

旱稻 Tail-PCR 技术主要影响因素的优化和验证

朱 昀,李朝炜,刘嗣凡,刘 颖,魏景芳
(河北科技大学,河北 石家庄 050018)

摘要:以转基因旱稻为材料,对 Tail-PCR 方法进行了分析优化,包括 DNA 样品质量、扩增产物稀释程度、酶的种类、简并引物组合方式、引物结合偏好性等。结果表明,DNA 样品质量的高低是影响试验成功的重要因素,样品纯度不高导致扩增无法正常进行;扩增后对产物稀释不充分会影响下轮扩增效果,适当增大产物稀释倍数可在下轮扩增中增大出带可能;LA *Taq* 酶与普通 *Taq* 酶相比扩增效果没有明显不同,使用普通 *Taq* 酶即可进行 Tail-PCR 扩增;混合简并引物在旱稻中并没有获得更好的扩增效果。此外,发现简并引物对于不同物种存在偏好性,常规 4 种简并引物与旱稻基因组均可高效结合。优化后的 Tail-PCR 技术结果稳定,重复性好,可以准确地获得转基因旱稻插入位点的旁侧序列。

关键词:旱稻; Tail-PCR 技术; 优化; 影响因素
中图分类号: S511.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2018)01-0007-05

Optimizing and Confirming of Main Influence Factors of Tail-PCR for Upland Rice

ZHU Yun, LI Zhaowei, LIU Sifan, LIU Ying, WEI Jingfang
(Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

Abstract: Tail-PCR about transgenic upland rice was analyzed and optimized, including the quality of DNA samples, dilution degree of amplification products, enzyme types, degenerate primer combinations, primer preferences, etc. The results showed that the quality of DNA sample was an important factor for the success of the experiment. Low-purity sample led to an abortive amplification. The result of the next round amplification was affected by the dilution of the product of the previous round, and appropriately increasing product diluted multiples could increase the belts in the next round of amplification. The effect of LA *Taq* enzyme in this experiment was not significantly different from that of ordinary *Taq* enzyme, therefore the normal *Taq* enzyme can be used to amplify effectively. The effect of amplification with mixed degenerate primers in upland rice was not better than that of separate amplification. Moreover, it was found that degenerate primers had preference in different species. The conventional four kinds of degenerate primers could all effectively combine with the genome of the upland rice. The optimized Tail-PCR about upland rice in our studies is of stability and good repeatability. It can be accurate to obtain flanking sequence of insertion site in transgenic upland rice.

Key words: Upland rice; Technology of Tail-PCR; Optimizing; Influence factors

热不对称交错 PCR (Thermal asymmetric inter-laced PCR, Tail-PCR) 是一种分离已知 DNA 序列旁侧未知序列的分子生物学技术。该方法通过不同特异引物与简并引物的组合,进行 3 轮 PCR 扩增,

收稿日期:2017-08-03
基金项目:国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2016ZX08001003-006);河北科技大学五大平台开放基金课题(SW21, 2015PT51);河北省高等学校科学技术研究项目(QN2017071)
作者简介:朱 昀(1979-),女,河北保定人,副教授,博士,主要从事植物基因工程与分子生物学研究。
E-mail: xiaozhuhome@163.com

采取高温特异性扩增与低温随机扩增相间进行的特殊热循环程序,达到特异产物扩增的同时抑制由随机引物产生的非特异扩增的目的^[1]。该方法简单易行,能够在较短的时间内获得目标片段,产物特异性高,结果较为稳定^[2]。目前,采用此方法已成功对大豆、棉花、小麦、油菜、红豆杉、天山雪莲、拟南芥等植物已知序列的侧翼序列进行了分析^[3-8]。

为了对已获得的大量转基因旱稻纯合体株系进行插入位点旁侧序列分析,本研究以转基因旱稻为材料,参考前人成功经验,结合河北科技大学生物技术实验室的实际情况,对 Tail-PCR 方法进行探索改进和优化,旨在为转基因旱稻的研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

转基因 T₃ 代旱稻由河北科技大学生物技术实验室通过农杆菌侵染法获得^[9-11],通过 Southern blot 分析确定外源基因为单拷贝^[12]。侵染所用质粒为改造的 pCambia3301。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 采用改良的 CTAB 法^[13]对旱稻基因组进行提取,略加改动。剪取转基因植株叶片 0.2 g,放于 2 mL 装有小钢珠的离心管中,迅速置于液氮中冷冻 2 min,在研磨机上进行研磨;叶片研成粉末后,向每个离心管中加入 600 μ L 提取液[CTAB 3% (m/V), NaCl 1.4 mol/L, EDTA (pH 值 8.0) 20 mmol/L, Tris-HCl (pH 值 8.0) 100 mmol/L, β -巯基乙醇 0.2% (m/V)],混匀后放于 65 $^{\circ}$ C 水浴锅中水浴 30 min,期间轻柔摇晃数次;将小钢珠从离心管中取出,12 000 r/min 离心 15 min;取上清于新的 1.5 mL 的离心管中,加等体积酚/氯仿/异戊醇,充分混匀;12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清,加等体积氯仿/异戊醇,充分混匀;12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清,加入-20 $^{\circ}$ C 提前预冷的异丙醇,使之与上清体积相等,轻柔地混合均匀,-20 $^{\circ}$ C 冰箱放置 20 min;12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,75% 的乙醇洗涤 1 次,无水乙醇洗 1 次,室温晾干;待管壁无残留液体、DNA 呈半透明状时,加 50 μ L TE 溶解,-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 引物设计 Tail-PCR 的右臂第 1 条特异引物设计在 pCambia3301 右边界以内,依次向外设计 3 条特异引物 (R1、R2、R3),每条引物间隔 50~150 bp。左臂的第 1 条特异引物设计在 pCambia3301 左边界以内,依次向外设计 3 条特异引物 (L1、L2、L3),每条引物间隔 50~150 bp。左右臂 6

条特异引物退火温度在 60~65 $^{\circ}$ C,G+C 含量在 40%~60%。简并引物采用 Liu 等^[14]引物,共 5 条 (LAD1、LAD2、LAD3、LAD4、AC)。各引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')
L1	GGCTTCAAGAGCGTGGTCGCTGTCAT
L2	GGTTTCTGGCAGCTGGACTTCAGCCT
L3	CGAGTTTCTCCATAATAATGTGTGAGTAGTCCC
R1	GATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATG
R2	CTTAAGATTGAATCTGTGTGCCGGCTTGGC
R3	ACCACCACCACCACACGTGTGAATTAC
LAD1	ACGTGGACTCCGAGCGGCCGCVNVNNGGAA
LAD2	ACGTGGACTCCGAGCGGCCGCBNNNGGTT
LAD3	ACGTGGACTCCGAGCGGCCGCVNVNNNCCAA
LAD4	ACGTGGACTCCGAGCGGCCGCBDBNNNCGGT
AC	ACGTGGACTCCGAG

1.2.3 Tail-PCR 扩增 将特异引物与简并引物配对进行 3 轮扩增。第 1 轮左臂侧翼序列分析的引物组合方式分别为 L1+LAD1、L1+LAD2、L1+LAD3、L1+LAD4,右臂侧翼序列分析的引物组合方式为 R1+LAD1、R1+LAD2、R1+LAD3、R1+LAD4。第 2 轮左臂引物组合方式为 L2+AC,右臂引物组合方式为 R2+AC。第 3 轮左臂引物组合方式为 L3+AC,右臂引物组合方式为 R3+AC。反应的第 1 轮产物稀释 40 倍作为第 2 轮模板使用,第 2 轮产物稀释 10 倍作为第 3 轮 PCR 反应的模板。反应体系见表 2,PCR 反应程序见表 3。

表 2 Tail-PCR 反应体系

试剂	第 1 轮/ μ L	第 2 轮/ μ L	第 3 轮/ μ L
2.5 mmol/L dNTPs	2.0	2.5	5.0
L/R (10 pmol/ μ L)	0.5	0.5	1.0
LAD (10 pmol/ μ L)	5.0	0	0
AC (10 pmol/ μ L)	0	2.0	4.0
Taq DNA polymerase (5 U/ μ L)	0.16	0.2	0.5
模板 DNA	1.0	1.0	2.0
10 \times buffer	2.0	2.5	5.0
加 ddH ₂ O 至	20	25	50

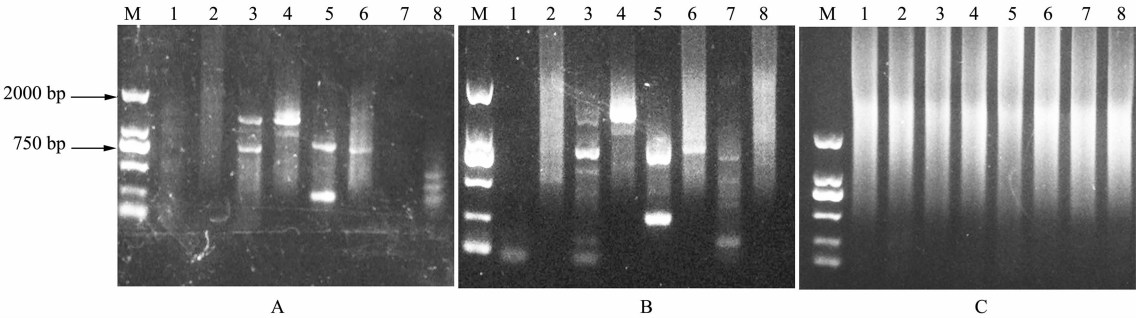
1.2.4 琼脂糖凝胶电泳检测及分析 将 Tail-PCR 第 2 轮与第 3 轮反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,由于 3 轮扩增的特异引物为巢式引物,所以第 3 轮扩增产物略小于第 2 轮。挑选在第 2 轮和第 3 轮扩增中大小关系适当并且大于 500 bp 的条带回收测序。将测序结果在 NCBI 上比对,分析插入位点旁侧序列。

表 3 Tail - PCR 反应程序		
反应	程序编号	温度设置
第 1 轮	1	93 ℃ 2 min, 95 ℃ 1 min
	2	94 ℃ 30 s, 56 ℃ 1 min, 72 ℃ 2.5 min, 11 个循环
	3	94 ℃ 30 s, 25 ℃ 2 min, 0.5 ℃/s to 72 ℃, 2.5 min
	4	94 ℃ 20 s, 56 ℃ 1 min, 72 ℃ 2.5 min, 26 个循环
	5	72 ℃ 5 min
第 2 轮	1	94 ℃ 20 s, 58 ℃ 1 min, 72 ℃ 2.5 min, 2 个循环
	2	94 ℃ 20 s, 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 2.5 min
	3	94 ℃ 20 s, 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 2.5 min
	4	94 ℃ 20 s, 50 ℃ 1 min, 72 ℃ 2.5 min
	5	2—4 步 14 个循环
第 3 轮	6	72 ℃ 5 min
	1	94 ℃ 20 s, 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 2.5 min
	2	94 ℃ 20 s, 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 2.5 min
	3	94 ℃ 20 s, 50 ℃ 1 min, 72 ℃ 2.5 min
	4	1—3 步 12 个循环
	5	72 ℃ 5 min

2 结果与分析

2.1 DNA 提取方式对扩增结果的影响

DNA 质量的好坏直接影响 Tail - PCR 的结果。袁云香等^[15]报道,改良的 SDS 法提取的基因组 DNA 纯度及浓度较高,较之 CTAB 法、简易法及脲法效果更好。在试验中分别用 SDS 法、CTAB 法和不经酚仿抽提处理的简易法对材料进行了 DNA 的提取。结果显示,SDS 法与 CTAB 法获得的 DNA 作为模板,在 Tail - PCR 中均可进行良好扩增并得到清晰条带(图 1 - A,图 1 - B),而简易法获得的 DNA 由于纯度差、杂质多,在 Tail - PCR 中扩增大多出现弥散,不能很好地获得目的条带(图 1 - C)。



A 为以 SDS 法提取的 DNA 为模板进行 Tail - PCR 的扩增结果,B 为以 CTAB 法提取的 DNA 为模板进行 Tail - PCR 的扩增结果,C 为以简易法提取的 DNA 为模板进行 Tail - PCR 的扩增结果。M 为 Marker,从下到上分别为 100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1 000 bp、2 000 bp,最亮带为 750 bp。1、3、5、7 为第 2 轮扩增结果,2、4、6、8 为第 3 轮扩增结果,1、2 所用简并引物为 LAD1,3、4 所用简并引物为 LAD2,5、6 所用简并引物为 LAD3,7、8 所用简并引物为 LAD4

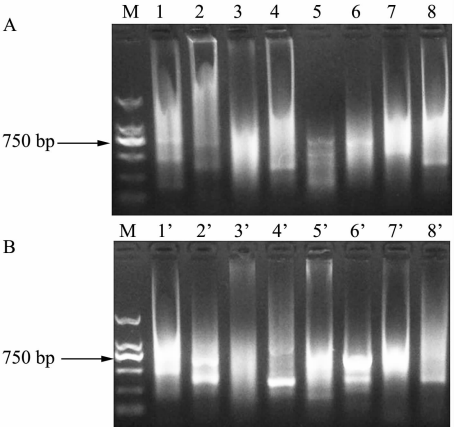
图 1 不同 DNA 提取方法的 Tail - PCR 电泳结果

2.2 扩增产物稀释程度对后续扩增结果的影响

Tail - PCR 需要设计 3 条特异引物并进行 3 轮扩增,第 1 轮扩增产物作为第 2 轮扩增的模板,第 2 轮扩增产物作为第 3 轮扩增的模板,经过 3 轮扩增得到逐渐富集的目的条带。由于每轮 PCR 均产生大量不同种产物,直接以这种产物作为模板会影响后续扩增的效果,所以在进行后 2 轮扩增时,需要对作为模板的前一轮扩增产物进行稀释,一般第 2 轮扩增会将第 1 轮扩增产物稀释 40 倍使用,第 3 轮扩增会将第 2 轮产物稀释 10 倍使用^[14]。研究发现,当后 2 轮扩增产物出现弥散时,适当增大模板的稀释倍数,可以增加条带出现率,更好地得到可供分析的扩增结果(图 2)。

2.3 酶对扩增结果的影响

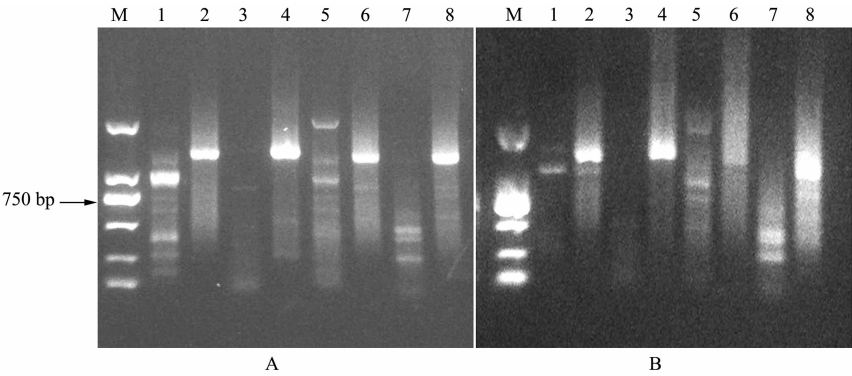
为了获得长片段扩增产物,经典的 Tail - PCR 的延伸时间一般为 3 min,在本试验中,很少得到大于 2 000 bp 的片段,为了排除酶活力不够对扩增产物的影响,用 LA Taq 酶代替普通的 Taq 酶,结果发现,LA Taq 酶并未获得更好的扩增结果(图 3),在



A 为常规比例稀释模板扩增结果,B 为扩大比例稀释模板(扩大 3 倍)后扩增结果。A 中 1、2 所用简并引物为 LAD1,3、4 所用简并引物为 LAD2,5、6 所用简并引物为 LAD3,7、8 所用简并引物为 LAD4,1、3、5、7 为第 2 轮扩增结果,2、4、6、8 为第 3 轮扩增结果。B 中 1'、2'所用简并引物为 LAD1,3'、4'所用简并引物为 LAD2,5'、6'所用简并引物为 LAD3,7'、8'所用简并引物为 LAD4,1'、3'、5'、7'为第 2 轮扩增结果,2'、4'、6'、8'为第 3 轮扩增结果。M 为 Marker

图 2 以不同稀释倍数 DNA 为模板进行扩增比较

多个株系的试验中没有发现该酶能获得比普通酶更长的扩增片段,反而增加了试验成本。



A 为以 LA Taq 进行 Tail-PCR 的扩增结果,B 为以普通 Taq 酶进行 Tail-PCR 的扩增结果。M 为 Marker,1、3、5、7 为第 2 轮扩增结果,2、4、6、8 为第 3 轮扩增结果,1、2 所用简并引物为 LAD1,3、4 所用简并引物为 LAD2,5、6 所用简并引物为 LAD3,7、8 所用简并引物为 LAD4

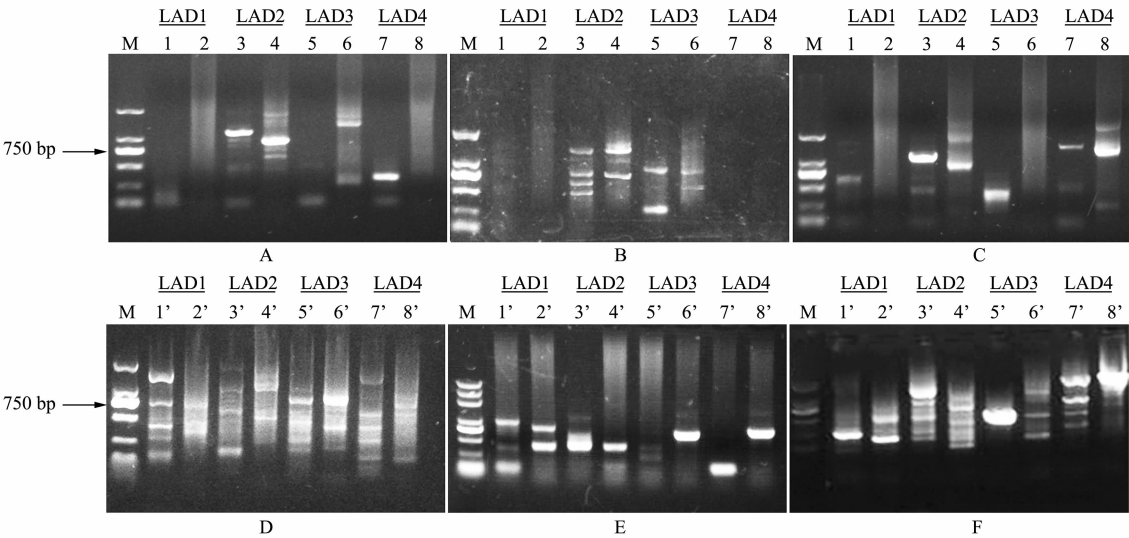
图 3 不同的酶对扩增效果的影响

2.4 混合简并引物对扩增结果的影响

Liu 等^[14]认为,在第 1 轮扩增中将 4 种简并引物混合可以在当轮扩增中获得更多的条带,从而达到更好的扩增效果,尽管最终产物中会出现小一些的片段,但是非特异扩增仍能够有效滤去。此外,对于多株系的分析,混合简并引物的方法可以在短时间内对大量株系进行分析鉴定,从而提高效率。本试验中,混合简并引物扩增并没有产生比分开引物扩增更多的条带,而混合引物后产物在同一泳道进行电泳,不利于大小一致的带准确分离。因此,在本试验中,仍采用 4 种简并引物分别扩增的方法。

2.5 简并引物结合偏好性分析

利用已报道的 4 种 LAD 简并引物进行 Tail-PCR 扩增^[14]。研究发现,简并引物与不同生物材料的 DNA 结合的偏好性不同。4 种简并引物中,LAD2 更易于与小麦基因组 DNA 结合。在选取的 3 个转基因小麦株系中,LAD2 引物均可在 Tail-PCR 的第 3 轮检测中得到扩增结果,而 LAD1 在 3 个材料中均未获得扩增条带(图 4-A,图 4-B,图 4-C)。针对旱稻材料,4 种 LAD 引物与旱稻基因组 DNA 结合偏好性无明显差异。在随机选取的 3 个转基因旱稻株系中,LAD1、LAD2、LAD3、LAD4 四种简并引物均可与旱稻基因组结合并在 3 轮 PCR 中获得扩增结果(图 4-D,图 4-E,图 4-F)。



A、B、C 为 3 个转基因小麦株系 Tail-PCR 结果,D、E、F 为 3 个转基因旱稻株系 Tail-PCR 结果。A、B、C 中,1、2 所用简并引物为 LAD1,3、4 所用简并引物为 LAD2,5、6 所用简并引物为 LAD3,7、8 所用简并引物为 LAD4,1、3、5、7 为第 2 轮扩增结果,2、4、6、8 为第 3 轮扩增结果。D、E、F 中,1'、2'所用简并引物为 LAD1,3'、4'所用简并引物为 LAD2,5'、6'所用简并引物为 LAD3,7'、8'所用简并引物为 LAD4,1'、3'、5'、7'为第 2 轮扩增结果,2'、4'、6'、8'为第 3 轮扩增结果。M 为 Marker

图 4 4 种简并引物与小麦、旱稻 DNA 结合偏好性比较

3 结论与讨论

Tail-PCR 是一种用来分离与已知序列邻近的未知 DNA 序列的分子生物学技术,试验结果的好坏与模板质量、引物特异性、物种、已知序列特征、试验条件等诸多因素有关。本研究以转基因早稻为材料,对 Tail-PCR 方法进行了分析优化,包括 DNA 样品质量、扩增产物稀释程度、酶的种类、简并引物组合方式、引物结合偏好性等。优化后的 Tail-PCR 技术结果稳定,重复性好,可以准确地获得转基因早稻的插入位点的旁侧序列。

传统 Tail-PCR 延伸时间为 3 min^[14],在本试验中,3 轮扩增后电泳检测,很少出现大于 2 000 bp 的条带,换用 LA 酶后仍然如此。因此,为了缩短整个 PCR 的流程,将程序中的延伸时间都缩短到 2.5 min。最终得到的片段虽然不长,但是已经可以准确地对外源基因的插入位点进行分析。

Tail-PCR 中,需要设计 3 条特异引物,如果 3 条中的任意一条出现问题,会导致整个试验的失败。在进行特异引物的设计时,同时设计了 4 条引物,每条引物间距离控制在 50 ~ 150 bp,退火温度均为 60 ~ 65 ℃。进行 PCR 时,不同的特异引物组合会出现不同的扩增结果(即从 4 条中选 3 条扩增,可有多种选择),从而更易于得到不同转基因株系的侧翼序列。

Tail-PCR 由于采用了简并引物,因此会出现非特异扩增,而非特异扩增由于是随机出现,所以一般不具备可重复性。试验中可以通过重复扩增来检验条带是否为特异结果。同时,由于过于短小的片段测序后得不到充分的信息,所以,在回收条带的选择上应不小于 500 bp。

参考文献:

[1] Liu Y G, Whittier R F. Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from Pl and YAC clones for chromosome walking[J]. *Genomics*, 1995, 28(3): 457-463.

[2] 郑岑,张立平,唐忠辉,等. Tail-PCR 技术及其在植物基因中的克隆[J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(3): 544-548.

[3] 仇艳光,田景汉,葛荣朝,等. Tail-PCR 的改良及其在分离小麦基因启动子中的应用[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(4): 695-699.

[4] 陈笑芸,汪小福,刘仁虎,等. 不同 Tail-PCR 通用引物在转基因大豆、水稻、油菜侧翼序列分离中的应用评价[J]. *核农学报*, 2013, 27(7): 922-928.

[5] 林春燕,郭婧,赵广荣. 热不对称交错 PCR 克隆 *bapt* 基因侧翼序列[J]. *化学工业与工程*, 2015, 32(1): 59-63.

[6] 张亚敏,杨晶,王爱英,等. 天山雪莲 *rbcS* 基因启动子的克隆及序列分析[J]. *西北农业学报*, 2014, 23(5): 146-152.

[7] 梁成真,张锐,孙国清,等. 优化 Tail-PCR 方法克隆棉花抗逆相关转录因子编码基因[J]. *棉花学报*, 2010, 22(3): 195-201.

[8] 田蕾,郭妍君,任丽,等. 利用 TAIL-PCR 技术分析拟南芥 *Atlg52910* 突变体插入位点的侧翼序列[J]. *中国野生植物资源*, 2016, 35(4): 23-25.

[9] 李朝炜,冯丹,翟会青,等. 农杆菌介导的早稻遗传转化主要影响因素[J]. *湖北农业科学*, 2014, 53(15): 3482-3487.

[10] 李朝炜,刘颖,朱昀,等. 早稻成熟胚愈伤组织诱导的影响因素[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(2): 52-54.

[11] 刘青,李朝炜,朱昀,等. 抗逆转基因早稻转化体系的优化[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(11): 42-45.

[12] 邢文岳,苏乐乐,李朝炜,等. 地高辛标记对早稻进行 Southern 杂交分析主要影响因素的优化和验证[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(8): 41-43.

[13] 陈昆松,李方,徐昌杰,等. 改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 大量提取[J]. *遗传*, 2004, 26(4): 529-531.

[14] Liu Y G, Chen Y L. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences[J]. *BioTechniques*, 2007, 43(5): 649-656.

[15] 袁云香,孙丙耀. 适于 Tail-PCR 模板的水稻基因组 DNA 提取方法的优化[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(9): 3964-3966.