

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.12.01

# 2 种重叠延伸 PCR 技术构建 5 种立克次体融合基因的方法学比较\*

郑雨桐<sup>1,2</sup>, 闫美田<sup>1,2</sup>, 万楠<sup>2</sup>(1.大连医科大学研究生院,辽宁大连 116044;2.中国人民解放军北部战区总医院检验科,沈阳 110016)

**摘要:**目的 采用 2 种重叠延伸 PCR(SOE-PCR)技术将 5 种立克次体目的基因片段进行融合,同时对 2 种方法进行比较。方法 采用一步法及两步法融合基因技术,对 5 种立克次体融合基因进行构建,并优化一步法中重叠引物浓度以及两步法中各靶基因产物加入量,以提高 2 种方法的融合效率。结果 成功建立 5 种立克次体融合基因。一步法基因融合过程中重叠引物浓度在 0.1~0.01  $\mu\text{mol/L}$  时,912 bp 的融合基因条带亮度较高,且杂带较少;两步法基因融合过程中各靶基因产物加入量为 0.1~0.25  $\mu\text{L}$  时,912 bp 的融合基因条带亮度较高,且杂带较少。结论 一步法基因融合技术操作简单、耗时短且耗材少,在控制好退火时的温度及时间的情况下是一种经济、方便且高效的融合技术。为后续进行立克次体融合基因表达载体构建以及立克次体分子生物学多重检测提供实验模板。

**关键词:**重叠延伸 PCR 技术;融合基因;一步法;两步法;方法学比较

中图分类号:R446;R376

文献标志码:A

## Comparison of two SOE-PCR methods for fusion gene construction of five Rickettsiae

ZHENG Yutong<sup>1,2</sup>, YAN Meitian<sup>1,2</sup>, WAN Nan<sup>2</sup>(1. Graduate School of Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning; 2. Laboratory Department of General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110016, Liaoning, China)

**Abstract: Objective** To construct a fuse gene of the fragments from five Rickettsiae by two overlapping extension PCR (SOE-PCR) methods, and compared the results of the two methods. **Methods** The fused genes from five Rickettsiae were constructed by one-step and two-step fusion gene techniques respectively, and the concentration of overlapping primers in the one-step method and the addition amount of target gene products in the two-step method were optimized, so as to improve the fusion efficiency of the two methods. **Results** A fused gene from five Rickettsiae was successfully established. In the process of one-step gene fusion, when the concentration of overlapping primers was 0.01 to 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , the band of 912 bp fusion gene had higher brightness and fewer miscellaneous bands, while in the two-step gene fusion process, when the amount of target gene products was 0.1 to 0.25  $\mu\text{L}$ , the band of 912 bp fusion gene had higher brightness and fewer miscellaneous bands. **Conclusion** The one-step gene fusion technology should be an economical, convenient and efficient fusion technology since its simple operation, short time consumption and less consumptive materials under the conditions of controlling the temperature and time of annealing. It may provide an experimental template for the subsequent construction of Rickettsiae fusion gene expression vector and multiple detections of Rickettsiae with molecular biological methods.

**Key words:** overlapping extension PCR (SOE-PCR); fusion gene; one-step method; two-step method; methodological comparison

重叠延伸 PCR (overlapping extension PCR, SOE-PCR) 技术最早于 1989 年由 Horton 等<sup>[1]</sup>创建,经过 30 多年的探索研究,现已是分子生物学及基因工程研究领域较为常见的 PCR 技术。该方法是通过设计内部具有重叠部分的特异性引物,经 PCR,将 2 个及 2 个以上的基因片段拼接起来的过程<sup>[2]</sup>。与传统的基因融合重组构建方法不同,SOE-PCR 技术无需限制性内切酶和 DNA 连接酶的处理<sup>[3]</sup>,是一种方便、快捷及有效的分子生物学方法。

随着研究的不断进展,基于 SOE-PCR 技术可以

将多个 DNA 片段同时无缝融合在一起,目前已获得的最大融合基因片段长度超过  $2 \times 10^4$  bp<sup>[4]</sup>。利用此技术可以在目的序列中引入突变、删除和替换位点等<sup>[5]</sup>。另外,此技术还可以将若干个短的相互重叠的引物拼接起来进行全基因合成<sup>[6]</sup>。但是该技术在实验过程中仍有许多不足之处,例如在实验开始时必须使用特异性引物将各基因片段进行单独扩增后才能进行基因融合,即需要进行 2 次 PCR 反应(两步 SOE-PCR 法),不仅耗时,而且增加了实验成本。基于繁琐的两步法,本实验设计出一步

\* 基金项目:辽宁省自然科学基金(2019-ZD-1027);秦康同济新型冠状病毒专项基金(Tkjky2020069)。

作者简介:郑雨桐,1994 年生,女,硕士研究生,研究方向为病原生物学与分子生物学。

通信作者:万楠,副主任技师,博士, E-mail:wannan@outlook.com。

SOE-PCR法,将整个实验 PCR 反应减少至 1 次;并采用一步法及两步法 SOE-PCR 分别对普氏立克次体、嗜吞噬细胞无形体、莫氏立克次体、恙虫病东方体、贝氏柯克斯体 5 个基因片段进行拼接融合,并对 2 种方法进行比较性分析,为 SOE-PCR 技术及更多的基因融合提供实验依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 研究对象(靶基因选取与质粒)** 从 NCBI 基因数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载普氏立克次体 (AF123718)、嗜吞噬细胞无形体 (AF153716)、莫氏立克次体 (KF241858)、恙虫病东方体 (RIRGM47G)、贝氏柯克斯体 (AF146298) 全基因序列,通过 BLAST 分析找到保守且特异的序列并由通用生物系统公司合成基因片段。

**1.2 仪器与试剂** pGMT-easy 克隆载体、pGMT-easy 连接试剂盒、2×EasyTaq PCR SuperMix、2×TransStart FastPfu PCR SuperMix、Trans2K Plus DNA Marker、6×

DNA Loading Buffer、琼脂糖凝胶粉剂均购自北京全式金生物技术公司,50×TAE 购自北京赛文创新生物科技公司。AG 5333 型 PCR 扩增仪购自德国 Eppendorf 公司,琼脂糖凝胶电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司,UVP 凝胶成像仪购自美国 UVP 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 引物设计及验证** 5 对特异性引物合成由上海生工公司完成,片段大小及引物设计序列见表 1。将 5 个靶基因质粒及 5 对特异性引物分别构建 50 μL PCR 扩增体系进行 PCR 扩增,体系中各成分含量包括:靶基因质粒模板 1 μL,10 μmol/L 上、下游特异性引物各 1 μL,2×EasyTaq PCR SuperMix 25 μL,ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL。循环参数:96 °C 5 min;96 °C 22 s,56 °C 22 s,72 °C 25 s,共 30 个循环;72 °C 5 min,4 °C 保存。扩增结束后进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,并通过 UVP 凝胶成像仪观察是否扩增出相应的 5 个目的基因。

表 1 5 种立克次体靶基因的选取及重叠引物的设计

病原体名称(基因号)	目的基因 序列位置	片段大小 (bp)	特异性引物、重叠引物设计序列(5'→3')
普氏立克次体(AF123718)	1 857~2 220	364	F:ATGCTGGCGATGTCGCTATT R:TCCCTCTACATTCACGACGTTGCTGTCCACCACTGTACC
嗜吞噬细胞无形体(AF153716)	2 646~2 777	132	F:TACAGTTGGTGGACAGCACAGTCGTGAATGTAGAGGGAAAAAC R:AAGCATTAGCGGCATCAGGAGGAATCCCCCTTCAGGAACTTG
莫氏立克次体(KF241858)	741~953	213	F:AGTTCCTGAAGGGGGATTCTCCTGTATGCCGCTAATGCTT R:TAGTTTGAATAAAATCAGTTGCAGCACCTCCATTAGCGAT
恙虫病东方体(RIRGM47G)	630~756	127	F:CTAATGGAGGTGCTGCAACTGATTTTATTCAAACCTAATGCTGCT R:CACACCCGTAAAATAACGAGCAAACTTATGCCTGAGTAAG
贝氏柯克斯体(AF146298)	439~514	76	F:ACTCAGGCATAAGTTTGTCTCGTTATTTTACGGGTGTGCCA R:CAGAAATTTTCGGGAAAAATCAC

注:下划线部分为与相邻靶基因的互补序列;无下划线部分为靶基因的特异性引物序列。

**1.3.2 一步法 SOE-PCR** 以 5 个靶基因质粒为模板,构建 50 μL PCR 扩增体系,体系中各成分含量如下:5 个模板各 1 μL,设计出的 5 对重叠引物各 1 μL,2×TransStart FastPfu PCR SuperMix 25 μL,ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL。循环参数:96 °C 5 min;96 °C 22 s,56 °C 22 s,72 °C 25 s,共 5 个循环;72 °C 5 min;反应结束后将循环参数调整为:96 °C 22 s,60 °C 1 min,72 °C 2 min,共 5 个循环;72 °C 5 min。待反应结束后取出产物,加入另外 50 μL 反应体系,体系中各成分含量如下:普氏立克次体 F 与贝氏立克次体 R (10 μmol/L) 各 1 μL,2×TransStart FastPfu PCR SuperMix 25 μL,ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL。循环参数:96 °C 22 s,60 °C 1 min,72 °C 25 s,共 30 个循环;72 °C 5 min,4 °C 保存。为了能获得均一性较好

的融合基因,本实验对反应过程中重叠引物的浓度进行优化,梯度如下:10 μmol/L、5 μmol/L、2.5 μmol/L、1 μmol/L、0.5 μmol/L、0.25 μmol/L、0.1 μmol/L、0.05 μmol/L、0.025 μmol/L、0.01 μmol/L。分别按上述浓度进行一步法 SOE-PCR,获得的融合基因产物进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,并通过 UVP 凝胶成像仪观察结果。

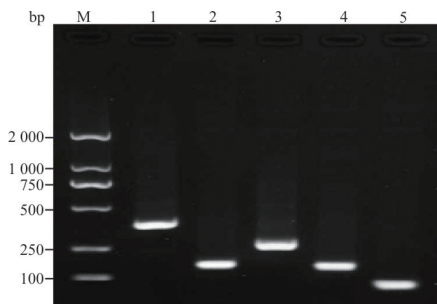
**1.3.3 两步法 SOE-PCR** 以 5 个靶基因质粒为模板,构建 50 μL PCR 扩增体系,分别扩增出相应的目的基因产物(此过程中重叠引物浓度为 10 μmol/L),获得的产物无需进行回收纯化处理。将 5 种目的基因产物进行等体积混合,构建 50 μL PCR 扩增体系,除等体积混合的产物外,体系中其他各成分含量如下:2×TransStart FastPfu PCR Super-

Mix 25  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足至 50  $\mu\text{L}$  (此步骤无需加入任何引物)。循环参数: 96  $^{\circ}\text{C}$  22 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 共 5 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 待反应结束后取出产物, 加入另外 50  $\mu\text{L}$  反应体系, 体系中各成分含量如下: 普氏立克次体 F 与贝氏立克次体 R (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , 2 $\times$ TransStart FastPfu PCR SuperMix 25  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足至 50  $\mu\text{L}$ 。循环参数: 96  $^{\circ}\text{C}$  22 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  25 s, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。为了能获得均一性较好的融合基因, 本实验对各靶基因产物加入量进行优化, 梯度如下: 0.1  $\mu\text{L}$ 、0.15  $\mu\text{L}$ 、0.2  $\mu\text{L}$ 、0.25  $\mu\text{L}$ 、0.5  $\mu\text{L}$ 、1  $\mu\text{L}$ 、1.5  $\mu\text{L}$ 、2  $\mu\text{L}$ 、2.5  $\mu\text{L}$ 、3  $\mu\text{L}$ 。分别按上述体积进行两步法 SOE-PCR, 获得的融合基因产物行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 并通过 UVP 凝胶成像仪观察结果。

**1.3.4 测序验证** 将 2 种不同方法获得的最佳融合基因产物送往上海生工公司进行测序。测序结果用 Chromas 及 Seqman 软件进行比对分析。

## 2 结果

**2.1 引物验证** 将 5 个靶基因质粒分别进行 PCR 扩增, 结果中出现 5 个相应片段长度的条带, 表明本研究所设计的引物可以扩增出相应的目的基因。见图 1。

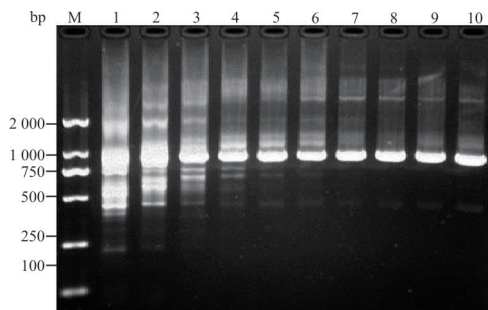


注: 1~5 分别为普氏立克次体 (364 bp)、嗜吞噬细胞无形体 (132 bp)、莫氏立克次体 (213 bp)、羌虫病东方体 (127 bp)、贝氏柯克斯体 (76 bp); M, DNA Marker。

图 1 5 个靶基因质粒 PCR 扩增电泳结果

**2.2 一步法融合基因检测结果** 利用方法 1.3.2 进行一步法 SOE-PCR, 电泳结果显示均可扩增出长度约为 912 bp 的目的基因条带, 初步证明 5 条目的基因

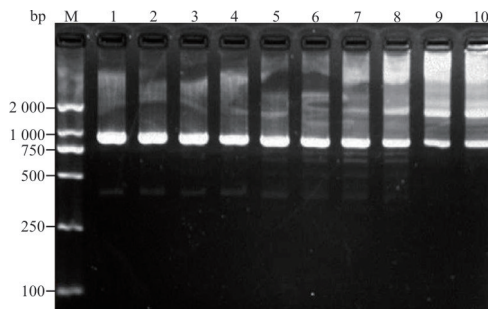
已融合成 1 条; 另外, 当重叠引物的浓度为 0.1~0.01  $\mu\text{mol/L}$  时, 912 bp 的融合基因条带亮度较高, 且杂带较少。见图 2。



注: M, DNA Marker; 1~10, 重叠引物浓度梯度分别为 10  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$ 、2.5  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$ 、0.5  $\mu\text{mol/L}$ 、0.25  $\mu\text{mol/L}$ 、0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、0.05  $\mu\text{mol/L}$ 、0.025  $\mu\text{mol/L}$ 、0.01  $\mu\text{mol/L}$ 。

图 2 一步法融合基因结果电泳分析

**2.3 两步法融合基因检测结果** 利用方法 1.3.3 进行两步法 SOE-PCR, 电泳结果显示均可扩增出长度约为 912 bp 的目的基因条带, 初步证明 5 条目的基因已融合成 1 条; 另外, 当各靶基因产物加入量为 0.1~0.25  $\mu\text{L}$  时, 912 bp 的融合基因条带亮度较高, 且杂带较少。见图 3。

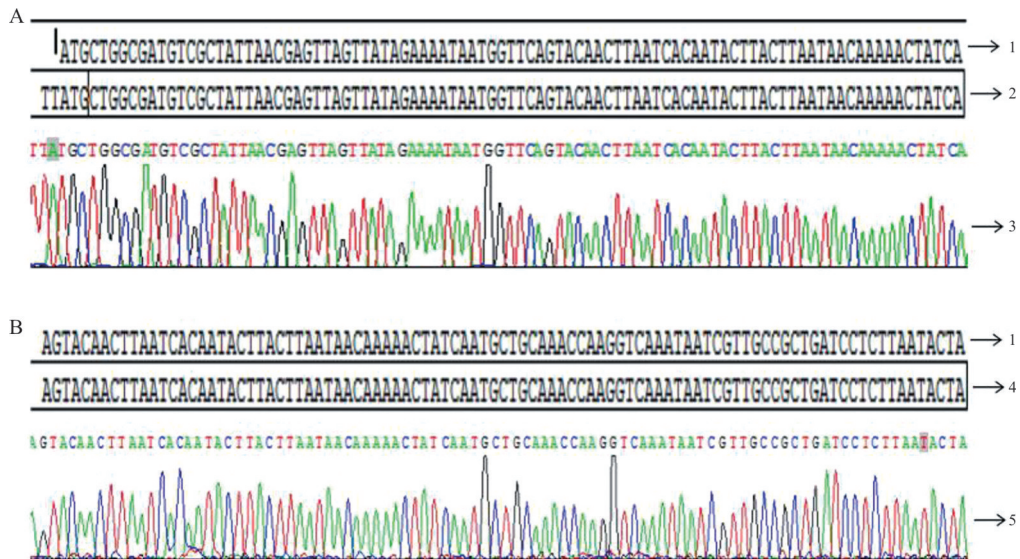


注: M, DNA Marker; 1~10, 各靶基因产物加入量梯度分别为 0.1  $\mu\text{L}$ 、0.15  $\mu\text{L}$ 、0.2  $\mu\text{L}$ 、0.25  $\mu\text{L}$ 、0.5  $\mu\text{L}$ 、1  $\mu\text{L}$ 、1.5  $\mu\text{L}$ 、2  $\mu\text{L}$ 、2.5  $\mu\text{L}$ 、3  $\mu\text{L}$ 。

图 3 两步法融合基因结果电泳分析

**2.4 测序验证结果** 2 种不同方法获得的最佳融合基因产物测序结果与融合基因序列进行比对, 结果显示一步法和两步法 PCR 产物中均含有与融合基因全长序列完全相同的部分, 因此, 该 2 种方法构建融合基因均获得成功。见图 4。





注:A 为一步法融合基因产物部分测序结果比对结果;1, 部分融合基因序列;2, 一步法测序部分序列结果;3, 一步法融合基因产物部分测序峰图;B 为两步法融合基因产物部分测序结果比对结果;4, 两步法测序部分序列结果;5, 两步法融合基因产物部分测序峰图。

图 4 2 种不同方法获得的融合基因产物测序结果与融合基因部分序列比对结果

### 3 讨论

1989 年 SOE-PCR 技术问世, 实现了将不同或相同来源的不同基因片段“拼接”, 与传统的基因重组构建方法相比, 这种功能强大且技术简单的方法具备许多优势<sup>[7-9]</sup>。在实际科研工作中, 我们发现多数研究人员会选择两步 SOE-PCR 方法, 例如伊强等<sup>[10]</sup>通过两步 SOE-PCR 方法构建了 EB 病毒 *BMRF1-BZLF1* 融合基因; 龚咏晴等<sup>[11]</sup>通过两步法构建与子宫内膜癌相关的 *PTEN* 基因 3 位点的融合重组载体; 董巍楠等<sup>[12]</sup>通过两步法将 exon18 和 exon20 片段进行融合, 且成功构建了宫颈癌相关的 *EGFR* 基因重组表达载体。

本实验通过 2 种不同步骤的 SOE-PCR 方法, 均成功将 5 种立克次体目的基因“拼接”在一起。应用一步法进行基因融合时, 重叠引物的浓度需在  $0.1 \mu\text{mol/L}$  以下, 可融合出单一程度较高的 912 bp 全长基因, 即重叠引物的浓度与融合基因上、下游引物的浓度比例需在 1:100 以下。与陈国梁等<sup>[13]</sup>运用一步法 SOE-PCR 进行的 3 种淀粉合成关键酶的融合结果相似。另外, 运用传统两步法进行基因融合时, 以第一步获得的 5 个目的基因产物为模板加入量需控制在  $0.1 \sim 0.25 \mu\text{L}$  之间, 可融合出单一程度较高的 912 bp 全长基因。将 2 种方法进行对比发现, 一步法融合基因操作简单, 耗时短 (所用时间约为两步法的二分之一), 同时 DNA 聚合酶用量较少; 但在反应体系中一次性加入所有模板及引物, 退火过程中, 模板的互补配对部位会进行拼接, 同时引

物也在退火, 模板的拼接和扩增将会同时进行, 这样就相对降低了扩增初始阶段的模板浓度, 导致最终融合基因产物浓度较低。因此, 一步法中重叠引物浓度、退火温度及退火时间的把握至关重要。两步法融合基因耗时较长, 过程较为繁琐, 但由于先分别扩增出 5 个目的基因产物, 故而仅存在少量非特异性扩增, 目的基因浓度较高。但由于在基因融合过程中并不存在扩增反应, 只是单纯的互补延伸, 所以在第二步反应的初始阶段需要加入较高浓度的目的基因产物, 从而获得大量融合基因。因此, 大量的耗材是两步法融合基因的另外一个缺点。从上述分析中发现一步法 SOE-PCR 可以更加经济、简单、高效地完成多个基因片段的融合。

无论进行何种基因融合方法时, 为确保融合成功, 应注意以下多个方面: (1) 引物重叠部分的设计: 徐芳等<sup>[14]</sup>认为 SOE-PCR 技术应注重重叠引物的设计, 除应考虑引物设计的一般原则外, 还应考虑重叠部分的长度, 并建议重叠部分序列长度为 15~20 bp。另外, 还应注意重叠引物的  $T_m$  值, 建议设计所有引物的  $T_m$  值应相同或相近, 有助于提高融合效率。(2) DNA 聚合酶的种类: 由于普通 Taq 酶进行 PCR 扩增反应时, 会在 3' 末端添加 A, 造成移码突变, 因此选用高保真聚合酶是良好的选择, 从而为后续实验的成功奠定基础。(3) 退火温度的控制: 一步法 SOE-PCR 在退火过程中, 模板的拼接和扩增将会同时进行, 因此适当提高退火温度及延长退火时间可以提高融合基因的效率。

综上所述,本研究成功通过 SOE-PCR 技术在体外将 5 种立克次体进行融合,但本实验仍然存在以下不足:如仅对 2 种方法的重叠引物的浓度及目的基因产物加入量进行优化,其他环境参数(例如最合适的引物长度、最佳连续延伸的循环数、最佳退火温度及时间等)主要是通过实验经验进行掌控,这些问题还需要进一步实验证实。另外,后续实验中我们将继续进行立克次体融合基因表达载体构建,同时为立克次体分子生物学多重检测提供实验模板。

#### 4 参考文献

[1] Horton SN, Hunt HD, Horton RM, *et al.* Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction[J]. *Gene*, 1989, 77(1): 51-59.

[2] Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(4): 924-932.

[3] Shevchuk NA, Bryksin AV, Nusinovich YA, *et al.* Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(2): e19.

[4] Nelson MD, Fitch David HA. Overlap extension PCR: an efficient method for transgene construction[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 772: 459-470.

[5] Guo W, Xie BH, Jiang M, *et al.* An improved overlap extension PCR for simultaneous multiple sites large fragments insertion, dele-

tion and substitution[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 15637.

[6] Zhang PP, Ding YY, Liao WT, *et al.* A simple, universal, efficient PCR-based gene synthesis method: sequential OE-PCR gene synthesis[J]. *Gene*, 2013, 524(2): 347-354.

[7] Tran PT, Zhang CF, Citovsky V. Rapid generation of inoculum of a plant RNA virus using overlap PCR[J]. *Virology*, 2020, 553: 46-50.

[8] 陈尚良,刘正婷,黄佳丽,等.三种常见 CD36 基因突变体标准质粒的构建[J]. *检验医学与临床*, 2020, 17(12): 1659-1661, 1665.

[9] 佟陈响,郭平,马艳.肝靶向肽-人肿瘤坏死因子融合基因的克隆、可溶性表达及鉴定[J]. *广东药科大学学报*, 2020, 36(1): 118-123.

[10] 伊强,陈丹,杨滨,等.重叠延伸 PCR 构建 EB 病毒 *BMRF1-BZLF1* 融合基因[J]. *临床检验杂志*, 2013, 31(4): 279-281.

[11] 龚咏晴,彭华,周晶,等.重叠 PCR 法构建 *PTEN* 基因 3 位点的融合重组载体[J]. *临床检验杂志*, 2016, 34(10): 788-790.

[12] 董巍,向花花,彭华,等.重叠 PCR 法构建宫颈癌相关的 *EGFR* 基因 G719S 和 T790M 融合重组载体[J]. *临床检验杂志*, 2018, 36(2): 139-141, 147.

[13] 陈国梁,张金文,王蒂,等.重叠 PCR 一步法对三种淀粉合成酶融合基因的构建[J]. *甘肃农业大学学报*, 2010, 45(3): 38-43.

[14] 徐芳,姚泉洪,熊爱生,等.重叠延伸 PCR 技术及其在基因工程上的应用[J]. *分子植物育种*, 2006, 4(5): 747-750.

(收稿日期:2020-07-06)

(本文编辑:许晓蒙)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

### 更正

本刊 2020 年第 11 期《基于大规模人群新型冠状病毒核酸检测的经验介绍》一文第 839 页需作如下更正,特此说明。

1.“2 生物安全防护”部分“Ⅰ区和Ⅱ区的人员采取二级生物安全防护,Ⅲ区人员采取三级生物安全防护”这句话中,“Ⅱ区”应改为“Ⅲ区”,“Ⅲ区”应改为“Ⅱ区”。

2.表 1 的表注中,第 1 行“A~B 行”应改为“A~H 行”,第 2 行“A~B 行”应改为“A~H 行”。

《临床检验杂志》编辑部