

# 利用降落 PCR 扩增 KS 基因

刘炳辉<sup>1,2</sup>, 曹远银<sup>1</sup>, 程浩<sup>1,2</sup>, 闫建芳<sup>2</sup>, 齐小辉<sup>2</sup>, 刘秋<sup>2\*</sup>

(1. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 大连民族学院 生命科学学院, 辽宁 大连 116600)

**摘要:** 通过优化 SDS 法提取链霉菌(*Streptomyces spiramyceticus*)和 2 株由生物技术与资源利用国家民委——教育部重点实验室分离获得的放线菌 D8 和 D18 基因组 DNA, 同时应用降落 PCR 和普通 PCR 扩增酮基合酶基因(ketosynthase, KS)。结果表明, 扩增出的特异性条带与目的基因片段长度一致, 降落 PCR 法较普通 PCR 法扩增 KS 基因特异性更高。使用普通 *Taq* 酶, 降落 PCR 程序能明显提高 PCR 的特异性, 它可用于扩增普通 PCR 难以扩增的基因片段, 或在假阳性难以去除的情况下提高 PCR 的特异性。

**关键词:** 优化 SDS 法; 降落 PCR; 退火温度; KS 基因

**中图分类号:** Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)11-0087-04

## Touch Down PCR for Amplification of Ketosynthase Genes

LIU Bing-hui<sup>1,2</sup>, CAO Yuan-yin<sup>1</sup>, CHENG Hao<sup>1,2</sup>, YAN Jian-fang<sup>2</sup>, QI Xiao-hui<sup>2</sup>, LIU Qiu<sup>2\*</sup>

(1. Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

2. Life Science College, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China)

**Abstract:** Objective: To get target KS genes by a simple and efficient touch down PCR (TD-PCR). Methods: Genomic DNA from three strains of actinomycetes was extracted by modified SDS method. The ketosynthase (KS) gene fragments from three strains of actinomycetes were amplified with touch down PCR and common PCR. Results: Target genes were obtained by TD-PCR. The results indicated that touch down PCR was efficient in amplifying the gene from three strains of actinomycetes and it was more specific than common PCR. Conclusion: TD-PCR with *Tag* DNA polymerase has higher specificity than common PCR. It can efficiently improve specificity of PCR and be used to clone gene fragments which are difficult to clone by the common PCR method, or to increase the specificity of PCR when false positivity is difficult to eliminate.

**Key words:** Modified SDS method; Touch down PCR; Annealing temperature; KS gene

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是在模板 DNA、引物和 4 种脱氧核糖核苷酸存在的条件下依赖 DNA 聚合酶的酶促反应<sup>[1,2]</sup>。试验中经常出现 2 种情况: 一种是因未找到最佳扩增条件导致产生大量非特异性产物, 另一种情况是未扩增出任何产物。影响 PCR 的因素很多, 除了受 PCR 仪器性能的制约外, 也取决于反应体系和反应

条件的设置, 其中  $Mg^{2+}$  浓度、缓冲液 pH 值、循环条件等因素均影响 PCR 的结果, 其中退火温度更是至关重要<sup>[3]</sup>。降落 PCR 主要针对退火温度不确定的基因扩增, 通过设计多个循环使相连循环的退火温度越来越低以扩增出目的片段的一种扩增方法<sup>[3,4]</sup>。作为一种行之有效的 DNA 体外扩增方法, 降落 PCR 目前被越来越多地使用<sup>[5~7]</sup>。

收稿日期: 2008-04-24

基金项目: 国家自然科学基金(30671398); 辽宁省自然科学基金(20062189); 辽宁省教育厅项目(2004F079); 大连市青年基金(2005J22JH040)

作者简介: 刘炳辉(1980-), 男, 山东临沂人, 在读硕士研究生, 研究方向: 放线菌应用。

通讯作者: 刘秋(1969-), 女, 辽宁大连人, 教授, 博士, 主要从事放线菌应用开发研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试菌株为 *S. spiramyceticus* (CGMCC 4.1118), 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC), 2 株放线菌菌株 D8 和 D18 为生物技术与资源利用国家民委——教育部重点实验室从土壤中分离获得。

### 1.2 主要试剂仪器

PCR 扩增所用的主要试剂 dNTPs、*Taq* DNA 酶、 $10\times$  PCR Buffer ( $Mg^{2+}$  Plus)、DL 2000 Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司; 琼脂糖(Spanish 分装)由北京百泰克生物技术有限公司生产。主要仪器有电泳仪 DYY-12 稳压电泳仪, TC-512 型 PCR 仪, 凝胶成像仪 UVP。

### 1.3 试验方法

1.3.1 优化 SDS 法提取基因组 DNA<sup>[8]</sup> 取 0.15 g 新鲜菌体于研钵(-20℃预冷)中, 反复液氮研磨至细粉状, 迅速分装至 2 个 1.5 mL 离心管中; 分别加 TE Buffer 550  $\mu$ L, 加 65℃预热的 20% SDS 溶液 30  $\mu$ L, 漩涡振荡 5 s, 加 20 mg/mL 蛋白酶 K 20  $\mu$ L, 轻轻混匀, 37℃保温 1 h; 加等体积 Tris 饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提, 轻微颠倒混匀, 10000 r/min 离心 10 min; 小心吸取上清至新离心管中, 加等体积氯仿/异戊醇(24:1)抽提, 10000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液与等体积异丙醇(4℃预冷)混匀。如观察到白色絮状沉淀则挑出; 如无明显现象则 10000 r/min 离心 3 min, 弃上清。沉淀用 1 mL 70%乙醇(4℃预冷)洗涤 1 min, 自然风干, 加入 40  $\mu$ L TE 溶解, -20℃保存备用。基因组 DNA 样品检测: 取 1  $\mu$ L DNA 溶液于 0.8%琼脂糖凝胶 80 V 电泳 45 min, 用 UVP 凝胶成像系统观察并成像分析。

1.3.2 引物及 PCR 扩增 (1) KS 基因 PCR 扩增引物为: KSP1: 5'-TSG AYC CSC AGC ARC G-3'; KSP1': 5'-GCY TCS AYS GGR TCR CCA A-3'。引物由北京三博远志生物技术有限公司合成。

(2) 普通 PCR 反应体系 (50  $\mu$ L) 及反应程序: 50  $\mu$ L 反应体系包括: 1  $\mu$ L DNA, 4  $\mu$ L dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), 5  $\mu$ L  $10\times$  PCR Buffer ( $Mg^{2+}$  Plus), 0.25  $\mu$ L *Taq* DNA 酶, 2  $\mu$ L  $10^4$  mol/L 引物, 灭菌超纯水补足至 50  $\mu$ L, 混均。反应在 TC-512 梯度 PCR 仪上进行。反应程序为 95℃预变性 5 min; 95℃变性 1 min, 60℃复性 1 min, 72℃延伸

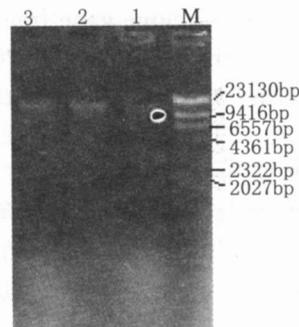
1 min 进行 35 个循环; 72℃延伸 5 min。PCR 扩增结束, 取 4  $\mu$ L 扩增产物于 1%琼脂糖凝胶 80 V 电泳 45 min, 用 UVP 凝胶成像系统观察并成像分析。

(3) 降落 PCR 反应体系 (50  $\mu$ L) 及反应程序<sup>[9,10]</sup>: 降落 PCR 反应体系 (50  $\mu$ L) 如下: 1  $\mu$ L DNA, 4  $\mu$ L dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), 5  $\mu$ L  $10\times$  PCR Buffer ( $Mg^{2+}$  Plus), 0.25  $\mu$ L *Taq* DNA 酶, 2  $\mu$ L  $10^4$  mol/L 引物, 灭菌超纯水补足至 50  $\mu$ L, 混均。降落 PCR 扩增反应程序为 105℃热盖, 95℃预变性 5 min; 然后进入 PCR 扩增程序, 95℃变性 45 s, 67~63℃每降一度循环 4 次, 62~60℃循环 5 次, 59~58℃循环 3 次, 72℃延伸 45 s, 共 41 个循环; 最后再 72℃延伸 10 min。PCR 按照设计好的反应体系加样, 热盖后, 放入已设定好反应程序的 PCR 仪中。PCR 扩增结束, 取 5  $\mu$ L 扩增产物于 1%琼脂糖凝胶 80 V 电泳 45 min, 用 UVP 凝胶成像系统观察并成像分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 优化 SDS 法提取基因组 DNA 结果

以优化 SDS 法提取 3 株供试菌株基因组 DNA 获得了良好的结果, 如图 1。图 1 中第 1—3 道分别为菌株 4.1118, D8, D18 基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳效果, 每个基因组 DNA 条带在接近 23000 kb 处, 均可见一条清晰的 DNA 条带, 提取获得的 DNA 样品纯度较高, 为后续 PCR 操作提供了良好的 DNA 模板。



1—3 分别为菌株 4.1118, D8, D18 的总 DNA;

M 为  $\lambda$ -*Hind* III digest Marker

图 1 优化 SDS 法提取总 DNA 的电泳图谱

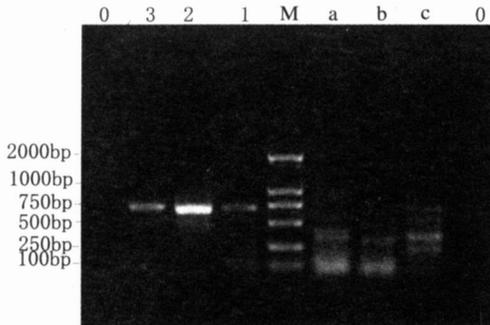
### 2.2 普通 PCR 扩增目的基因片段

利用普通 PCR 扩增 KS 基因片段的琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 2 所示。从图 2 可以看出, a 道无目标特异条带且有非特异性条带影响; b 道亦无目标特异条带且有非特异性条带影响; c 道有目

标特异条带, 但有非特异性条带影响且产物量较少, 可能是由于退火温度不适宜或程序设计不合理等原因导致引物不能与模板有效的结合, 从而使产物不能有效合成。

### 2.3 降落 PCR 扩增目的基因片段

利用降落 PCR 扩增 KS 基因片段的琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 2。试验结果表明 1, 2, 3 泳道中都有明显的目标特异条带 (700bp 左右)。第 1 道的 PCR 产物收益量稍微少些, 同普通 PCR 相比, 在同样的反应体系中降落 PCR 扩增效果明显。



1, 2, 3 分别以 4. 1118, D8, D18 为模板进行降落 PCR 扩增;  
a, b, c 分别以 4. 1118, D8, D18 为模板进行普通 PCR 扩增;  
1, 2, 3, a, b, c 所用引物为 KSP1 和 KSP1; 0 为阴性对照;  
M 为 DL 2000 Marker

图 2 普通 PCR 和降落 PCR 扩增目标基因的电泳图谱

## 3 讨论

微生物次生代谢产物是筛选天然药物的主要物质基础, 目前已经分离到了大量的微生物次级代谢产物, 但受微生物培养手段和化合物分离鉴定技术的限制, 已知微生物和已知结构化合物分离的重复性很高, 新的天然产物分离越来越困难。药源基因的筛选和活性基因的分子筛选模型无疑为新型天然产物的研究开辟了巨大的研究空间和极具诱惑力的前景<sup>[11]</sup>。人们基于 PCR 方法从环境样品中筛选 KS 基因片段, 但是应用简并引物的普通 PCR 反应结果得到的非特异产物较多, 扩增效果较差, 对进一步的操作带来很多不便。如何提高 PCR 质量成了关键。热启动 PCR 亦是一种能够提高 PCR 特异性的简便的方法<sup>[12]</sup>, 但其不能解决所有的问题。降落 PCR 是一种潜在的一步法找到最佳退火温度的方法, 在克隆基因上有着较强的优势, 尤其对于不确定退火温度的基因扩增更佳, 从而获得较理想的扩增产物<sup>[9, 13]</sup>。

通常降落 PCR 的退火温度范围可跨越 15℃, 从高于 T<sub>m</sub> 值几度到低于其 10℃左右, 在每个温度

上循环 2 个周期, 然后在较低的复性温度上循环 3~5 个周期。由于 PCR 过程中的前几个循环对于扩增产物的纯度非常重要, 因此, 前几个循环设定较高的退火温度会增加引物与模板结合的特异性, 阻止非特异性产物的形成<sup>[9, 14]</sup>。本试验将退火温度范围设定为 67℃至 58℃, 从 67℃至 63℃循环复性温度上设 4 个循环周期, 从 62℃至 59℃循环复性温度上设 5 个循环周期, 以提高其特异产物与非特异产物的比率。试验中发现, 由于最低的退火温度较低, 而这一温度又是循环周期较多的退火温度, 在较低的退火温度下会形成少量非特异性配对, 但试验已经达到理想的扩增目的。

### 参考文献:

- [1] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.
- [2] C W 迪芬巴赫, G S 德维克斯勒. PCR 技术实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 33.
- [3] 黄留玉. PCR 最新技术原理、方法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 254—257.
- [4] Pirae M, Ving L C. Use of degenerate primers and touchdown PCR to amplify a halogenase gene fragment from *Streptomyces venezuelae* ISP523Q [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2002, 29(1): 1—5.
- [5] 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.
- [6] 蔡欣, 吴建平, 徐明旭, 等. 应用 nested 和 touch down PCR 技术分离牦牛 CAPN1 大亚基基因 EST [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(2): 14—18.
- [7] Garé a-Pedrajas M D, Bainbridge B W, Heale J B, et al. A simple PCR-based method for the detection of the chickpea-wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in artificial and natural soils [J]. European Journal of Plant Pathology, 1999, 105(3): 251—259.
- [8] Kieser T, Bibb M J, Buttner M J, et al. Practical *Streptomyces* genetics [M]. Norwich: John Innes Foundation, 2000: 170—171.
- [9] Don R H, Cox P T, Wainwright B J, et al. “Touch down” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification [J]. Nud Acids Res, 1991, 19(14): 4008.
- [10] 张贵星, 袁保梅, 许培荣, 等. 改良的降落 PCR 与普通 PCR 结果比较 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2003, 38(3): 352—354.
- [11] 徐平, 李文均, 高慧英, 等. 产生芳香环聚酮类天然产物放线菌的分子筛选研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2005, 30(3): 134—137.

# 武汉地区西瓜枯萎病菌生理小种分化研究

孙玉宏, 曾红霞, 李煜华, 杜念华, 张利红, 陈伟, 丁鸣

(武汉市农业科学研究所, 湖北 武汉 430051)

**摘要:** 用浸根接种法对来自武汉市郊西瓜主产区, 经单孢分离得到的 12 个西瓜枯萎病菌株进行了生理小种分化鉴定。根据这 12 个菌株在 3 个鉴别寄主上的反应, 初步将它们划分为 2 类: 一类为 1 号生理小种, 另一类为 0 号生理小种。

**关键词:** 西瓜枯萎病菌; 生理小种; 分化

**中图分类号:** S436.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)11-0090-02

西瓜枯萎病是由尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *niveum* (Smith) Snyder and Hans)引起的土传真菌病害, 是限制西瓜产量和品质提高的主要因素。推广和使用抗病品种是防治该病的最经济有效的途径。不同生理小种对西瓜的致病性不同, 摸清西瓜枯萎病菌生理小种的分布, 对加速西瓜抗病育种进程及品种合理布局具有十分重要的意义。在我国, 许多西瓜种植区已有关于西瓜枯萎病菌生理小种的报道, 但对武汉地区西瓜主产区的枯萎病菌生理小种的分化情况缺乏研究。本研究的目的是采用国际通用鉴别寄主及鉴别标准<sup>[1]</sup>, 检测武汉地区西瓜枯萎病菌的生理小种分化及流行的生理小种。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株及鉴别寄主

供试的 12 个西瓜枯萎病菌株分离自表现枯萎症状的西瓜病株, 所采用的分离方法是单孢分离法。12 个西瓜枯萎病菌株来源信息见表 1。

供试鉴别寄主包括 Sugar Baby, Charleston Gray 和 Calhoun Gray。所有这些品种的种子均由

武汉市农科所提供。

### 1.2 鉴定方法

供试西瓜种子用 1‰HgCl<sub>2</sub> 溶液浸泡消毒 10 min 后, 用清水冲洗干净, 浸种 8h 后催芽, 待出芽后将其播种于装有洗净沙子的育苗盘中, 覆以 2~3 cm 厚的灭菌土, 按常规育苗法管理, 当幼苗子叶平展、真叶刚露时, 即可准备接种。

菌种经单孢分离后保存于 4℃冰箱中, 经马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA)活化培养后, 用无菌水冲

表 1 12 个西瓜枯萎病菌株来源信息

菌株编号	取样地点	西瓜品种	土质
1	蔡甸薛山二组	花仙子	山地水田
2	江夏群力	万福来	湖地
3	江夏土地堂	黄宝石	水田
4	蔡甸薛山二组	花仙子	山地水田
5	蔡甸薛山二组	花仙子	山地水田
6	江夏土地堂	黄宝石	水田
7	蔡甸薛山二组	万福来	山地水田
8	江夏土地堂	黄宝石	旱地
9	蔡甸薛山二组	万福来	山地水田
10	江夏群力	万福来	湖地
11	蔡甸薛山二组	万福来	山地水田
12	江夏土地堂	黄宝石	旱地

收稿日期: 2008-05-23

基金项目: 武汉市科技攻关计划项目资助(2003203034)

作者简介: 孙玉宏(1968-), 女, 湖北公安人, 高级农艺师, 硕士, 主要从事西甜瓜栽培、育种研究。

- [12] Aquila R T D, Bechtel L J, Videler J A, et al. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating[J]. *Nucleic Acids Res* 1991, 19(13): 3749.
- [13] Vestheim H, Edvardsen B, Kaartvedt S. Assessing feeding of a carnivorous copepod using species-specific

- PCR[J]. *Marine Biology*, 2005, 47(2): 381—385.
- [14] Zhang Z, Martineau D. Single-tube heminested PCR coupled with 'touchdown' PCR for the analysis of the walleye dermal sarcoma virus env gene[J]. *J Virol Methods* 1996, 60(1): 29—37.