

一种改良的扩增 cDNA 5' 末端的方法

夏瑞^{1,3}, 陆旺金², 李建国^{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 ³广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640)

摘要: 介绍一种改良的扩增基因 5' cDNA 序列的方法 (改良 TdT 加尾扩增法)。以龙眼为材料, 采用 TdT (末端脱氧核苷酸转移酶) 加尾、锚定 PCR、巢式 PCR、降落 PCR 等多种策略。通过与常规方法 (用 TaKaRa 试剂盒) 对比试验, 发现该方法原理简单, 操作性强; 扩增特异性高, 结果真实可靠; 同时还具有快速低廉的特点, 适合在一般实验室中推广使用。

关键词: TdT, RACE, 降落 PCR, DLEXPI

中图分类号: Q 943.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2008) 10-1533-06

A Modified Method of Amplifying the 5'-end cDNA Sequence

XIA Rui³, LU Wang-jin², and LI Jian-guo^{1*}

(¹ China荔枝 Research Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China, ² Guangdong Provincial Key Laboratory of Post-harvest Science of Fruits and Vegetables, Guangzhou 510642, China, ³ Institute of Fruit Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to obtain the full length sequence of genes more efficiently, a modified method of amplifying the 5' cDNA sequence, named as modified TdT tailing amplified method, was designed. Many strategies were used in this method including TdT tailing, anchored PCR, nested PCR, touchdown PCR. Compared with a regular method using a kit (5'-Full RACE Core Set, TaKaRa), the modified method had many advantages, such as simple principle, easy operability, high amplified specificity, and reliable results. Moreover, it costs less money and time. Therefore, it is worth popularizing in ordinary laboratories.

Key words: TdT, RACE, touchdown PCR, DLEXPI

分离和克隆基因是研究基因结构、功能以及表达的基础。利用生物信息学技术推测的编码基因, 或通过酵母双杂交 (yeast two-hybrid)、抑制性消减杂交 (SSH)、基因芯片 (chip) 技术和噬菌体表面展示 (phage display) 等分子生物学技术筛选得到的序列一般都是部分序列, 要想进一步研究这些新基因的生物学功能和医学意义, 必须首先获得基因的全长序列 (韩海勃和曹建平, 2005)。虽然很多用于扩增基因全长的方法已经建立, 如反向 PCR、连接介导 PCR 等技术, 但是, 这些方法耗时长、费用高, 且常出现 PCR 扩增效率低、特异性差等问题。因而利用这些方法不容易得到完整的全长基因, 尤其是基因的 5' 末端 (唐慧等, 2001)。而 Frohman 在 1985 年首次报道的 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 解决了这些问题。cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术基于 PCR 技术, 以已知的部分 cDNA 序列来获得完整 cDNA 序列 (钟涛和吴瑞英, 2002), 是一种从低丰度转录本中快速扩增 cDNA 3' 和 5' 末端序列的简单而有效的方法。

本文将详细报道一种改良的扩增 cDNA 5' 末端的方法, 简称为改良 TdT 加尾扩增法。本方法中采

收稿日期: 2008-05-29 修回日期: 2008-09-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370995)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: jianli@scau.edu.cn)

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

用 TdI (末端脱氧核苷酸转移酶) 加尾、锚定 PCR 巢式 PCR 降落 PCR (Don et al, 1991; 王天云等, 2003; Wu et al, 2005) 等策略, 从锚定引物与巢式引物的设计到 PCR 扩增体系和方法的优化都非常新颖。经试验证明, 该方法是一种实用且高效的扩增 cDNA 5' 末端序列的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为 ‘石硤’ 龙眼 (Dimocarpus longan Lour ‘Shijia’) 花后 6 周的果实。

大肠杆菌为 DH5 α , 质粒为 pMD18-T vector, 均为宝生物工程 (大连) 有限公司产品。

5'-Full RACE Core Set 试剂盒、Taq DNA 聚合酶、回收试剂盒、反转录酶、cDNA 合成试剂盒、末端脱氧核苷酸转移酶 (TdI)、反应缓冲液和其他分子生物学试剂均购自广州瑞真生物有限公司。引物由上海英骏生物技术有限公司 (广州) 合成。

1.2 方法

1.2.1 改良 TdI 加尾扩增法

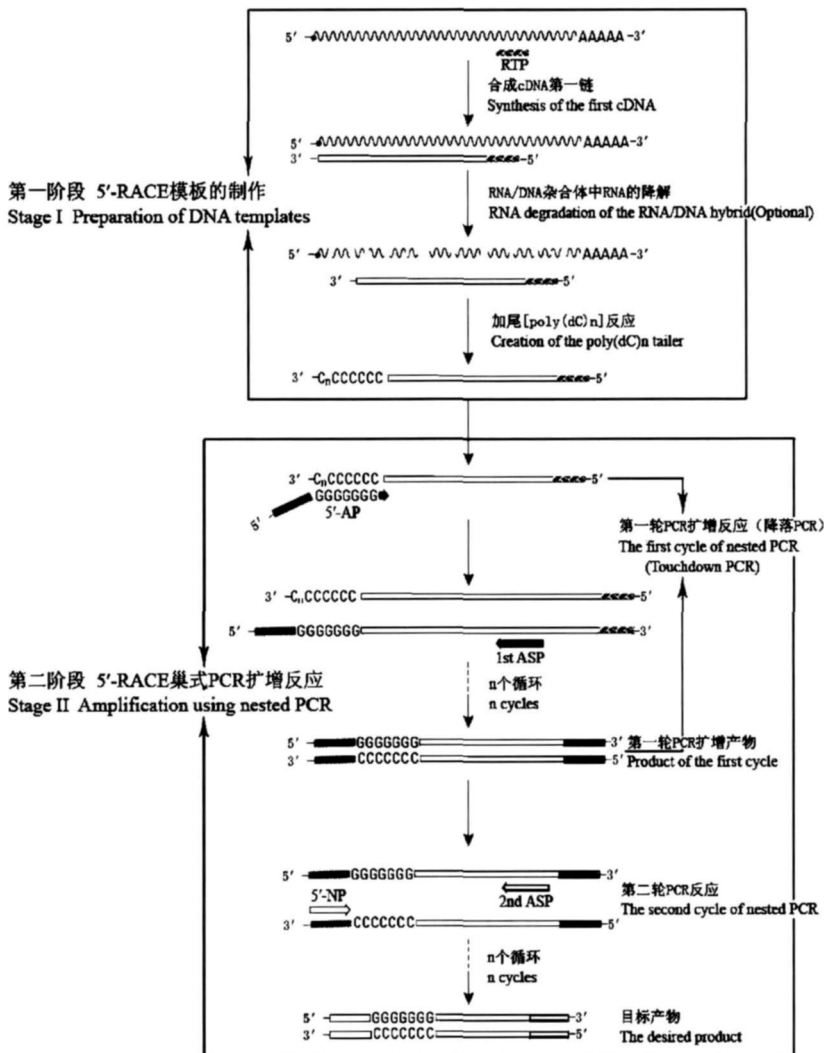


图 1 改良 TdI 加尾扩增法原理图

Fig. 1 The Principle of the modified TdI tailing amplified method

引物设计: 根据 DLE α 1 (Expansion Gene of *Dinocarpus longan*) 已知基因片段 (谢会, 2005), 利用生物软件 Primer Premier 5.0 设计 3 个引物、1 个反转录引物 (RT-Reverse Transcript Primer) 和两个特异的下游引物 (ASP-Anti-Sense Primer)。其序列分别为: Ex α 1-RT: 5'-CACGCTCACCTTAC3'; Ex α 1-1stASP: 5'-GCGATAACTGACTGGGACAA-3'; Ex α 1-2nd-ASP: 5'-AGTGAGTGGAGGAGGGTTG-3'。

据实验原理 (图 1), 还需 5'锚定引物 (5'-AP: 5'-Adaptor Primer) 和 5'巢式引物 (5'-NP: 5'-Nested Primer) 各 1 个。其序列分别为: 5'-AP: AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGGGGG 和 5'-NP: AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT。

cDNA 第一链的合成与纯化: 以龙眼果皮总 RNA [RNA 提取参考陆旺金和蒋跃明 (2003) 的方法] 为模板, 用反转录引物 Ex α 1-RT 合成 cDNA 第一链。具体参照 PrimeScriptTM Reverse Transcriptase 的使用说明书。用 TaKaRa DNA 片段纯化试剂盒 (TaKaRa DNA Fragment Purification Kit Ver 2.0) 进行 cDNA 回收纯化。

加尾 [poly(dC)] 反应: 纯化后的 25 μ L cDNA 与 5 \times TdT Buffer (10 μ L)、0.1% BSA (5 μ L)、10 mmol L⁻¹ dCTP (2.5 μ L)、TdT (15 U) 和 ddH₂O (up to 50 μ L) 冰上混合均匀, 置于恒温槽中 37 $^{\circ}$ C 反应 60 min。然后按照 TdT 使用说明书, 采用乙醇沉淀法纯化加尾后的 cDNA, 真空抽干后溶于 20 μ L 的无菌水中。

PCR 扩增: 采用巢式 PCR 策略, 需经两轮 PCR 扩增。第一轮以加尾后的 cDNA 为模板, 以 5'-AP 和 Ex α 1-1stASP 为上下游引物。采用降落 PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s; 66~46 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min (从 66 $^{\circ}$ C 到 46 $^{\circ}$ C 每次降 2 $^{\circ}$ C, 其中 46 $^{\circ}$ C 前, 每个温度两个循环, 最后 46 $^{\circ}$ C 15 个循环), 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min; 最后 4 $^{\circ}$ C 保存。第二轮以第一轮 PCR 扩增所得的 PCR 产物为模板 (可适当稀释, 一般为 10~100 倍), 以 5'-NP 和 Ex α 1-2nd-ASP 为上下游引物。PCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s; 50 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min; 最后 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 仪为 MJ RESEARCH PTC-200 微循环器。

PCR 产物的检测、克隆与测序: 1% 的琼脂糖电泳检测 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 pMD18-T Vector 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 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, 并由上海英骏生物技术有限公司 (广州) 测序。测序后得到的片段序列登录 NCB 进行 Blast 验证和检索, GenBank 进行同源性比对。

1.2.2 TaKaRa 法

TaKaRa 法中共需 5 个特异引物, 反转录引物 5'端需磷酸化。其序列如下:

Ex α 1-PR1: 5'-(P) ACTGGGACAATACC3'; Ex α 1-S1: 5'-GTCACGGCAACCAACTTCTG-3'; Ex α 1-A1: 5'-GIGTTCACCTCATACCCTIG-3'; Ex α 1-S2: 5'-AACTTCGCTCAACCTICAGA-3'; Ex α 1-A2: 5'-CAAGCACCACCCATIGTTC-3'。

用 Ex α 1-PR1 反转录后进行 PCR 扩增。采用巢式 PCR 过程, 第一轮 PCR 扩增以 Ex α 1-S1 和 Ex α 1-A1 为引物, PCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s; 50 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min; 最后 4 $^{\circ}$ C 保存。以第一轮 PCR 液 (适当稀释) 为模板, Ex α 1-S2 和 Ex α 1-A2 为引物进第二轮 PCR 扩增, 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s; 52 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min; 最后 4 $^{\circ}$ C 保存。后续的片段检测和克隆测序过程同 TdT 加尾扩增法。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增检测结果

改良 TdT 加尾扩增法中以加了多聚 dC 尾巴的 cDNA 为模板, 经过两轮 PCR 扩增得到 DLE α 1 基

因的 5 端序列。用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 在目标位置 (500 bp左右) 出现了单一的条带 (图 2 A)。

同样, 用 TaKaRa法进行 PCR扩增和琼脂糖电泳检测, 在 350 bp位置出现了特异条带 (图 2 B)。

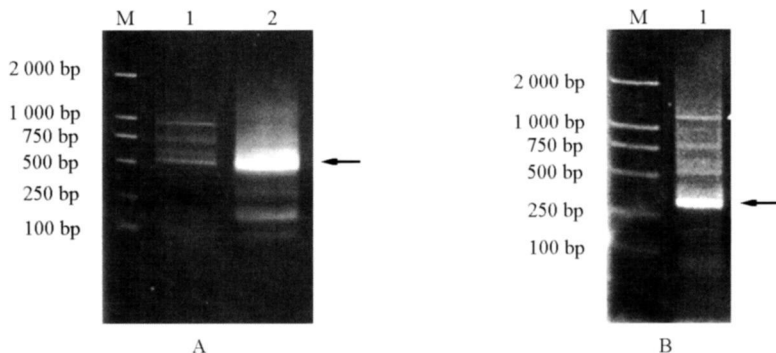


图 2 改良 TdT加尾扩增法 (A) 和 TaKaRa法 (B) PCR产物琼脂糖电泳图

1 第一轮 PCR产物; 2 第二轮 PCR产物; M Marker; 箭头所指条带即为目的条带。

Fig. 2 The PCR products's agarose gel electrophoresis of the modified TdT tailing amplified (A) and TaKaRa (B) methods. M: DNA marker; 1 and 2 are the PCR products of the first and second PCR cycles respectively. The arrows are the aimed bands.

2.2 5'末端序列

改良 TdT加尾扩增法中得到了长度为 508 bp的片段 (图 3), 其中未知的 5'端 DNA序列长 273 bp (图中加框部分); TaKaRa方法中得到了长度为 345 bp的片段 (图 4), 其中未知序列也为 273 bp (图中加框部分)。

```

1  AAGCAGTGGT ATCAACGCAG AGTACGCGGG GGGGGGGGGG GGGAACTCTC AAACACTGCA
61  GTCTCCATTC ACACAACAAA TCAAACACT CCCTCTCCCT CTCTCAAACG AGATTGACAA
121 ATGGCTGTCT TCAATGTGCT CTGTTTCTT TCTCTACTCT TCCTAACAGC CAATGCTAAG
181 ATTCGGGTG TTTACACCGG TAGTCCATGG GAAAGCGCTC ACGCCACCTT CTACGGCGGG
241 AGTGACGCC TCGGAACAAT GGTGGTGCT TGTGGGTACG GGAACCTGTA CAGCCAAGGG
301 TATGGAGTGA ACACGGCGGC GCTGAGCACT GCTCTGTTC AAGAGTGGCT TAGCTGTGGG
361 GCGTGCTTTG AGCTAAAGTG CGTGCTGAC CCAAGGTGGT GTCTGCCTGG AAACCCGTCC
421 ATCTGGTCA CGGCAACCAA CTCTGCCCA CCGAACTTCG CTCAACCTTC AGATAACGGC
481 GGCTGGTGCA ACCCTCCTCG CACTCACT

```

图 3 改良 TdT 加尾扩增法获得的 cDNA 片段序列

带下划线的为引物位置, 方框部分则为未知的 5'端 cDNA 序列。

Fig. 3 The cDNA sequence of the amplified fragment with the modified TdT tailing amplified method

The underlined sequences and the one with a frame are the primers and the unknown 5' sequence respectively.

```

1  AACTTCGCTC AACCTTCAAG TAACGGCGGC TGGTGCAACC CTCCTCGCAC TCACTTCGAC
61  CTCGCAATGC CCATGTTCTT CGCGATCGCT CAGTACCGCG CTGGTATTGT CCCAGTAACT
121 CTCAAACACT GCAGTCTCCA TTCACACAAC AAATCAAAC ACTCCCTCTC CCTCTCTCAA
181 ACGAGATTGA CAAATGGCTG TCTTCAATGT GCTCTGTTTT CTTTCTCTAC TCTTCTAAC
241 AGCCAATGCT AAGATTCCGG GTGTTTACAC CGGTAGTCCA TGGGAAAGCG GGCATGCGAC
301 CTTTTATGGC GGCAGTGACG CCTCTGGAAC AATGGGTGGT GCTTG

```

图 4 TaKaRa 法获得的 cDNA 片段序列

带下划线的为引物位置, 方框部分则为未知的 5'端 cDNA 序列。

Fig. 4 The cDNA sequence of the amplified fragment with the TaKaRa method

2.3 两序列的比对分析结果

用 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>) 对比两种方法扩增得到的序列结果 (两片段中未知的 5' cDNA 序列), 发现两个序列的长度和序列信息完全一样 (图 5)。这充分说明经过改良的 TdT 加尾扩增法设计合理, 扩增结果真实可靠。

```

TdT      AACTCTCAAACACTGCAGTCTCCATTACACACAACAAATCAAACACTCCCTCTCCCTCTC 60
TaKaRa   AACTCTCAAACACTGCAGTCTCCATTACACACAACAAATCAAACACTCCCTCTCCCTCTC 60
          *****
TdT      TCAAACGAGATTGACAAATGGCTGTCTTCAATGTGCTCTGTTTTCTTTCTTCTACTCTTCC 120
TaKaRa   TCAAACGAGATTGACAAATGGCTGTCTTCAATGTGCTCTGTTTTCTTTCTTCTACTCTTCC 120
          *****
TdT      TAACAGCCAATGCTAAGATTCCGGGTGTTTACACCGGTAGTCCATGGGAAAGC 173
TaKaRa   TAACAGCCAATGCTAAGATTCCGGGTGTTTACACCGGTAGTCCATGGGAAAGC 173
          *****

```

图 5 两未知序列比对结果

TdT为改良 TdT加尾扩增法。

Fig 5 The alignment result of the two unknown sequences

TdT stands for the modified TdT tailing amplified method

3 讨论

目前, 5'-RACE技术应用已经十分普遍, 包括基于“模板跳转反转录”的 SMART RACE技术 (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) (Chenick et al, 1995), 基于 5 脱帽和 RNA 酶连接技术的 RLM-RACE 技术 (RNA ligase mediated RACE) (Liu & Gorovskiy, 1993), 利用 RNA 连接酶为 cDNA 第一链接上寡聚核苷酸接头的 SLIC RACE 技术 (single strand ligation to single stranded cDNA) (Edwards et al, 1991), 以及以内部环化的 cDNA 第一链为模板进行扩增的自连接或环化 RACE 技术 (self ligation RACE or circular RACE) (Manuyama et al, 1995) 和通过末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT) 加尾后引入锚定引物的锚定 RACE 技术 (anchored RACE)。其中本试验中用到的 Takara 法属于自连接 (环化) RACE 法, 改良的 TdT 加尾扩增法则属于锚定 RACE 法。这些方法各有利弊, SMART RACE 技术虽然操作简便, 成功率高, 但其价格昂贵 (一次试验成本将近千元); RLM-RACE 技术操作复杂, 且都是针对 mRNA 分子, 由于 mRNA 分子被降解的风险极大而导致成功率不高; SLIC RACE 中由于 RNA 连接酶优先连接短片段 cDNA, 影响扩增效果, 且 RNA 连接酶连接效率低 (韩海勃和曹建平, 2005)。后两种方法虽然成功率比较低, 但是由于其成本低, 实验条件要求低, 能满足克隆一般基因 5' 序列的要求, 从而得到许多实验室的青睐。

本试验通过对 TdT 加尾扩增法的优化改良, 成功率和稳定性都得到较大的提高。改良的 TdT 末端加尾扩增法综合了多项 PCR 扩增方法如锚定 PCR、巢式 PCR、降落 PCR 等, 原理简单易懂, 操作性强。对比其它常规 5'-RACE 的方法, 本方法有以下几点优势:

1. 引物设计方案合理。首先, 本法中用 1 个 15 bp 左右的特异反转录引物代替通用反转录引物 Oligo(dI)_n, 既可以对模板 cDNA 进行初步筛选, 又可以使合成的 cDNA 更靠近目的基因的 5' 端, 片段较短。这样, 只要使用一般的反转录酶 (如本试验中选用的 Takara 出品的 PrimeScript™ Reverse Transcriptase) 就可以达到实验要求; 但是, 使用 Oligo(dI)_n 则须反转录整个目的基因的全长, 这样, 对于一些序列较长的基因, 一般的反转录酶很难达到要求。其次, 两个上游引物采取巢式策略取代一般的 poly(dG)₁₂ 或 poly(dC)₁₂ (唐慧等, 2001), 可以更好控制第二轮 PCR 的退火温度, 保证扩增的特异性。另外, poly(dG)₁₂ 的 Tm 值往往比较高, 导致上下游引物间退火温度相差太大, 往往会降低扩增的效率, 导致非特异条带的出现。相比 Takara 法, 本法扩增 1 个基因只需设计 3 个特异

引物, 而且反转录引物不需要磷酸化, 从而大大节约实验成本。

2 PCR扩增方法优化。采用巢式 PCR 提高了微量模板 DNA的扩增效率, 经过两次特异 PCR 筛选, 增加了扩增产物的特异性, 扩增结果基本都是单一的条带。另外, 在本方法的巢式 PCR过程中, 第一轮 PCR采用改良的降落 PCR 可以很好解决第一轮 PCR中上下游引物间退火温度差别太大的问题。本方法中一般采用的退火温度范围为 66~46 °C, 由于高温下引物的错配率低, 使用降落 PCR可以通过高温阶段的循环, 不仅减少了非特异扩增的产生, 而且使目标模板 DNA得到富集 (Don et al, 1991), 从而提高了第二轮 PCR扩增出目的片段的概率。

3 快速且低廉。利用该方法花费小, 一次试验只须几十元, 同时所需时间少, 所有步骤可以在 1 h内完成。而常用的 5' -RACE试剂盒动辄几千, 且不能很好保证成功率, 同时时间也比较长, TaKaRa法则需 2 d

总之, 改良后的 TdI加尾扩增法不但能满足克隆一般基因 5'末端序列的要求, 而且由于降落 PCR和巢式 PCR对转录本的有效放大作用, 还能用于克隆生物体中低丰度的基因。因此, 该方法实用性强、应用面广、成本低、耗时少, 具有广阔的应用前景, 值得在普通实验室推广使用。

References

- Chenick A, Moqadam F, Siebert P. 1995. Marathon DNA amplification: A new method for cloning full-length DNAs. *Clonetechniques* (1): 5
- Don R H, Cox P T, Wainwright B J, Baker K, Mattick J S. 1991. "Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification". *Nucleic Acids Res* 19 (14): 4008
- Edwards J B, Dejon J, Mallet J. 1991. Oligodeoxynucleotide ligation to single-stranded cDNAs: A new tool for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by in vitro amplification. *Nucleic Acids Res* 19 (19): 5227-5232
- Han Hai bo, Cao Jian ping. 2005. The race technology and its application in the cloning of full-length DNA in parasites. *Foreign Med Sci Parasit Dis* 32 (1): 14-18 (in Chinese)
- 韩海勃, 曹建平. 2005. RACE技术及其在寄生虫全长 DNA克隆中的应用. *国外医学寄生虫病分册*, 32 (1): 14-18
- Li X W, Gorovskiy M A. 1993. Mapping the 5' and 3' ends of Tetrahymena thermophila mRNAs using RNA ligase mediated amplification of cDNA ends (RLM-RACE). *Nucleic Acids Res* 21: 4954-4960
- Lu Wang jin, Jing Yue ming. 2003. Cloning and sequence analysis of expansin genes in Litchi chinensis Sonn. fruits. *Scientia Agricultura Sinica* 36 (12): 1525-1529 (in Chinese)
- 陆旺金, 蒋跃明. 2003. 荔枝果实两个膨大素基因的克隆与序列分析. *中国农业科学*, 36 (12): 1525-1529
- Mauyama N, Rakow T L, Mauyama H J. 1995. RACE: A simple method for identification of the 5' end of mRNAs. *Nucleic Acids Res* 23 (18): 3796-3797
- Tang Hui, Chen Shan na, Yan Bo, Ma Zhi gang, Huang Xin qi. 2001. A method of cloning the 5'-end of DNA. *Journal of Yunnan University* 23 (3): 238-340 (in Chinese)
- 唐 慧, 陈善娜, 鄢 波, 马志刚, 黄兴奇. 2001. 一种 DNA 5'末端的克隆方法. *云南大学学报*, 23 (3): 238-240
- Wang Tian yun, Zhang Gui xing, Xue Le xun. 2003. A simple and efficient modified touchdown PCR. *China Biotechnology* 23 (11): 80-82 (in Chinese)
- 王天云, 张贵星, 薛乐勋. 2003. 一种简便高效的改良降落 PCR. *中国生物工程杂志*, 23 (11): 80-82
- Wu Wei ming, Tsai Hsiang ju, Jong Hwei S Pang, Hsin-Shin Wang, Hong Shang Hong, Yun-Shien Lee. 2005. Touchdown thermocycling program enables a robust single nucleotide polymorphism typing method based on allele-specific real time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 339: 290-296
- Xie Hui. 2005. Molecular cloning and expression analysis of expansin genes in litchi fruit [M]. D. dissertation, Guangzhou: South China Agricultural University (in Chinese)
- 谢 会. 2005. 龙眼果实 Expansin基因的克隆及其表达分析 [硕士论文]. 广州: 华南农业大学.
- Zhong Tao, Wu Rui ying. 2002. New progresses in rapid amplifying technology of DNA templates. *Foreign Med Sci Mol Biol Dis* 24 (1): 7-11 (in Chinese)
- 钟 涛, 吴瑞英. 2002. DNA末端快速扩增技术新进展. *国外医学分子生物学分册*, 24 (1): 7-11