

加入自我延伸过程的融合PCR程序

刘亮伟¹, 杨海玉¹, 胡瑜¹, 李相前²

(¹河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002; ²淮阴工学院, 江苏淮安 223001)

摘要: 比较了加入自我延伸过程的融合PCR程序与传统PCR在扩增融合基因的扩增效果, 自我延伸程序(94 °C×1min, 52 °C×1min, 72 °C×1min)扩增2次, 分别用不同的延伸时间: 1 min、2 min、3 min、5 min, 发现用2 min、3 min、5 min延伸时间扩增出的融合基因条带比传统PCR显著亮一些, 而用延伸时间为1min时, 两种程序扩增出融合基因条带的亮度相近, 说明自我延伸程序中的延伸时间是影响融合基因扩增量的关键因素。加入自我延伸过程的融合PCR扩增程序为: 94 °C×5 min, (94 °C×1 min, 52 °C×1 min, 72 °C×5 min)×2次循环, (94 °C×1 min, 52 °C×1 min, 72 °C×1 min)×30次, 4 °C store。

关键词: 自我延伸过程; 融合PCR; 延伸时间; 融合基因

中图分类号: Q556

文献标识码: A

论文编号: 2009-0745

The Fusion-PCR added Self-Extension Process

Liu Liangwei¹, Yang Haiyu¹, Hu Yu¹, Li Xiangqian²

(¹Life Science College of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002; ²Huaiyin Institute, Huai'an Jiangsu 223001)

Abstract: In this paper, we discussed the fusion-PCR by adding self-extension process. The self-extension procedure was cycled for 2 times. When the extension length of self-extension procedure was 2, 3, or 5 minutes, the fusion-gene band amplified by fusion-PCR was significantly brighter than that of traditional PCR. However, when the extension length of the self-extension was 1 minutes, the genes amplified were similar between these two PCR processes. This indicates that the extension length of self-extension procedure is an important factor influencing gene amplified in Fusion-PCR.

Key words: self extension, fusion PCR, extension length, fusion gene

0 引言

人们发现微生物常常通过基因转移获得新的纤维素水解酶功能^[1-2], 并模拟自然界的这种多功能酶进化方式, 通过人工PCR方法将不同功能结构域的基因在体外用融合方法连接在一起的方法。它是通过两个PCR阶段, 通过重叠引物将两个DNA片段通过PCR连接起来的方式: 第一、二步先分别扩增两个DNA片段, 第三步以前两次扩增产物为模板, 以全长DNA的上游、下游引物扩增出全长融合DNA。人们用这种方法合成抗转铁蛋白受体单链抗体的全长基因^[3], 将 *Trichoderma reesei* 木聚糖酶基因的4个外显子连接成为成熟基因^[4]; 也用来将多功能酶连接在一起, 如连接

二氢叶酸还原酶和胸苷酸合成酶^[5], 将 *Thermotoga maritima* 葡聚糖酶和木聚糖酶融合起来^[6-8]; 将纤维素结合结构域(CBD)融合进葡聚糖酶基因中^[9]。这种将不同种类基因融合在一起的PCR方法称为“融合PCR”。

传统的融合基因扩增中常常是直接两断DNA扩增产物为模板, 以上、下游引物进行PCR扩增融合基因^[9-13], 所以扩增出来的融合条带很弱, 只好将多次扩增产物合并在一起用于基因连接, 作者在前期研究过程中发现, 其中重要的原因是没有加入中间自我延伸过程。因为木聚糖酶广泛用于饲料工业、食品处理、果汁和酒的澄清、特别是纸浆和造纸工业, 作者对

基金项目: 河南省科技攻关项目“木聚糖酶热稳定性的全息酶工程定向改造”(072102220001); 江苏省自然科学基金“海栖热袍菌耐热葡聚糖内切酶分子定向进化”(BK2007067)。

第一作者简介: 刘亮伟, 男, 1967年出生, 河南长葛人, 副教授, 博士, 主要从事微生物酶学的生物信息学和基因工程改造方面的研究。通信地址: 450002 郑州市文化路95号, 河南农业大学生命科学学院, Tel: 0371-63555175, E-mail: LLW321@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2009-04-10, 修回日期: 2009-05-19。

木聚糖酶进行了深入研究,模拟了热稳定性木聚糖酶的分子结构^[14],并分析了F/10和G/11家族间密码子偏好性^[15]。在进行木聚糖酶结构域融合研究中发现,在传统PCR中加入自我延伸过程的融合PCR,用不同的延伸时间可以得到比传统PCR扩增融合基因条带更亮的方法,笔者以黑曲霉木聚糖酶 *xynIII* 与海栖热孢菌的纤维素结合结构域(CBD)融合为例说明,为结构域融合工作者提供帮助。

1 材料与方法

以该实验室克隆得到的黑曲霉木聚糖酶 *XynIII* 基因(GenBank 登陆号为:EU375728),海栖热孢菌木聚糖酶A的纤维素结合结构域(CBD)(淮阴工学院李相前惠赠)为融合材料,以pET20b作为载体,BL21(DE3)为受体细胞。通过PCR扩增DNA片断后,用基因回收试剂盒回收纯化(Shenergy Bioclor),PCR扩增试剂,Pfu酶,dNTP均来自于Takara。引物p1、p2、p3、p4序列如下(由Takara公司合成),其中p2、p3之间有搭头区域,以黑色斜体显示,自我延伸的退火温度根据此序列计算。

p1/p2: 5'-attccatatgagtcccggtatcaac-3'/ 5'-gggtgg-aaggacctcaggagaggagatcgtgacac-3'

p3/p4: 5'-ccagtgtcacgatctcctctcctgaggtcctcca - 3'/ 5'-attactcgagcttgatgagcctgag - 3'

第一步扩增木聚糖酶基因:用p1/p2引物各1 μl,用含有*XynIII*基因的pET20b质粒2 μl为模板,Pfu酶0.5 μl,PCR程序:94 °C×5 min,(94 °C×1 min,41 °C×1 min,72 °C×1 min)×30次循环,72 °C×10 min,4 °C store)。

第二步扩增CBD基因:以p3/p4为引物各1 μl,用含有CBD基因的pET20b质粒2 μl为模板,Pfu酶0.5 μl,PCR程序:94 °C×5 min,(94 °C×1 min,40 °C×1 min,

72 °C×1 min)×30次循环,72 °C×10 min,4 °C store);将这两次的PCR产物用1%(W/V)凝胶电泳分离,用DNA纯化试剂盒回收基因(Takara)。

第三步扩增融合基因*XynIII*-CBD:分别用两种纯化后*XynIII*和CBD基因各2 μl作为扩增融合基因的模板,用p1/p4各1 μl作为引物,Pfu酶0.5 μl,分3种程序进行,以比较自我延伸过程中延伸时间对融合基因扩增量的影响:(1)传统PCR扩增融合基因*XynIII*-CBD,直接以94 °C×5 min,(94 °C×1 min,33 °C×1 min,72 °C×1 min)×30次循环,72 °C×10 min,4 °C store。(2)加入自我延伸程序的融合PCR程序:94 °C×5 min,(52 °C×1 min,72 °C×1 min)×2次循环,(94 °C×1 min,33 °C×1 min,72 °C×1 min)×30次循环,72 °C×10 min,4 °C store,在这个自我延伸程序中探讨延伸时间为(1、2、3、5 min)对扩增融合基因的影响,与传统PCR扩增出的融合基因条带进行比较,从中探讨最佳的延伸扩增时间。

2 结果与讨论

加入自我延伸程序中延伸时间对融合基因扩增条带的影响,在传统PCR程序中加入了自我延伸程序,当自我延伸程序中的延伸时间为2 min、3 min、5 min时,扩增的融合基因条带显著比传统PCR扩增条带亮,同时,剩余的DNA模板要少一些(图1;图2)。这个自我延伸过程将两个片断融合在一起作为后续PCR扩增的模板。当自我延伸程序中延伸时间为1 min时,扩增出的融合基因条带与传统PCR扩增的条带相近,说明自我延伸程序中延伸时间是决定后续PCR量的主要影响因素。研究发现当用0.5 μl、1 μl作为融合基因扩增的模板时,自我延伸程序3次扩增出的基因条带亮度比传统PCR要亮一些,这说明当模板

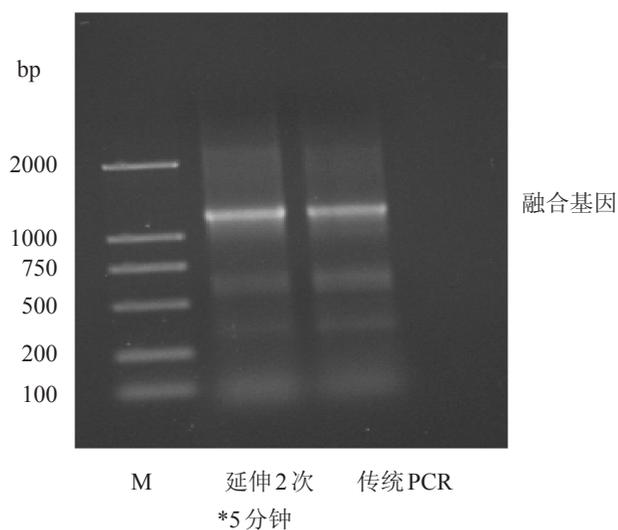


图1 自我延伸2次(每次5 min)与传统PCR的比较

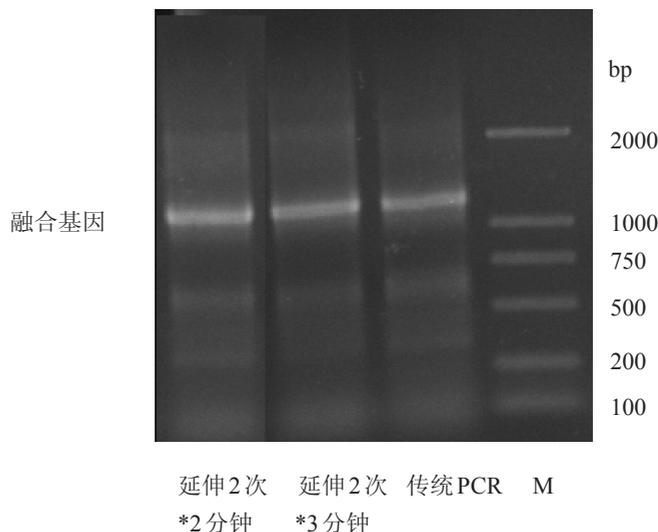


图2 自我延伸程序延伸时间对扩增量的影响

量少时可以通过增加自我延伸的扩增次数达到扩增模板量。

3 讨论和结论

在融合基因扩增过程中,传统PCR方法是以两段DNA为模板,以p1/p4为引物,以p1/p4引物的退火温度进行扩增。因为没有加入自我延伸过程,所以人们常常是通过多次PCR扩增,将多次PCR产物集中起来得到连接产物浓度的方法。此文通过探讨自我延伸过程中的延伸时间,发现加入2次循环的自我延伸过程,通过调整不同的延伸时间可以达到增加融合基因的方法,发现延伸时间为2 min、3 min、5 min时可以得到亮度比传统PCR扩增基因多。加入自我延伸程序的融合PCR过程是通过明确确定的自我延伸过程得到全长基因模板的,而传统PCR则是在PCR过程中合成全长基因,而后再以这些基因作为模板进行扩增的。

加入自我延伸程序的融合PCR用到两个退火温度:第一个退火温度52℃是为了让接头区域互补匹配合成融合基因,第二个退火温度33℃是为了让p1、p4引物与自我延伸得到的融合基因互补匹配。搭头区域的退火温度是以搭头区域互补匹配序列的碱基长度和种类计算得到,如果搭头区域较长则退火温度要高,反之则温度低。所以在设计融合引物时要注意与两端拼接序列的共有部分对应,可以把这段序列作为基因内部一段序列来对待,正向引物是搭头区域序列一部分,而反向引物是搭头区域的互补序列。加入自我延伸程序的融合PCR扩增程序为:94℃×5 min,(94℃×1 min,52℃×1 min,72℃×5 min)×2次循环,(94℃×1 min,52℃×1 min,72℃×1 min)×30次,4℃ store。

参考文献

- [1] Xue G, Gobius K, Orpin C. A novel polysaccharide hydrolase cNAD (celD) from *Neocallimastix pareiciarum* encoding three multi-functional catalytic domains with high endoglucanase, cellobiohydrolase and xylanase activities [J]. *J Gen Microbiol*,1992, 138:2397-2403.
- [2] Flint H, Martin J, Mcpherson C, et al. A bifunctional enzyme, with separate xylanase and β (1,3-1,4)-glucanase domains, encoded by the xynD gene of *Ruminococcus flavefaciens* [J]. *J Bacteriol* ,1993, 175:2943-2951.
- [3] 顏冰,黄培堂.脑药物转运载体-抗转铁蛋白受体单链抗体的克隆表达及鉴定.中国生物化学与分子生物学报,2002,18:303-307.
- [4] 陆长梅,袁生,赵庆新.用 Overlap PCR 法从 *Trichoderma reesei* QM9414 基因组 DNA 中克隆并表木聚糖酶 III.生物工程学报,2004,20:566-967.
- [5] Trujillo M, Duncan R, Santi D. Construction of a homodimeric dihydrofolate reductase-thymidylate synthase bifunctional enzyme [J]. *Protein Eng* ,1997, 10:567-573.
- [6] Hong S, Lee J, Cho K, et al. Assembling a novel bifunctional cellulase-xylanase from *Thermotoga maritima* by end-to-end fusion [J]. *Biotechnol Lett* ,2006, 28:1857-1862.
- [7] Lu P, Feng M. Bifunctional enhancement of a beta-glucanase-xylanase fusion enzyme by optimization of peptide linkers [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* ,2008, 79:579-587.
- [8] Lu P, Feng M, Li W, et al. Construction and characterization of a bifunctional fusion enzyme of *Bacillus*-sourced β -glucanase and xylanase expressed in *Escherichia coli* [J]. *FEMS Microbiol Lett* , 2006, 261:224-230.
- [9] 李相前,邵蔚蓝.海栖热袍菌葡聚糖内切酶 Cel12B 与木聚糖酶 XynA CBD 结构域融合基因的构建、表达及融合酶性质分析.微生物学报,2006,46:726-729.
- [10] Mangala SI, Kittur Fs, Nishimoto M, et al. Fusion of family VI cellulose binding domains to *Bacillus halodurans* xylanase increases its catalytic activity and substrate-binding capacity to insoluble xylan [J]. *J Mol Catal B-Enzym* ,2003,21:221-230.
- [11] Sun J, Liu M, Xu Y, et al. Improvement of the thermostability and catalytic activity of a mesophilic family 11 xylanase by N-terminus replacement [J]. *Pro Exp Puri* , 2005, 42:122-130.
- [12] Kleine J, Liebl W. Comparative characterization of deletion derivatives of the modular xylanase XynA of *Thermotoga maritima* [J]. *Extremophiles* ,2006, 10:373-381.
- [13] Mamo G, Hatti-Kaul R, Mattiasson B. Fusion of carbohydrate binding modules from *Thermotoga neapolitana* with a family 10 xylanase from *Bacillus halodurans* S7 [J]. *Extremophiles* , 2007, 11: 169-177.
- [14] 刘亮伟,秦天苍,刘新育,等.热稳定性木聚糖酶结构模拟及分析.河南农业大学学报,2007,41(3):304-308.
- [15] 刘亮伟,秦天苍,翟继,等.热稳定性木聚糖酶结构模拟及分析.木聚糖酶密码子偏好性研究.河南农业大学学报,2008,42:223-227.