTCAATCAAGCTTCAAGATTACACGACCGTGTGACTGGTGCACTTTGTAAAGG
GACAAGAAAAGGTTAGGACCCACCTGGTCCCGTAAAGTGGTGGCGGTGATGGGAGAAAACATCAAACAGAGAGGGCC
TATTAGGGTCTCATCGCTTTTGAAGACAGAGGTCAAGTATTGATTAGGGAACAGAGTTCGCTGCTATGGACGCTGAGACA
TTGGTCTGTCACTAATGTGAATGGTACAGCATTGAGATGAATGGAGTGAAGAACTCTGATGCCITTCATGTGTCTGATAT
GGTGGGATCAAACAAGGACTTGGCATCGTTAGTTATCTACAAGGGAAGACGTTTCTAATCACTGGCTCCACTGGCTCTCTTA
GCTAAAGTACTGATTGAGAAGTCTTGAGAATGGCTCCTGATGTTGGGAAAATATATCTCTTGATTAAGCTAAAAACAAAG
AAGCAGCGATCCAGCGGTTAAAGAACGAGGTGTAGATGCAGAGCTTTTTAAAAATCTAAGAGAGACTCATGGAGCATCTTT
CATGTCTTTCATGTTAGACAAGCTTGTCCCTGTGACAGGAAACATTTGCGAATCAAACATGGGTTGCAACAGATTACAGCA
GAGGAGATTGCAAAAAGAGTGTATGTGATTATCAACTCAGCTCCCAATACAACCTTCAACGAAAGATATGATGTTGCTTTGG
ACATAACACACGAGGGCTGGTAATCTCATGGGATTCGCCAAGAAATGCAAGAACTCAAGCTTTTCTTGCAAGTATCTAC
AGCTTATGTGAACCGACAAAAGACAAGGAAGGATCATGGAGAAGCCCTTCTCGATGGGAGATTGTATAGCTACAGAGAACCTT
CATGGAAAGGTAACAGAAAAGCATTAGATATCGATAAAGAGATGAAGCTAGCTCTTGATGCTGCAAGAAAAGGGACTCAAGA
TCAAGATGAGGGCCAGAAGATGAAGGATCTCGGCTAGAGAGGGCAAGATCATATGGATGGCAAGACACTTATGTTTCCACC
AAAGCAATGGGAGAGATGATGATCAATAGCACTAGAGGGGACGTATCTGTGGTTAATATAAGGCTTAGCGTCAACGAAAGCAC
TTACAAAGACCCCTTTCCTGGATGGATGGAAGGAAACAGGATGATGGATCCTATATGCTGTGTGTTATGGAAAAGGACAGCTC
ACAGGGTCTTGGTTGATCCAAAAGGAGTCTTGATGTGTTCCGGCTGATATGGTGTAAATGGACATTAGCTGCTATAGC
AAGGCATGGAATGCTAAAGCAGATCCAGAACCTGAGATAAACGTGTATCAGATCCCTTCTCAGCGATAAATCTCTGGTT
TTCGAGGACTTAGCTGAGCTTCTTTACAACCACTACTAATCTACCCCGTGCATGGACTCGAAAGGTGTTCTCTATTAGGGTGCC
TTTGATGAAGCTTTTCGACTCCGTGATGATTCTCGGATCAITTTGTGGAGAGATGCTCAAGAACGGAGTGGCTTAATGAATG
GTATGGACTCATCGGATAGTAAGATACTACAGAAGCTTAAATTCATTGCAAGAAATCATATTGACGAAGCCAAACACCTTGCC
ACTATTTATGAGCCATACACTTCTCTGGTGGAGAITTGATAACAGCAATACACATAGATTAATGGAGAATATGTCTGAAGAA
GAGAAGGTTGAGTTTGGGTTTGTGATTTGGAAGCATTAACCTGGAATGACTACATTACAAATGTTTACATCCCGGTTTAAAGAA
GACATGTTTGAAGGAAGGGCTTAGGTCAA

```

图 3 全长序列扩增产物测序结果

Fig. 3 Sequence results of amplified complete fragment

### 参考文献(References):

- [1] Robert M, H, Henry D Hunt, Steffan N H, Jeffrey K P, Larry R P. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension [J]. *Gene*, 1989, 77: 61~68.
- [2] Anthony N W, Michael D J, Robert I L. Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid protein of immunological interest [J]. *Gene*, 1997, 186: 29~35.
- [3] 吴乃虎 编著. 基因工程原理(第二版上册)[M]. 北京, 科学出版社 1998.
- [4] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著, 金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京, 科学出版社, 1999.
- [5] Hodge R, Paul W, Draper J, Scott R. Cold-plaque screening: a simple technique for the isolation of low abundance differentially expressed transcripts from conventional cDNA libraries [J]. *Plant J*. 2, 1997, 257~260.