

李景芬, 采克俊, 曹 访, 等. 反向、巢式、降落 PCR 技术克隆奥尼罗非鱼 *MSTN* 基因 3' 侧翼序列[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 28–30.

反向、巢式、降落 PCR 技术克隆奥尼罗非鱼 *MSTN* 基因 3' 侧翼序列

李景芬, 采克俊, 曹 访, 孙君艳, 梅杨玲

(湖州师范学院生命科学院, 浙江湖州 313000)

摘要:为获得奥尼罗非鱼侧翼 *MSTN* 基因的 3' 未知序列以完成奥尼罗非鱼 *MSTN* 基因全序列的克隆, 采用反向、巢式、降落等 3 种 PCR 技术对该未知序列进行克隆, 对克隆到的序列进行测序, 并与已有的奥尼罗非鱼 *MSTN* 基因核苷酸序列进行比对, 获得 *MSTN* 基因 3' 端 1 376 bp 新序列, 从而完成奥尼罗非鱼 *MSTN* 基因全序列的克隆, 为奥尼罗非鱼 *MSTN* 基因功能的进一步研究以及奥尼罗非鱼的分子育种研究奠定基础。说明反向、巢式、降落 PCR 相结合是扩增已知基因侧翼序列行之有效的方法。

关键词:反向 PCR; 巢式 PCR; 降落 PCR; 奥尼罗非鱼; *MSTN* 基因; 3' 侧翼序列

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2014)02–0028–03

奥尼罗非鱼 (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) 为奥利亚罗非鱼父本同尼罗罗非鱼母本杂交获得的良种, 雄性率高, 生长速度快, 群体产量高, 且抗病力强。因其肉白、富弹性、刺少而被称为“白色三文鱼”, 是联合国粮农组织向世界各国推荐养殖的优良水产品之一, 也是全球畅销的水产品之一^[1]。肌肉生长抑制素 (*MSTN*, 简称抑肌素) 基因是转录生长因子 β (*TGF- β*) 家族的一个成员, 最先在鼠中发现^[2], 并且已有研究证明该基因是哺乳动物骨骼肌生长发育的负调控因子。有研究表明, 该基因的功能在鱼与哺乳动物上一致, 即均可抑制骨骼肌生长, 如转基因斑马鱼因 *MSTN* 被抑制而使肌纤维数量明显增加^[3]; 通过 RNA 干扰沉默 *MSTN* 基因的斑马鱼表现出体型巨大化^[4]; *MSTN* 基因显性失活形式的过表达导致转基因青鳉的肌纤维数量在成年后加倍^[5]; 青鳉 *MSTN* 基因的缺失, 在幼鱼后期到成鱼初期表现为肌纤维数量的增加, 随后出现肌纤维的肥大, 呈现“双肌”表型^[6]。因此, 笔者选择反向、巢式、降落 3 种 PCR 技术克隆奥尼罗非鱼 *MSTN* 基因的 3' 侧翼序列, 以有效获得这一未知序列, 完成奥尼罗非鱼 *MSTN* 基因全序列的克隆, 从而为研究奥尼罗非鱼 *MSTN* 基因功能和分子育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的奥尼罗非鱼由浙江省淡水水产研究所提供。限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、*Xba* I、*Nco* I、*Bgl* II、*Hind* III, *T₄* DNA 连接酶, *rTaq* DNA 聚合酶, dNTP, DL 2000 DNA Marker、

琼脂糖、大肠杆菌 DH5 α 及质粒载体 pMD19–T vector 均购自 TaKaRa 公司。AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒、AxyPrep 质粒小量制备试剂盒、AxyPrep PCR Clean–up kit 均购自爱思进生物技术(杭州)有限公司。此外, 还有 EDTA、苯酚、三氯甲烷、异戊醇等。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 采用经典的苯酚–三氯甲烷法提取鱼血 DNA。2.0 μ L DNA 样品进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 再结合紫外分光光度计法检测所提取的 DNA 的重量和浓度。

1.2.2 DNA 的酶切 参照限制性内切酶说明书进行酶切试验, 分别采用 *Bgl* II、*Xho* I、*Nco* I、*Bam*H I、*Hind* III、*Xba* I 等 6 种限制性内切酶对基因组 DNA 进行酶切, 酶切反应总体积为 40 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴酶切 18 h。用电泳检测酶切效果, 之后用 AxyPrep PCR Clean–up kit 进行纯化, 用 20 μ L ddH₂O 洗脱以去除限制性内切酶。

1.2.3 酶切片段的连接与酶切片段的连接环化 参照 *T₄* DNA 连接酶说明书进行连接, 反应体系为 100 μ L [包括 82 μ L ddH₂O、10 μ L *T₄* DNA Ligase Buffer、6 μ L 酶切产物 (> 50 ng/ μ L) 和 2 μ L *T₄* DNA 连接酶], 16 $^{\circ}$ C 连接 21 h, 再用 AxyPrepTM PCR Clean up kit 进行纯化, 以 10 μ L ddH₂O 洗脱, 获得 5 个酶切库。

1.2.4 引物设计与 PCR 扩增 已克隆到的奥尼罗非鱼 *MSTN* 基因序列设计引物, 由上海英骏公司合成。反向、巢式 PCR 第 1 轮引物: 1S 为 5'–CTTCTTCCCTGTTGTCATCTC–CCAGCAC–3', 1A 为 5'–CTACCCACTCACTGTGGACT–TCGAGGAC–3'; 第 2 轮引物: 2S 为 5'–TCGTAAGCTGCTGCA–3', 2A 为 5'–CCCCAACAAAGAT–GTCGCCAATCAA–3'。引物 1S 和 1A 分别以各酶切库为模板进行第 1 轮反向、巢式、降落 PCR, PCR 体系 50 μ L 包括 10 PCR Buffer 5 μ L, 10 mmol/L dNTP 4 μ L, 10 pmol/ μ L 1S 4 μ L, 10 pmol/ μ L 1A 4 μ L, 25 ng/ μ L 模板 2 μ L, 5 U/ μ L *rTaq* 0.4 μ L, ddH₂O 30.6 μ L。扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 73、71、69、67、65、63、61 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延

收稿日期: 2013–07–05

基金项目: 浙江省自然科学基金 (编号: Y3110432、Y3090561); 浙江省钱江人才计划 (编号: 2012R10076); 浙江省公益性技术应用研究计划 (编号: 2011C37078); 浙江省重点创新团队项目 (编号: 2012R10026–05)。

作者简介: 李景芬 (1977–), 女, 浙江湖州人, 博士, 主要从事分子生物学方面的研究。E–mail: lijingfen@hutc.zj.cn。

伸 3 min, 每个退火温度均如此循环 3 次; 95 °C 变性 30 s; 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 3 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 结束后电泳。

对 PCR 产物进行 30 倍稀释, 以稀释后的 PCR 产物为第 2 轮 PCR 的模版, PCR 体系、程序同第 1 轮, 只是引物为 2S、2A, 模版为 4 μ L, ddH₂O 28.6 μ L。PCR 结束后电泳。

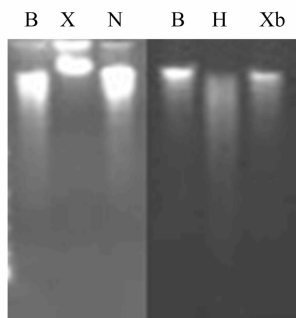
1.2.5 PCR 产物克隆与测序 用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收和纯化 PCR 扩增的目的片段。将纯化的 DNA 片段与 pMD-19T Vector 连接, 构建重组质粒, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , PCR 法筛选重组子, 摇匀, 用 AxyPrep 质粒小量制备试剂盒提取质粒, 双酶切 (*Bam*H I、*Hind* III) 鉴定正确后送往上海英骏公司测序。

1.2.6 序列分析 采用 DNAMAN 软件进行序列分析, 与 GenBank 数据库的相关序列进行核苷酸序列同源性比较。

2 结果与分析

2.1 奥尼罗非鱼 *MSTN* 基因 3' 侧翼序列的扩增与克隆

基因组 DNA 分别采用 *Bgl* II、*Xho* I、*Nco* I、*Bam*H I、*Hind* III 和 *Xba* I 进行酶切, 结果见图 1。由图 1 可知, X 泳道的基因组没切开, 应舍弃; 其余酶切较好, 从上到下可看见弥散的条带, 分别纯化后连接作为 PCR 的模板库。第 1 轮反向、巢式、降落 PCR 扩增结果见图 2, 未获得特异性的 PCR 条带。第 2 轮反向、巢式、降落 PCR 扩增结果见图 3, 从 *Bgl* II 库中扩增到约 1 450 bp 的特异性条带, 从 *Nco* I 库中扩增出约 960 bp 的特异性目的条带, 而从 *Bam*H I、*Xho* I 和 *Xba* I 库中均未扩增出特异性目的条带。将所获得的 2 条特异性目的条带进行克隆测序, 将测序所获得的序列与已有的奥尼罗非鱼 *MSTN* 基因序列进行核苷酸序列比对, 获得 3' 端 1 376 bp 新序列。



泳道从左到右分别是 *Bgl* II、*Xho* I、*Nco* I、*Bam*H I、*Hind* III、*Xba* I 酶切的结果

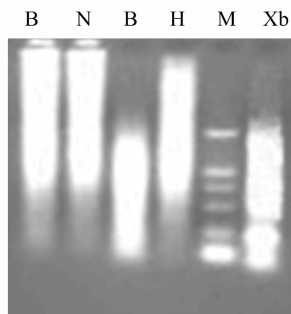
图1 基因组DNA酶切图谱

2.2 奥尼罗非鱼 *MSTN* 基因新获得序列分析

将所获得的新序列在网上进行在线 Blast 分析, 该新序列与莫桑比克罗非鱼的 *MSTN* 基因序列相似度为 99%, 与点带石斑鱼和加州鲈的 *MSTN* 基因序列相似度为 85%, 与尼罗尖吻鲈的 *MSTN* 基因序列相似度为 81%。目前已经得到了奥尼罗非鱼 *MSTN* 基因的全部序列, 并已提交给 GenBank, 序列号为 KC583258。

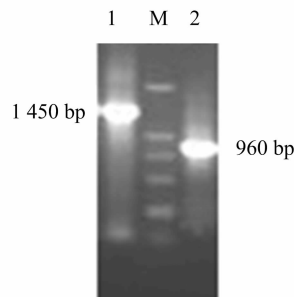
3 结论与讨论

反向 PCR 技术是由 Ochman 等研究开发的^[7-8], 主要用



M—DL2000 marker; 此外, 泳道从左到右分别是以 *Bgl* II、*Nco* I、*Bam*H I、*Hind* III、*Xba* I 的酶切库为模板的 PCR 图谱

图2 反向、巢式、降落第 1 轮 PCR 图谱



1、2—分别以 *Bgl* II 和 *Nco* I 酶切库为模版进行扩增得到的特异性目的片段; M—DL2000 marker

图3 反向、巢式、降落第 2 轮 PCR 图谱

于扩增与已知 DNA 序列相邻的未知 DNA 序列。对含有已知序列及其相邻未知序列的基因组 DNA 样品用一种在已知序列中无酶切位点的限制性内切酶进行酶切, 再用 T₄ DNA 连接酶使酶切片段连接环化, 之后以环化的 DNA 库为模板, 用一对与已知序列两端特异性结合的引物向夹在中间的未知序列部分进行扩增。该方法在很多研究中都有应用^[7-12], 本研究利用该方法也成功得到了奥尼罗非鱼 *MSTN* 基因 3' 端 1 376 bp 的未知序列。

巢式 PCR 在医学检测和分子生物学方面研究应用较多^[13-16]。该方法的原理是设计 2 对引物, 第 1 次 PCR 采用能扩增较大片段的引物, 扩增结束后, 采用能扩增较小片段的引物, 以第 1 次扩增的产物为模板进行第 2 次扩增, 以增强扩增的特异性。本研究设计了 2 对引物, 先用扩增较大片段的引物进行扩增, 结果如图 2 所示, 未扩增到单一的目的条带; 再用扩增较小片段的引物以第 1 次扩增产物为模板进行第 2 次扩增, 结果如图 3 所示, 得到了非常单一、特异性的目的条带, 达到了试验的目的。由此可见, 巢式 PCR 能有效获得特异性目的片段。

降落 PCR 是一种多循环 PCR, 其原理是: 随循环数增加, 退火温度逐渐降低, 当退火温度低于解链温度 ($T_m \approx 10$ °C) 时, 则固定于该退火温度进行扩增, 从而达到最佳扩增效果^[17-18]。起始退火温度可高于 T_m (约为 5 °C), 然后每个循环降低 1~2 °C 或每几个循环降低 1~2 °C, 直到退火温度低于 T_m (约为 10 °C)。尽管退火温度最终降低到非特异性杂交的 T_m , 但此时目的扩增产物已开始几何扩增, 在剩余循环中超过任何非特异性产物的扩增量。虽然降落 PCR 程序复杂, 但能非常有效地降低或避免假阳性^[19], 尤其对那些不了解的

引物和目的模版匹配程度,比如在用简并引物进行扩增时,笔者就曾经利用降落 PCR、简并引物顺利克隆了草鱼的 *PKR* 基因^[20]。对于 T_m 相近的 PCR 反应可在同一循环条件下进行,可大大提高工作效率^[21]。对不确定退火温度基因的扩增而言,这是首选^[22]。由此可见,降落 PCR 在基因克隆上有较强的优势,可用于普通 PCR 难以扩增的基因片段。反向 PCR 结合巢式 PCR 在低拷贝甚至是单拷贝基因的侧翼序列克隆时,可显示其较好的特异性和灵敏度^[23]。本试验联合使用这 3 种 PCR,有效获得了奥尼罗非鱼 *MSTN* 基因的 3'侧翼这一未知序列,完成了奥尼罗非鱼 *MSTN* 基因全序列的克隆。

从本试验顺利成功的实施可以看出,反向、巢式、降落 PCR 相结合是扩增已知基因侧翼序列行之有效的方法。如只采用反向 PCR(图 2)不能获得目的条带,但结合巢式 PCR 就得到了特异性目的条带。但反向、巢式 PCR 相结合,用普通的 PCR 程序进行扩增,本研究没有扩增到任何条带,而在此基础上采用降落 PCR 后扩增到了目的条带,说明 3 种 PCR 技术相结合可有效获得目的条带,提高效率。另外,该方法比较经济,避免了使用 RACE 法的高昂费用。笔者计算过该方法涉及到的试剂费用约需 2 500 元,而完成该试验每种试剂只用了一点点;而 RACE 法只 1 个 10 次的 3'RACE 试剂盒就 2 000 元左右。再者,该方法操作严格度低,虽然步骤繁琐,但都是在 DNA 上进行的,操作严格度相对宽松;而 RACE 法的对象是 RNA,操作与 DNA 相比相对比较严格。由此可见,反向、巢式和降落 PCR 技术相结合是克隆已知基因旁侧序列经济、有效并可广泛使用的好方法,为科研工作者提供了克隆已知基因旁侧序列的新途径。

参考文献:

- [1] 梁素娟,李登明,杨 琼,等. 奥尼罗非鱼池塘生态养殖试验[J]. 大众科技,2012,14(12):112-113.
- [2] McPherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member[J]. Nature, 1997,387(6628):83-90.
- [3] Xu C, Wu G, Zohar Y, et al. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish[J]. The Journal of Experimental Biology, 2003,206(22):4067-4079.
- [4] Acosta J, Carpio Y, Borroto I, et al. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 119(4):324-331.
- [5] Sawatari E, Seki R, Adachi T, et al. Overexpression of the dominant - negative form of myostatin results in doubling of muscle - fiber number in transgenic medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2010,155(2):183-189.
- [6] Chisada S, Okamoto H, Taniguchi Y, et al. Myostatin - deficient medaka exhibit a double - muscling phenotype with hyperplasia and hypertrophy, which occur sequentially during post - hatch development[J]. Developmental Biology, 2011,359(1):82-94.
- [7] Ochman H, Gerber A S, Hartl D L. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction[J]. Genetics, 1988,120(3):621-623.
- [8] Triglia T, Peterson M G, Kemp D J. A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences[J]. Nucleic Acids Research, 1988,16(16):8186.
- [9] Akiyama K, Watanabe H, Tsukada S, et al. A novel method for constructing gene - targeting vectors[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(16):E77.
- [10] 凌 飞, 李加琪, 梅盈洁, 等. 反向 PCR 技术克隆猪 *H-FABP* 基因 5'侧翼序列[J]. 广东农业科学, 2007(6):75-76.
- [11] Zimmerman A, Lüthy J, Pauli U. Event specific transgene detection in *Bt11* corn by quantitative PCR at the integration site[J]. Lebensmittel - Wissenschaft & Technologie, 2000,33(3):210-216.
- [12] Kumar S, Fladung M. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). II. Molecular characterization of variable expression of transgene in wild and hybrid aspen[J]. Planta, 2001,213:731-740.
- [13] Ledwidge S A, Mallard B A, Gibson J P, et al. Multi - primer target PCR for rapid identification of bovine DRB3 alleles[J]. Animal Genetics, 2001,32(4):219-221.
- [14] Navaneetham D, Penn A S, Howard J F Jr, et al. TCR - V beta usage in the thymus and blood of myasthenia gravis patients[J]. Journal of Autoimmunity, 1998,11(6):621-633.
- [15] Atzori C, Agostoni F, Angeli E, et al. Combined use of blood and oropharyngeal samples for noninvasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia using the polymerase chain reaction[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 1998, 17(4):241-246.
- [16] 杨 洁, 戴 琳, 郭亚兵, 等. 应用多重 PCR 法对广东地区 HBV 进行基因型(A-F)分型[J]. 第一军医大学学报, 2002,22(8):707-709.
- [17] 迪芬巴赫 C W, 德维克斯勒 G S. PCR 技术实验指南[M]. 黄培堂, 俞炜源, 陈添弥, 译. 北京: 科学出版社, 1998:33.
- [18] Helweg - Larsen J, Jensen J S, Benfield T, et al. Diagnostic use of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* in oral wash samples[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1998,36(7):2068-2072.
- [19] Pirae M, Vining L C. Use of degenerate primers and touchdown PCR to amplify a halogenase gene fragment from *Streptomyces venezuelae* ISP5230[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2002,29(1):1-5.
- [20] 李景芬, 刘 莉, 曹 访. PolyI : C 体外诱导草鱼 *PKR* 基因的克隆与表达[J]. 安徽农业科学, 2011,39(33):1943-1945, 1961.
- [21] Komura J, Ikehata H, Hosoi Y, et al. Mapping psoralen cross - links at the nucleotide level in mammalian cells: suppression of cross - linking at transcription factor - or nucleosome - binding sites[J]. Biochemistry, 2001,40(13):4096-4105.
- [22] 王天云, 张贵星, 薛乐勋. 一种简便高效的改良降落 PCR[J]. 中国生物工程杂志, 2003,23(11):80-82.
- [23] 李竹红, 刘德培, 梁植权. 改进的反向 PCR 技术克隆转移基因的旁侧序列[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999,26(6):600-602.