

孙海燕, 罗 兵. 一种大片段 cDNA 克隆的新方法[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 51–52.

一种大片段 cDNA 克隆的新方法

孙海燕, 罗 兵

(常熟理工学院/苏州市水稻育种重点实验室, 江苏常熟 215500)

摘要:介绍了一种新的扩增大片段 cDNA 序列的方法。采用 RT-PCR 和基因组 PCR 相结合的方法, 分段扩增基因的编码区, 然后再通过重叠延伸 PCR 拼接出基因的全长序列。虽然在确定基因表达的前提下, 也可不通过 RT-PCR, 直接利用基因组 PCR 和重叠延伸 PCR 相结合的方法获得靶基因的全长, 但是利用重叠延伸 PCR 克隆大片段 cDNA 原理更简单, 效率更高, 价格更低, 因此具有广泛的应用前景。

关键词:水稻; 大片段 cDNA; 重叠延伸 PCR

中图分类号: S511.2+20.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0051-02

分离和克隆基因是研究基因功能的基础。利用生物信息学方法预测编码基因, 通常是通过 RT-PCR 的方法, 获得基因全长。但是, 某些基因由于片段过长, 在 RT-PCR 过程中, 可能由于 mRNA 二级结构或反转录酶延伸效率的影响, 难以获得 cDNA 全长^[1-3]。在本研究中, 以水稻的 UDP-N-乙酰葡萄糖胺酰基转移酶基因 (*OsLpxA*) 为例, 详细介绍一种新的扩增大片段 cDNA 序列的方法。水稻 *OsLpxA* 基因的 cDNA 总长度为 7 181 bp, 采用 RT-PCR 和基因组 PCR 相结合的方法, 先分段扩增基因的编码区, 然后通过重叠延伸 PCR 将各片段连接起来, 获得基因的全长序列^[4-5]。经试验验证, 利用重叠延伸 PCR 克隆靶基因是一种实用且高效的获得大片段 cDNA 的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 水稻材料 粳稻 (*Oryza sativa* L. Subsp. *japonica*) 品种为日本晴, 由常熟市农业科学研究所提供。取样部位为孕穗期的小穗, 样品保存于 -80 ℃ 冰箱中备用。

1.1.2 质粒、菌株和试剂。大肠杆菌 DH5 α 由常熟理工·端木银熙水稻育种中心保存; 质粒 pCambia1300 由华中农业大学生物质能实验室提供; 反转录酶、cDNA 合成试剂盒和其他分子生物学试剂均购自宝生物工程大连有限公司; 引物由上海生工生物公司合成。引物序列见表 1。

表 1 引物

片段	引物序列(5'→3')
F1 片段	1S: ATGGACCCAAAGAGATCAATAGATG; 1A: CTTGACATAAGGAGTCTCCT
F2 片段	2S: AGATTATTCCTTTTGCCATAATAG; 2A: CTTTATGCTTACAGAAGTCTGCTAG
F3 片段	3S: AAAGAAGCAGCCAAAGCAAACATGAT; 3A: TAGTCTAGA (<i>Xba</i> I) TTACATGCTGTGCTTCACCGTCTCC
F4 片段	1S: ATGGACCCAAAGAGATCAATAGATG; O1A: AGGGAATAATCTCTTGACATAAGG
F5 片段	O2S: CCTTATGTCAGAGATTATTCCT; O2A: GGCTGCTTCTTTTATGCTTAC
F6 片段	O3S: GTAAGCATAAAGAAAGAGCAGCC; 3A: TAGTCTAGA (<i>Xba</i> I) TTACATGCTGTGCTTCACCGTCTCC

1.2 试验方法

1.2.1 水稻 *OsLpxA* 基因的分段克隆 根据网站 <http://rice.plantbiology.msu.edu/> 公布的水稻基因组序列, *OsLpxA* 基因一共由 8 687 个碱基对组成, 包括 7 个外显子和 6 个内含子 (图 1)。按照模板链从 5' 到 3' 的顺序, 7 个外显子的长度分别为 202 bp、140 bp、441 bp、360 bp、179 bp、3 270 bp 和 2 589 bp, cDNA 总长度为 7 181 bp。由于 cDNA 比较大, 不容易通过 RT-PCR 获得全长, 因此采用分段合成的方法, 然后再通过重叠延伸 PCR 获得 *OsLpxA* 基因的全长。分段克隆的

具体方案如下: (1) F1 片段的克隆。 *OsLpxA* 基因的前 5 个外显子都比较小, 总长在 1 322 bp, 我们将这 5 个外显子组成的 cDNA 序列定义为 F1 片段, 由于 F1 片段位于基因的 5' 端, 容易通过 RT-PCR 获得。以 mRNA 为模板, 以 1S 和 1A 为引物, 经 RT-PCR 合成得到 F1 片段。 (2) F2 片段的克隆。第 6 个外显子全长 3 270 bp, 定义为 F2 片段。直接以基因组 DNA 为模板, 以 2S 和 2A 为引物, 通过常规 PCR 扩增, 得到 F2 片段。 (3) F3 片段的克隆。第 7 个外显子全长 2 589 bp, 定义为 F3 片段。以基因组 DNA 为模板, 以 3S 和 3A 为引物, 通过 PCR 扩增, 得到 F3 片段。3 对引物在基因上的具体位置如图 1。

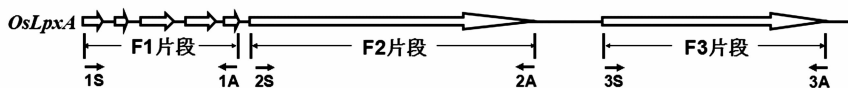
1.2.2 水稻 *OsLpxA* 基因全长的拼接 通过重叠延伸 PCR 将 F1 片段、F2 片段和 F3 片段连接起来。具体方案如下: (1) 设计引物: 3 对引物 1S 和 O1A、O2S 和 O2A、O3S 和 3A 在片段中的具体位置如图 2, 引物 O1A 和 O2S 各包含 F1 片段 3' 端后 12 个碱基和 F2 片段 5' 端前 12 个碱基, 引物 O2A 和 O3S

收稿日期: 2013-11-12

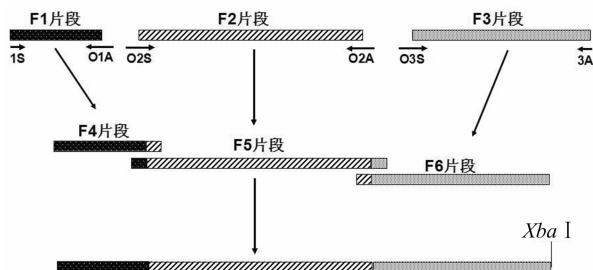
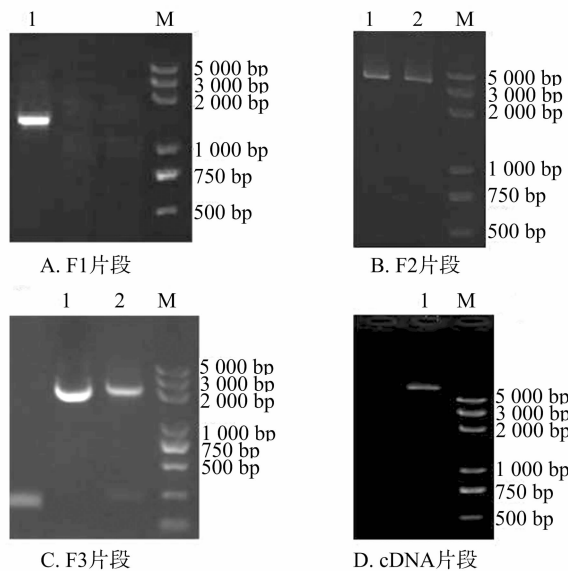
基金项目: 江苏省苏州市科技计划 (编号: SZS201102、SYN201110)。

作者简介: 孙海燕 (1978—), 女, 河北承德人, 博士, 讲师, 研究方向为水稻功能基因组学。E-mail: sunhy@cslg.cn。

通信作者: 罗 兵, 副教授, 研究方向为植物功能基因组学。E-mail: binglou@cslg.cn。

图1 *OsLpxA* 基因的结构及分段克隆引物在基因上的位置

各包含 F2 片段 3' 端后 12 个碱基和 F3 片段 5' 端前 12 个碱基。(2)PCR 扩增:分别以 1S 和 O1A、O2S 和 O2A、O3S 和 3A 为引物,以 F1 片段、F2 片段和 F3 片段为模板,PCR 扩增得到 F4 片段、F5 片段和 F6 片段。由于 F4 片段的 3' 端和 F5 片段的 5' 端、F5 片段的 3' 端和 F6 片段的 5' 端各具有相互重叠的一段序列,可以通过重叠延伸 PCR 拼接出基因全长。以 1S 和 3A 为引物,以 F4、F5 和 F6 片段的混合物为模板,通过重叠延伸 PCR,获得 *OsLpxA* 基因全长(图 2)。

图2 重叠延伸PCR法拼接*OsLpxA* 基因全长的策略

1~2—PCR产物; M—DNA marker

图3 PCR产物的电泳检测

1.2.3 全长 *OsLpxA* 基因的克隆与测序 基因全长的 PCR 产物用 *Xba* I 酶切后,与经 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切的载体相连,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑选阳性克隆测序。

2 结果

2.1 F1 片段的克隆

取液氮保存的水稻幼穗提取总 RNA,以反转录后的 cDNA 为模板,以 1S 和 1A 为引物,PCR 扩增出的 F1 片段长度为 1 322 bp,与预期结果相符(图 3 - A)。

2.2 F2 和 F3 片段的克隆

以水稻基因组 DNA 为模板,分别以 2S 和 2A、3S 和 3A 为引物,通过 PCR 扩增出,获得 F2 和 F3 片段的长度分别为 3 270 bp(图 3 - B)和 2 568 bp(图 3 - C),与预期结果相符。

2.3 水稻 *OsLpxA* 的 cDNA 全长的克隆

分别以 F1、F2 和 F3 片段为模板,以 1S 和 O1A、O2S 和 O2A、O3S 和 3A 为引物,进行 PCR 扩增。然后,将得到的 3 种 PCR 产物混合为模板,以 1S 和 3A 为引物,通过重叠延伸 PCR 扩增出 7 181 bp 的片段(图 3 - D),该片段大小与预期结果相符。通过对获得的长片段进行序列分析,发现有 99.9% 的碱基与已知基因相同,表明该序列为 *OsLpxA* 基因。

3 讨论

对已知碱基序列基因的克隆,通常的做法是将 mRNA 反转录成 cDNA,然后通过常规 PCR 一次性获得基因的全长。作者曾反复试验,利用 1S 和 3A 两个端头引物,以 mRNA 为模板,欲经 RT-PCR 直接获得 *OsLpxA* 基因的全长,但是没有成功。可能的原因有:(1)mRNA 存在复杂二级结构,使反转录受阻。(2)mRNA 模板过长,反转录酶过早从模板上

脱落^[1-3]。

本研究采用 RT-PCR 和基因组 PCR 相结合的方法,分段克隆基因,再通过重叠延伸 PCR,获得基因的全长。这种方法较好地解决了因基因过大难以获得全长的问题,大大提高了大片段 cDNA 克隆的成功效率。此外,在确定基因表达的前提下,也可不通过 RT-PCR,直接利用基因组 PCR 和重叠延伸 PCR 相结合的方法,获得靶基因的全长。

研究表明,利用重叠延伸 PCR 克隆大片段 cDNA,几乎可用于任何已知序列基因的全长 cDNA 克隆。因此,本方法在重组 DNA 领域具有重要的应用价值。

参考文献:

- [1] Fan X, Xu Y, Bisceglie A M. Efficient amplification and cloning of near full-length hepatitis C virus genome from clinical samples[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 346 (4): 1163 - 1172.
- [2] Sahdev S, Saini S, Tiwari P, et al. Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions[J]. Molecular and Cellular Probes, 2007, 21 (4): 303 - 307.
- [3] Spiess A N, Lvell R. A highly efficient method for long-chain cDNA synthesis using trehalose and betaine[J]. Analytical Biochemistry, 2002, 301 (2): 168 - 174.
- [4] Bryksin A V, Matsumura I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids[J]. BioTechniques, 2010, 48 (6): 463 - 465.
- [5] 苏燕, 邵国, 高高单, 等. 一种简便高效利用重叠延伸 PCR 进行基因定点突变的方法[J]. 包头医学院学报, 2007, 23 (6): 559 - 560.