

简并引物的程序化设计与荔枝 HMGR 基因片段的克隆

夏 瑞¹, 陆旺金², 李建国^{1*}, 杜 娟¹

(¹华南农业大学中国荔枝研究中心, 广州 510642; ²广东省果蔬保鲜重点实验室, 广州 510642)

摘 要: 主要介绍了利用 NCBI、DDBJ、Blockmaker、CodeHop 和 Oligo 6.0 等数据库和生物软件进行简并引物设计的方法。利用设计的 6 对简并引物进行 RT-PCR, 从荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 果实中克隆到 2 个长度分别为 510 bp 和 582 bp 的 cDNA 片段。通过 Blastx 检索 Genbank 进行同源性比对后, 发现 2 片段都与其它植物的 HMGR 基因具有较高的氨基酸序列同源性。研究表明, 该程序化设计的简并引物可信性强, 阳性率高, 能迅速得到满意结果。

关键词: 荔枝; 简并引物; 程序化设计; HMGR 基因; 克隆

中图分类号: S667.1 文献标识码: A 文章编号: 1009-9980(2006)05-903-04

Programming design of degenerate primers and the cloning of litchi HMGR gene fragments

XIA Rui¹, LU Wang-jin², LI Jian-guo^{1*}, DU Juan¹

(¹China Litchi Research Center, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642 China; ²Guangdong Provincial Key Lab of Post-harvest Science of Fruits and Vegetables, Guangzhou, Guangdong 510642 China)

Abstract: This paper aims to introduce the method of designing degenerate primers by using some internet databases and biological softwares such as NCBI, DDBJ, Blockmaker, CodeHop and Oligo 6.0. Using the designed 6 pairs of primers to carry out RT-PCR, 2 cDNA fragments with the length of 510 bp and 582 bp respectively were cloned from the litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) young fruit. These 2 fragments were compared in the Genbank by blastx, and the results indicated that the 2 fragments had considerable identities with the HMGR genes of other plants. It is considered that the degenerate primers obtained from this programming design are practicable, and also get satisfied results and high positive rates.

Key Words: Litchi; Degenerate primers; Programming design; HMGR gene; Clone

利用遗传密码的简并性设计简并引物, 是克隆蛋白质家族 cDNA 的常规方法^[1]。简并引物设计的好坏往往决定 RT-PCR 过程是否有结果或结果是否理想。

传统简并引物设计思路是对与目标基因亲缘关系比较近的氨基酸序列进行对比后, 根据其保守序列和密码子的简并性设计出长度在 18~23 bp 的引物序列^[2]。由于传统引物很少考虑到物种的密码子偏爱性, 简并度较高, 同时传统简并引物的 Tm 值一般都比较低, 这样往往导致 RT-PCR 结果不理想, 特异性不够强, 假阳性率也会增加^[1]。另外传统引物的设计重在经验, 初学者往往无从下手。

本文将详细介绍一种新的程序化设计简并引物的方法, 它先对从数据库 (NCBI、DDBJ) 中找到的若干与目标基因亲缘关系较近的氨基酸序列进行

Blockmaker, 再利用 Block 的结果在 CodeHop (Consensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) 数据库中搜索相关引物, 最后利用生物软件 Oligo 6.0 进行引物筛选分析。它所设计的简并引物 (CodeHop 引物) 简并度相对较低, Tm 值较高, 很好地弥补了传统简并引物某些方面的不足, 使得 PCR 效果特异性增强, 比较容易达到实验要求。此法相对于黄菁等^[1]的方法有了较大的改进, 设计过程更为完善和严谨, 使得所设计的引物能更好地满足实验的需要。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要数据库与软件 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、DDBJ Blockmaker (http://blocks.fhrc.org/blocks/make_blocks.html)、CodeHop (http://blocks.org/blocks/make_blocks.html)、CodeHop (http://blocks.org/blocks/make_blocks.html)

收稿日期: 2006-05-24 接受日期: 2006-09-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370995)。

作者简介: 夏瑞, 男, 在读硕士生。Tel: 020-85288265, E-mail: xiawuyi51@tom.com

* 通讯作者。Author for correspondence. Tel: 020-85288265, E-mail: jianli@scau.edu.cn

fhcrc.org/blocks/codehop.html)、Oligo 6.0。

1.1.2 材料 花后 14 d 淮枝荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn. cv. Huai zhi) 的果实。

1.1.3 菌株与质粒 大肠杆菌为 DH5, 质粒为 TaKaRa pMD18- T vector。

1.1.4 酶和试剂盒 Taq 酶、回收试剂盒、反转录酶、连接酶等都为宝生生物工程(大连)有限公司出品。

1.2 方法

1.2.1 简并引物的设计和筛选 设计的主要步骤如下: 1) 查找氨基酸序列。从数据库 NCBI 和 DDBJ 中搜索 HMGR (3- hydroxy- 3- methylglutaryl coenzyme A reductase) 基因的氨基酸序列, 选取具有代表性的 5 个序列: *Malus domestica* HMGR (Genbank 登录号: AAK95406)、*Cucumis melo* HMGR (Genbank 登录号: BAA36291)、*Solanum tuberosum* HMGR1 (Genbank 登录号: P48020)、*Arabidopsis thaliana* HMGR1 (Genbank 登录号: NP_177775)、*Arabidopsis thaliana* HMGR2 (Genbank 登录号: NP_179329)。2) 进行 Block 比对^[3]。登录 Blockmaker, 对上述 5 个序列进行 Block 比对, 得到 14 个高度保守的连续氨基酸区域 (Blocks)。3) CodeHop 引物搜索^[4]。Block 比对后从 Block results 界面登录 CodeHop 数据库, 进行引物搜索, 搜索主要参数设定为: 简并度 (Degeneracy) 64; 退火温度 (Temperature) 为 60.0; 遗传密码 (Genetic code): standard; 密码子选用框 (Codon usage table): *Citrus sinensis*。密码子选用框的备选项如没有目标物种, 则选用与目标物种亲缘关系较近的物种, 如本实验引物设计选用与荔枝亲缘关系相对较近的甜橙 (*Citrus sinensis*)。4) 筛选合适的上下游引物。在搜索得到的引物中根据实验的要求挑选合适的引物, 大致原则: 上下游引物之间的 Tm 值和简并度不能相差太大; 简并度最好控制在 64 以下; 上

下游引物的位置不能相差太远, 最好能保证片段长度在 1000 bp 以下。因为简并度的控制有利于提高 RT- PCR 的特异性, 而 1000 bp 以下的片段有利于后续的一系列实验。5) 利用 Oligo 6.0 进行引物分析。分析的主要内容: 上下游引物内部与之间是否会形成引物二聚体, 一般不能有 5 个以上的连续碱基互补; 以某一个 HMGR 基因的碱基序列 (亲缘关系较近的已知基因) 为模板模拟 PCR 反应, 得到相应的 Tm 值 (Tm)。

1.2.2 RT- PCR 扩增荔枝 HMGR 基因 提取荔枝果实的 RNA, 方法参照陆旺金等^[5]方法。然后以 Oligo T 为引物反转录成 cDNA, 再以设计好的引物进行 RT- PCR 扩增。PCR 程序为: 94 变性 3 min; 然后 94 30 s, 50-60 30 s, 72 2 min; 循环数为 40, 最后 72 延伸 10 min。PCR 仪为 MJ RESEARCH PTC- 200 微循环器。

1.2.3 RT- PCR 产物的检测、克隆与测序 1%琼脂糖电泳检测 RT- PCR 结果, 利用 TaKaRa 的 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver 2.0 试剂盒回收电泳得到的片段, 回收片段与 pMD 18- T Vector 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5, 克隆过程参照 TaKaRa pMD18- T Vector 试剂盒说明书。经质粒提取, 酶切鉴定后, 获得阳性克隆送交英骏生物技术有限公司 (广州) 测序。

1.2.4 PCR 产物的分析 测序后得到的片段序列登录 NCBI 进行 Blast 验证和检索 Genbank 进行同源性比对。

2 结果与分析

2.1 简并引物设计结果

经过筛选得到 6 个上游引物和 6 个下游引物 (表 1), 通过 Oligo 分析得到 6 对引物对 (表 2)。

表 1 上下游引物序列

Table 1 Sequences of the sense and anti- sense primers

引物编号 Primer No.	序列 Sequence	退火温度 (Tm) Melting temperature	简并度 Degeneracy
UP1	5 - GCTCTGCCTCTGCCTCTGtattynacnaa- 3	63.44	64
UP2	5 - CTCTCTTTTATTTATCTGCTGGGCitykygnatc- 3	62.07	32
UP3	5 - TGATTATGAGTCTATTCTGGGTCAATGytgyaratgc- 3	64.25	8
UP4	5 - GGTACGAGTATTTGGGTTCCtatggcnacnac- 3	65.89	16
UP5	5 - GATTGAGGGTAGAGGTAAGTCTGTTgntgygargc- 3	66.63	16
UP6	5 - GCTCTACTGGTGATGCTATGGGnatgaayatgg- 3	65.80	8
DW1	5 - TGAACATAACCAACAGGCATCtcrcaaytg- 3	63.33	8
DW2	5 - AACAGGCAACCCCTCAGTAgtingcatngg- 3	67.50	16
DW3	5 - CCCTTAGAAACCATATTCATAcccatngcrtc- 3	63.33	8
DW4	5 - CGCAAACAACAGACTTACCTCTAccyodlatoc- 3	65.78	6
DW5	5 - CAGAACCAAGTCAGATTCTTCAGCrtritnarytc- 3	62.06	64
DW6	5 - GAACTCTCAACATTTTTGTGCAggttcygncc- 3	64.61	16

注: Tm 为引物合成单上数据; UP 代表上游引物, DW 代表下游引物。

Note: Tm data come from the synthetic papers of primers. UP stands for the sense primer, and DW the anti- sense primer.

表 2 上下游引物组合

Table 2 Combinations of the sense and anti-sense primers

引物对编号 Number of the primer pair	组合 Combination	Tm Melting temperature	预测片段长度 Estimated length of the fragment
A	UP2+DW1	59.0	435
B	UP2+DW2	58.0	522
C	UP4+DW4	54.1	414
D	UP6+DW6	54.0	159
E	UP4+DW5	54.3	615
F	UP2+DW3	57.3	822

注: Tm 为利用 Oligo 6.0 模拟 RT-PCR 反应所得数据。

Note: Tm data come from the simulative PCR results with Oligo 6.0.

2.2 RT-PCR 电泳结果

利用表 2 中 6 对引物进行 RT-PCR, 结果每对引物都扩增出特异的条带, 片段大小与预测结果大小(表 2) 基本一致。由琼脂糖电泳检测结果可见, 这种引物的特异性较好, 基本没有非特异条带(图 1)。

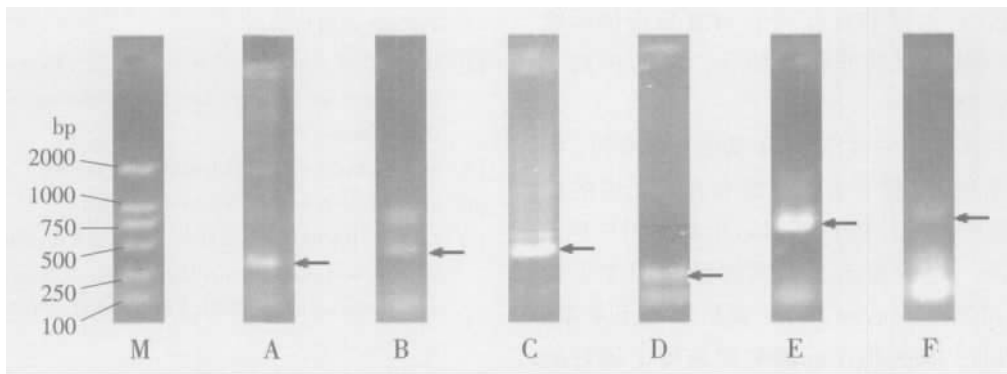


图 1 琼脂糖电泳检测结果

注: 箭头所指条带即为目的条带, 最下面的一条带为引物二聚体。

Fig. 1 The result of agar gel electrophoresis

Note: The arrows point out the position of the intentional bands, the lowest band is the position of the dimers.

表 3 片段 B 经 Blastx 后的同源性结果

Table 3 The homologous comparison of the fragment B in Blastx

Genbank 登录号 Accession number	比对基因 Compared gene	分值 Score(bits)	期望值 E value	同源性 Identities
AA Y68034	<i>Tilia miqueliana</i> HMG	240	1e-62	126/177(71%)
AA L03986	<i>Malus domestica</i> HMG	235	5e-61	124/188(65%)
AA K64657	<i>Malus domestica</i> HMG	233	3e-60	123/188(65%)
AA C05088	<i>Gossypium hirsutum</i> HMG1	232	5e-60	118/175(67%)
AA K95406	<i>Malus domestica</i> HMG	229	3e-59	122/188(64%)

表 4 片段 E 经 Blastx 后的同源性结果

Table 4 The homologous comparison of the E fragment in Blastx

Genbank 登录号 Accession number	比对基因 Compared gene	分值 Score(bits)	期望值 E value	同源性 Identities
BAA36291	<i>Cucumis melo</i> HMG	321	1e-86	172/194(88%)
AAB69726	<i>Camptotheca acuminata</i> HMG	318	6e-86	173/194(89%)
AAC05089	<i>Gossypium hirsutum</i> HMG2	316	3e-85	171/194(88%)
ABC74565	<i>Picrohiza kurrooa</i> HMG	315	7e-85	169/194(87%)
AAQ63055	<i>Hevea brasiliensis</i> HMG	313	3e-84	174/194(89%)

2.3 PCR 结果序列分析

考虑引物的位置和片段长度等因素, 实验选取 B、E 经过回收和载体克隆后测序, 得到 2 个长度分别为 510、582 bp 的片段(分别称为片段 B 和片段 E)。测序后的片段通过 Blastx 检索 Genbank 进行同源性比对。如表 3、4 所示, 片段 B 与南京椴(*Tilia miqueliana*) 的 HMG 的序列同源性达到 71%, 比对分值达 240; 片段 E 与甜瓜(*Cucumis melo*) 的 HMG 的同源性达 88%, 比对分值达 321。其中片段 E 与其它植物的 HMGR 基因的序列同源性也都在 85% 以上, 片段 B 与其它基因的序列同源性则较低。这是由于 B 片段的位置靠近 HMGR 的上游(N 端), E 片段位于 HMGR 基因的下游(C 端), 而在各种植物的 HMGR 基因中作为催化域的 C 端相对 N 端更为保守^[9]。通过 Blastx 可以充分说明这 2 个片段都为荔枝 HMGR 基因家族的表达序列。

3 讨 论

与传统简并引物相比, CodeHop 引物具有不一样的结构, 它由两部分组成, 引物 3 端为根据 3-4 个非常保守的氨基酸设计而成的核心简并区 (3-degenerate core), 它必须从一个不变的核苷酸位置开始, 长度大致为 11-12 个氨基酸, 在另一个密码子的边缘结束, 最大简并度为 128^[1,7]; 5 端为非简并夹板结构 (5-non-degenerate consensus clamp), 5 端夹板结构是根据密码子偏爱性设计的一致性序列, 它最大程度地预测了保守氨基酸的编码序列^[1,8]。非简并区的长度取决于所需的退火温度, 一般为 18~30 个碱基。表 1 中引物的大写字母区域为非简并夹板结构, 小写字母区域为核心简并区。3 端核心简并区与目标模板的互补引发退火与延伸, 进而成功地进行扩增反应。5 端夹板结构与目标模板部分互补, 从而起到稳定引物与模板的退火的作用, 同时由于其序列的一致性, 这样非常有利于 PCR 反应的后续循环, 降低后续反应的非特异结合, 从而提高了 PCR 扩增的效率^[8]。

通过序列比对, 发现 HMGR 基因比较保守, 特别是 C 端非常保守, 利于引物位置和片段长度的控制。实验过程中发现, 用 CodeHop 引物做 RT-PCR 时对 Taq 酶有一定的要求, 本实验最初用宝生物 (TaKaRa) 公司出品的 rTaq 酶, 一直扩增不出条带。当换用该公司出品的 Ex Taq 酶时则获得了较好的扩增效果, 所以认为, 在用 CodeHop 引物进行扩增时, 宜采用一些扩增效率高、错配率低的高质量 Taq 酶。另外由于该类引物长度 (28-40 bp) 一般大于传统简并引物 (18-23), 较易产生引物二聚体, 所以如实验条件允许, 进行 RT-PCR 扩增时宜采用热启动来减少引物二聚体产生的量。同时, 在 CodeHop 引物的设计过程中, 引物搜索后得到的结果中往往会出现大量的引物序列, 这时合适的筛选方法和筛选工具尤为重要。本方法首先根据目标引物位置和片

段长度对上下游引物进行初次筛选, 接着利用生物软件 Oligo 6.0 对初次筛选结果进行分析, 并进一步精确计算出筛选后的引物对的退火温度, 这样就能够得到最优化的引物对, 从而使得实验的成功更有保证。

CodeHop 引物碱基数较多, 保证了较高的 Tm 值; 5 端非简并夹板结构序列一致, 减少了扩增过程中引物与模板错配的机会; 3 端核心简并区长度较小, 降低了引物的简并度, 进而大大降低了 PCR 产物的非特异性。这样的设计更符合我们的实验需要, 同时其程序设计使得设计过程更加规范化, 易于操作, 初学者也能很快上手, 所以 CodeHop 引物具有很好的应用前景。

参考文献 References:

- [1] HUANG J, WANG S L, QIAO C L (黄菁, 王少丽, 乔传令). Automated programming of degenerate primers and the cloning of the diamondback esterase gene[J]. Entomological Knowledge, 2002, 39(6): 458-461. (in Chinese)
- [2] ZHANG X Y, GAO Y N (张新宇, 高燕宁). To design PCR primers with Oligo 6 and Primer Premier 5[J]. Bioinformatics, 2004(2): 15-18. (in Chinese)
- [3] http://blocks.fhrc.org/blocks/make_blocks.html.
- [4] <http://blocks.fhrc.org/blocks/codehop.html>.
- [5] LU W J, JIANG Y M (陆旺金, 蒋跃明). Cloning and sequence analysis of expansin genes in Litchi chinensis Sonn. fruits[J]. Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学), 2003, 36(12): 1525-1529. (in Chinese)
- [6] CAMPOS N, BORONAT A. Targeting and topology in the membrane of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase[J]. Plant Cell, 1995, 7(12): 2163-2174.
- [7] TIMOTHY M R, EMILY R S, JORJA G H, et al. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences[J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26(7): 1628-1635.
- [8] TIMOTHY M R, JORJA G H, STEVEN H. CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3763-3766.