

RACE 方法在甘蓝型油菜基因克隆中的应用

许本波, 谢伶俐, 严 寒, 何 勇, 田志宏
(长江大学 生命科学学院, 湖北 荆州 434025)

摘要: 将 Invitrogen 公司开发的一种 RACE 技术应用于甘蓝型油菜基因家族成员的克隆, 克隆了查尔酮异构酶基因家族的全部 6 个成员和类黄酮 3'-羟化酶基因家族的 2 个成员。应用结果表明: 该方法具有低成本、高效率、能克隆全长基因的特点, 适合甘蓝型油菜等多倍体物种基因家族成员的克隆。

关键词: 多基因家族; 克隆; RACE; 甘蓝型油菜

中图分类号: S565.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 3268(2007)09 0045 04

Application of RACE Technique in Gene Cloning of *Brassica napus* L.

XU Ben bo, XIE Ling li, YAN Han, HE Yong, TIAN Zhi hong
(College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

Abstract: A new RACE method exploited by Invitrogen was used in gene cloning of *Brassica napus* L. in the paper. Six members of gene family of chalcone isomerase and two members of gene family of flavonoid 3'-hydroxylase were cloned from *B. napus*. The result indicated that it is a low cost and high efficient way, which could clone the full length of cDNA. It is suitable for cloning the genes from polyploid species like *B. napus*.

Key words: Polygene family; Cloning; RACE; *Brassica napus* L.

通过进化研究, 发现十字花科植物进化中的三倍化现象^[1], 只要某一基因在拟南芥中存在一个成员, 它将在甘蓝型油菜中存在 6 个成员。因此对于甘蓝型油菜这类异源多倍体, 要克隆某一基因家族的全部成员, 必须找到一种高效的克隆方法。在分子进化研究和比较基因组学的研究中, 也需要克隆一个基因家族在一个物种中的所有成员, 甚至不同物种中该基因家族的所有成员。当前, 基因克隆的方法主要有文库法和 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 法, 但文库法存在筛选工作量大, 成本比较高的缺点。而 RACE 技术是基因克隆中的一个有效手段, 特别适合同源克隆, 只要找到一个基因的部分序列, 就很容易得到该基因的全长。目前, RACE 试剂盒主要有自身环化法、末端转移酶法和

接头法^[2,3]。但自身环化法和末端转移酶法存在环化效率低和不容易得到基因全长的缺点。本研究将 Invitrogen 公司开发的一种 RACE 技术应用于甘蓝型油菜基因家族成员的克隆, 旨在寻找一种适合甘蓝型油菜基因家庭成员克隆的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为双低优质甘蓝型油菜品系“5B”。田间采集油菜蕾、花以及开花后 10 d, 20 d 和 30 d 3 个时期的种子, 立即冰冻于液氮中待用。

1.2 菌株

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α , pMD18-T 载体购自大连 TaKaRa 生物工程有限

收稿日期: 2007 04 13

基金项目: 长江大学博士科研启动基金项目

作者简介: 许本波(1977), 男, 湖北安陆人, 讲师, 博士, 主要从事甘蓝型油菜的基因克隆和功能验证工作。

公司。

1.3 RACE 反转录

采用 CTAB 法提取各部位的总 RNA^[4]。取蕾、花和 3 个时期种子的总 RNA 各 1 μ g, 共 5 μ g 在冰上混匀待用。

1.3.1 RNA 的去磷酸化 反应体系为 5 μ g 总 RNA, 10 U CIP, 40 U RNaseOutTM 和工作 buffer。混匀后 50 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 酚/氯仿法纯化。

1.3.2 去除 mRNA 的帽子结构 反应体系为去磷酸化后的 RNA, 0.5 U TAP, 40 U RNaseOutTM 和工作 buffer。混匀后 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 酚/氯仿法纯化。

1.3.3 寡核苷酸与去帽 mRNA 的连结 在含有预先分装好冻干的 GeneRacerTM RNA 寡核苷酸的管中加入 7 μ L 去磷酸化去帽的 RNA, 吸取几次以重悬 RNA Oligo。65 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 以消除 RNA 二级结构, 置冰上冷却后加入 1 μ L 10 mmol/L ATP, 40 U RNaseOutTM, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 酚/氯仿法纯化。

1.3.4 mRNA 的反转录 连结好的 RNA 中加入 1 μ L GeneRacerTM Oligo dT 引物, 1 μ L 无菌水, 1 μ L 10 mmol/L dNTP, 65 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 以消除 RNA 二级结构, 置冰上冷却进行反转录反应。

1.3.5 cDNA 的放大扩增 PCR 反应体系参照 TaKaRa 公司的 LA Taq(DRR02AG) 的说明书, 反应模板为 2 μ L 第一链 cDNA, PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 68 $^{\circ}$ C 退火并延伸 6 min, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.4 目标基因的 RACE 扩增

分别对来自拟南芥、紫罗兰和紫苏等的 F3'H (类黄酮 3'-羟化酶)、CHI (查尔酮异构酶) 基因的核酸序列进行多重比对, 根据各基因的保守位点设计用于扩增各基因的保守区引物。PCR 扩增、亚克隆、测序, 并根据测序结果分别设计 1 对基因特异引物用于各基因家族 RACE 的第一次 PCR 扩增, 同时设计 1 对基因特异引物用于 RACE 巢式扩增。使用 GeneRacerTM 5' Primer 和反向基因特异引物用于 F3'H 和 CHI 的 5' 末端第一次 PCR 扩增。而用 GeneRacerTM 5' Primer 和反向引物进行 F3'H 和 CHI 的 5' 末端巢式扩增。

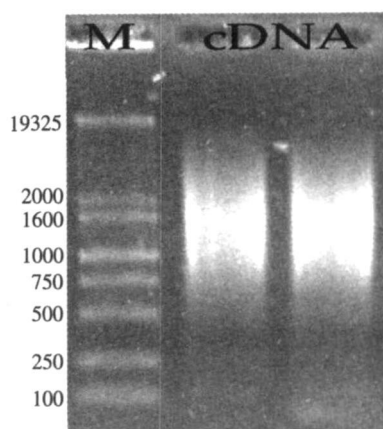
同理, 进行各基因的 3'-RACE 的第一次 PCR 扩增和巢式反应。

根据 5'-RACE 和 3'-RACE 末端测序结果, 分别设计正向引物和反向引物, 以总 cDNA 为模板, 扩增 BnF3'H 和 BnCHI 基因家族成员。

2 结果与分析

2.1 反转录结果

对放大扩增后的 cDNA 进行琼脂糖电泳检测, 结果显示(图 1), cDNA 呈现出大小在 200 bp ~ 5 kb 的拖带, 其中重心区域在 1 kb 至 4 kb 间, 说明反转录完全, 得到了高质量的总 cDNA。在反转录体系中, 一次反转录得到的 cDNA 的体积为 20 μ L, 经过放大扩增后, 得到的 cDNA 总体积达到 500 μ L, 每次 PCR 反应用 1 μ L cDNA 作为模板, 可以进行 3'-RACE, 5'-RACE 和全长 cDNA 扩增的次数高达 500 次, 所以经过一次反转录, 可以扩增出多个基因, 提高实验效率, 节省实验成本, 特别适合从一个材料中克隆基因家族和从同一个材料中克隆多个基因。



M: 分子量标准; cDNA: 反转录得到的 cDNA

图 1 RACE 反转录得到的 cDNA

2.2 基因扩增结果

以反转录得到的总 cDNA 为模板用于 3'-RACE 扩增, 经过第一次 PCR 扩增和巢式扩增, 结果获得一条约 350 bp 的片段, 与预期大小相符(图 2a), 而另外有一条约 750 bp 的带。分别回收两片段, 亚克隆并通过菌液 PCR 检测克隆子, 将测序结果进行 NCBI Blast 分析后发现片段大小约 350 bp 的序列与其他植物 F3'H 基因同源, 与拟南芥 F3'H 同源性最高, 而另外一条 750 bp 的条带与其他植物 F3'H 没有同源性, 表明不是 F3'H 基因。

以反转录得到的总 cDNA 为模板用于 5'-RACE 扩增, 经过第一次 PCR 扩增和巢式扩增, 获得一条约 750 bp 的片段, 与预期大小相符(图 2b), 回收该片段, 亚克隆并通过菌液 PCR 检测, 挑选多个有代表性单克隆测序, 将测序结果进行 NCBI Blast

lomonas sp.) 以及苍白杆菌属(*Ochrobactrum intermedium*)^[8]。本研究发现的2株活性较高的尼古丁降解菌,经初步鉴定为短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)和侧孢芽孢杆菌(*Bacillus laterosporus*),这在国内外为首次报道。

我国加入世贸组织后,烟叶市场的国际化进程加快,中国的烟草将在更大范围直接参与国际竞争。另外,随着社会的发展进步,吸烟与健康问题日益引起世人关注,开发无公害优质烟叶,生产安全性卷烟制品已迫在眉睫。低焦油、低尼古丁、高香气的卷烟将会占据主流市场。

国内卷烟企业目前贮存的上部烟叶较多,一般因其尼古丁含量较高而难以较多用于叶组配方中^[12],这个问题已引起有关方面的重视,如何降低这些烟叶中的尼古丁含量是各卷烟企业所面临的一个现实问题,因此,在工业上开展利用微生物对烟草进行降解尼古丁处理研究具有实际应用价值,可以提高烟叶资源的利用率,产生较高的经济效益和社会效益。

参考文献:

[1] Wada E. Microbial degradation of the tobacco alkaloids and some related compounds[J]. Arch Biochem Biophys, 1958, 72(1): 145-162.
[2] Lawrence E, Gravely, Louisville Ky, et al. Process for reduction of nitrate and nicotine content of tobacco by

microbial treatment; US, 4557280[P]. 1978.
[3] Civilini M, Domenis C, Sebastianutto N, et al. Nicotine decontamination agro industrial waste and its degradation by micro organisms[J]. Waste Manage Research, 1997, 15: 349-358.
[4] Meher K K, Panchwagh A M, Rangrass S, et al. Biomechanation of tobacco waste[J]. Environmental Pollution, 1995, 90(2): 199-202.
[5] Carl B, Arnold A, Hauer B et al. Sequence and transcriptional analysis of a gene cluster of *Pseudomonas putida* 86 involved in quinoline degradation[J]. Gene, 2004, 331: 177-188.
[6] Koetter J W A, Schulz G. Crystal structure of 6-hydroxy-D-nicotine oxidase from *Arthrobacter nicotinovorans*[J]. J Mol Biol, 2005, 352: 418-428.
[7] Calin Bogdan Chiribau, Marius Mihasan, Petra Ganas et al. Final steps of nicotine in the catabolism of nicotine demethylation versus demethylation of γ -N-methylaminobutyrate[J]. FEBS Journal, 2006, 273: 1528-1536.
[8] 袁勇军, 陆兆新, 黄丽金, 等. 烟碱降解细菌的分离、鉴定及其降解性能的初步研究[J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 118-181.
[9] 夏振远, 雷丽萍, 吴玉萍, 等. 降烟碱细菌——烟草节杆菌 K9 的分离及鉴定[J]. 中国烟草科学, 2006, 27(2): 1-4.
[10] 席宇, 宋淑红, 杨艳坤, 等. 微生物降解尼古丁的研究与应用进展[J]. 河南农业科学, 2007(3): 9-13.
[11] Decker K, Bleeg H. Induction and purification of state-specific nicotine oxidizing enzymes from *Arthrobacter oxidans*[J]. Biochem Biophys Acta, 1965, 105: 313-324.
[12] 张永安, 周冀衡, 黄义德, 等. 我国上部烟叶可用性偏低的原因分析及改善措施[J]. 安徽农业科学, 2004, 32(4): 783-785.

(上接第 47 页) 而其 5' 端的接头序列为 CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA, 包含有两条引物序列, GeneRacerTM 5' Primer 5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3', GeneRacerTM 5' Nested Primer 5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3', 计算的 T_m 值分别达到 61.1℃和 57.4℃, 都具有比较高的退火温度, 而且反转录所用的酶的最适温度为 50~55℃^[7], 而通常用的禽源反转录酶和鼠源反转录的最适反转录温度为 37℃, 所以本方法提高了反转录的特异性和随后的 PCR 反应的特异性, 为准确克隆出目的基因打下了坚实的基础。

参考文献:

[1] Lagercrantz U. Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that *Brassica* genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements [J]. Genetics, 1998, 150: 1217-1228.

[2] Maruyama K, Sugano S. Oligo-Capping. A simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides[J]. Gene, 1994, 138: 171-174.
[3] Schaefer B C. Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: New strategies for polymerase chain reaction cloning of full length cDNA ends[J]. Anal Biochem, 1995, 227: 255-273.
[4] Jaakola L, Pirttilä A M, Halonen M, et al. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit[J]. Mol Biotechnol, 2001, 19: 201-203.
[5] Shirley B S, Hanley, Goodman H M. Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations[J]. Plant Cell, 1992, 4: 333-347.
[6] Ben Bo Xu, Jia Na Li, Xue Kun Zhang, et al. Cloning and molecular characterization of a functional flavonoid 3'-hydroxylase gene from *Brassica napus*[J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164: 350-364.
[7] Schwabe W, Lee J E, Nathan, et al. ThermoscriptTM RT, a new avian reverse transcriptase for high temperature cDNA synthesis to improve RT-PCR[J]. Focus, 1998, 20: 30-33.