

高效热不对称交互式 PCR 技术克隆地黄基因

周延清¹,王婉坤¹,张 喻¹,李静云¹,陈娟娟¹,苑璐璐²,魏 俊¹

(1.河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007;2.周口市科学技术局,河南 周口 466000)

摘 要:利用高效热不对称交互式 PCR (hiTAIL-PCR) 技术从地黄基因组中扩增出 3 个 DNA 片段,经过电泳检测、回收、纯化和测序获得 2 个片段的碱基序列. 其中一个由 578 个 bp 组成,包含一个 453 bp 的开放阅读框 (ORF),编码 151 个氨基酸,与一些已知纤维素合酶基因在 DNA 水平和氨基酸水平的同源性分别高达 81%~91% 和 83%~99%,而且推测蛋白质具有纤维素合酶的结构域;另一个由 385 个 bp 组成,没有 ORF,不编码蛋白质,但是,预测其包含启动子元件. 这些结果表明使用 hiTAIL-PCR 技术可以克隆地黄基因,克隆的基因将为地黄基因分子作用机制和分子育种研究奠定基础.

关键词:地黄;高效热不对称交互式 PCR 技术;基因克隆;启动子

中图分类号:Q754

文献标志码:A

地黄是一种玄参科地黄属多年生草本植物,分布于中国、韩国和日本等地^[1]. 在中国,地黄分布于河南、山东、山西和陕西等地. 地黄块根是大宗常用中药材之一,具有重要药用价值、保健作用和经济价值^[2]. 随着分子生物学,尤其是基因组学的发展,地黄分子生物学研究也得到了很大发展,其中,地黄基因克隆也取得了可喜成绩. 例如,用 RT-PCR 方法扩增地黄肌动蛋白基因片段^[3],用 SSH 方法克隆了地黄块根中 *RgPR-10* 基因^[4-5],用 PCR 技术克隆了怀地黄基因片段及其中转座酶基因^[6],用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆怀地黄 *RgVP* 和 *RgKAT* 基因^[7],用转录组测序技术克隆地黄代谢产物合成基因^[8]. 但尚未见用 hiTAIL-PCR 技术克隆地黄基因的报道. 本研究用 hi-TAIL-PCR^[9] 技术克隆地黄基因,探索地黄基因克隆新方法,为地黄基因分子作用机制和分子育种研究奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料

怀地黄 85-5 种植于河南师范大学生命科学学院本实验室实验田,取其新鲜块根用于提取 DNA. 大肠杆菌 DH5 α 菌株由本实验室保存,DNA 凝胶回收试剂盒购于上海生物工程有限公司,*Taq* DNA 聚合酶、DNA Marker 购于北京全式金生物技术有限公司、克隆载体 pMD19-T Vector 购于 TaKaRa 公司,引物合成和基因测序分别由北京华大基因有限公司和上海生工生物工程技术服务有限公司完成,其他药品与试剂为国产 AR 级或进口分装 AR 级产品.

1.2 方法

1.2.1 地黄基因组 DNA 的提取 用 CTAB 法提取地黄基因组 DNA,用紫外分析法和琼脂糖凝胶电泳方法检测基因组 DNA 的纯度、大小和浓度.

1.2.2 引物设计与合成 根据地黄 B12D 蛋白基因(登录号为 JX290370)与黄瓜(登录号为 XP004152455)、番茄(登录号为 XP004232259)、葡萄(登录号为 XP002283743)、杨毛果(登录号为 XP002318014)、茶树(登录号为 AEC10990)等植物的 B12D 蛋白的 ORF 氨基酸序列在 CLUSTAL 2.1 软件

收稿日期:2014-09-29

基金项目:河南省基础与前沿技术研究计划项目(092300410009);河南省教育厅科学技术研究重点项目(14B180028);国家大学生创新创业训练计划项目(201310476102).

作者简介:周延清(1963-),男,河南邓州人,河南师范大学教授,博士,主要从事遗传学研究,E-mail: yqzhou@htu. cn.

中进行多重比对,找到其功能保守序列,利用 Premier5.0 软件设计 3 条下游特异引物,采用文献^[9]中的上游非特异性引物(表 1)。

表 1 引物名称及其序列

引物名称	引物序列
RH1	5'-GGTGAAGAAGCTATTAAGGGACGGCATG-3'
RH2	5'-GCAAAGTCATCCAACACACCAGCAGC-3'
RH3	5'-CACCAACGGCAGCGAACAAGGATACA-3'
LAD1	5'-ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVN>NNNNGGAA-3'
LAD2	5'-ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBNBNNNNGGTT-3'
LAD3	5'-ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBDBNBNNNCCAA-3'
LAD4	5'-ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBDBNBNNNCGGT-3'
AC	5'-ACGATGGACTCCAGAG-3'

1.2.3 hiTAIL-PCR 反应及检测 根据刘耀光的 hiTAIL-PCR 程序^[9]略作改进。以怀地黄基因组 DNA 为模板,RH1 分别与简并引物 LAD1~4 分别配对,进行第 1 轮 PCR 反应。反应液组分见表 2,混匀后进行 PCR,程序如下:第一轮,93 °C 热启动 2 min;95 °C 预变性 1 min;94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 1 min;72 °C 延伸 3 min,10 个循环;94 °C 变性 30 s,25 °C 退火 2 min,以 0.5 °C·s⁻¹ 的速度升温至 72 °C,延伸 3 min;94 °C 变性 20 s,58 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 3 min,25 个循环;72 °C 延伸 5 min。将第 1 轮 PCR 反应产物稀释 10 倍,以此为模板标记为 L1,L2,L3,L4,引物 RH2 与 AC1 配对,进行第 2 轮 PCR 反应。反应液组分见表 2,混匀后进行 PCR,程序如下:94 °C 变性 20 s,65 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 3 min,2 个循环;94 °C 变性 20 s,68 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 3 min,94 °C 变性 20 s,50 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 3 min,13 个循环;72 °C 延伸 5 min。将第 2 轮 PCR 反应产物稀释 10 倍,并以此为模板标记为 R1,R2,R3,R4,引物 RH3 与 AC1 配对,进行第 3 轮 PCR 反应。反应液组分见表 2,混匀后进行 PCR,程序如下:94 °C 变性 20 s,68 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 3 min,94 °C 变性 20 s,68 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 3 min,94 °C 变性 20 s,50 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 3 min,7 个循环;72 °C 延伸 10 min。反应结束后,取第 3 次 PCR 反应产物 8 μL,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.2.4 基因片段的克隆测序 回收的目的片段按照 TaKaRa 公司的载体(pMD19-T)试剂盒中的说明书,进行连接反应。其中连接液为 5 μL,载体为 0.5 μL,回收 DNA 的量为 4.5 μL,一共 10 μL,16 °C 连接过夜。取 10 μL 连接产物转化 CaCl₂ 法制备的大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,取细胞悬浮液涂布于含 Amp 的 LB 琼脂平板培养基,37 °C 倒置培养过夜,筛选阳性菌落,进行菌液 PCR 扩增检测。把 PCR 法检测所得的阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司测序。

表 2 hiTAIL-PCR 反应组分

反应成分	第 1 轮反应用量/μL	第 2 轮反应用量/μL	第 3 轮反应用量/μL
模板	1.0	1.0	1.0
dNTP 预混物(各 2.5 mmol/L)	4.0	4.0	2.0
10×LA PCR 缓冲液(加入 Mg ²⁺)	2.0	2.5	2.5
TaKaRa LA Taq (5 U/μL)	0.5	0.6	0.5
AD 引物(100 pmol/μL)	1.0	0.3	0.6
SP 引物(10 pmol/μL)	0.3	0.3	0.6
水	11.2	16.3	17.8

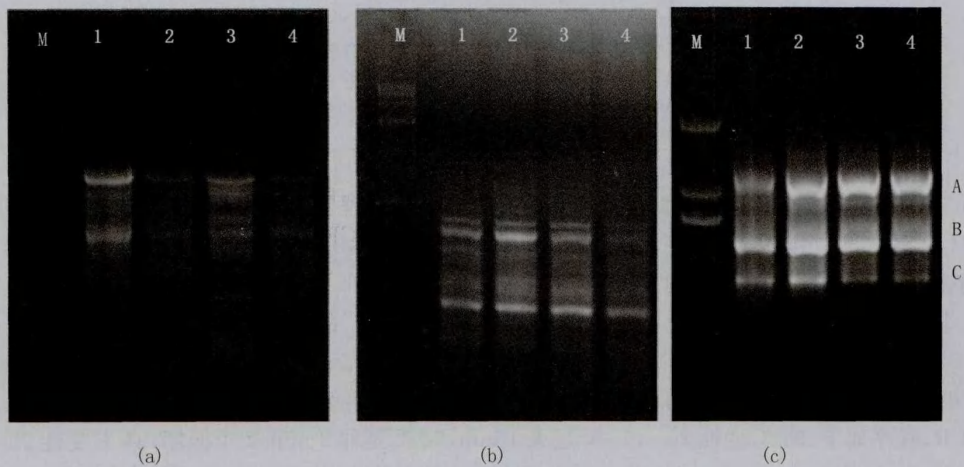
1.3 基因片段的生物信息学分析

在美国国立生物技术信息中心(NCBI)网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上运用 BLAST 软件进行目的基因片段的同源性搜索,分析其相似的同源基因,进行同源性比较。用 MEGA5 进行系统进化树的分析。通过 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)预测氨基酸的保守域^[10]。用 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)和 PLACE(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalup.html>)分析其启动子元件。

2 结果与分析

2.1 hiTAIL-PCR 扩增地黄基因组 DNA 及其产物电泳

用 CTAB 法提取地黄基因组 DNA,经紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳方法分析符合后续试验要求后,用作模板,进行 hiTAIL-PCR,其产物电泳结果如图 1.



(a) 第一轮 PCR 扩增结果; (b) 第二轮 PCR 扩增结果; (c) 第三轮 PCR 扩增结果

图 1 hiTAIL-PCR 产物的电泳检测

2.2 地黄基因组 DNA 片段的回收、克隆与测序

用试剂盒回收图 1c 中 3 个 DNA 片段,分别克隆至 pMD19-T 载体,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆,送上海生工生物工程技术有限公司测序,A 片段大约 1 100 bp,未克隆成功,没有获得序列,B 片段 578 bp(图 2),C 片段 385 bp(图 3).

```

1  acgatggactccagagcgccgctagggaacagcatctatgtcgacaagccgtgatcg
63  ccggcctgcaaccgccaccttcgcaagcttcctggccagcgaagcctggggcagggc
125 ATGATGCAGATTCTGATCTTCCGTCAGCCGCTGTTCCGGCGCGGTCTCTCGTTT
1  M M Q I L I F R Q P L F R R G L S F
179 ACGCAGCGTCTCTGCTACATGTCATCGAOCGCTGTTCTGGCTTTTTCGGTTTCCG
19  T Q R L C Y M S S T L F W L F P F P
233 CGCAGCATCTTCCCTGTTCCGCGCCGCTGTTCTACCTGTTCTTCGACCTGCAGATT
37  R T I F L F A P L F Y L F F D L Q I
287 TTCGTGGCCTCCGGCGGCGAGTTCCCTGGCCTATACGGCGGCTATATGCTCGTG
55  F V A S G G E F L A Y T A A Y M L V
341 AACCTGATGATGCAGAACTATCTCTATGGCAGCTTCCGCTGGCCATGGATTCTT
73  N L M M Q N Y L Y G S F R W P W I S
395 GAGCTTTACGAATATGTGCAGACGGTTCACTTCTGCGGCGGTTGGTTTCCGGTG
91  E L Y E Y V Q T V E L L P A V V S V
449 ATCTTCAACCCCGCAAGCCCACTTCAAGGTGACGGCGAAGGATGAATCCATT
109 I F N P G K P T F K V T A K D E S I
503 GCGGAGGCGCGGCTTTUGGAAATCAGCCGGCCGTTCTTUGTCATCTTUGCGCTG
127 A E A R L S E I S R P F F V I F A L
557 CTGGTGTGTTGGATGACTTTGC
145 L V C W M T L X

```

大写字母为编码区;上面为核苷酸序列,下面为氨基酸序列

图 2 BDNA 片段的碱基序列及其编码蛋白质的氨基酸序列

ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCGGGCGTGGAATTAAGGT
 AC-primer
TTAGCTTCTTGTGTGTTGTTGTTTAGGTTGATAGAGAATA

CAAGGTCATATAAATAGTAATCATTACAGGCCATTAAGGATG
 Skn-1 motif TATA-box HD-Zip3
CATCATATCATATCATATGAACCAATCACTGATTCACATAAC
 I-box
ATGGTACTTTCCTTGCATTCAITTCATATGACAGAATGAAATAT
 CATT-inotif
TTGGCAGTIAATTTCTTTCTGTCATATTTCTTTTGTTCACCTT
 S1m-1 motif chs-CMA2s
GATCTTGAACCGAAGTAATGATTTTCATAACTTTTCTTTATAAA
 HD-Zip 3 TATA-box
ATGTCAACGTAAATGTTGAACCTTATACGTCATTTGCGGAAT
 TATA-box
GTAGGGTGACTAAGGAAAAACAGAGCTGCTGGTGTGTTGG
 GARE-motif Sp2-primer
ATGACTTTGC

图 3 C DNA 片段的碱基序列及其中启动子元件分析

2.3 地黄 DNA 片段的生物信息学分析

利用 ORF Finder 分析,发现(1)B DNA 片段含有 453 bp 开放阅读框,推导其编码 151 个氨基酸(图 2)。预测其编码蛋白质分子量约为 1.8 kDa,等电点为 9.00,摩尔消光系数为 34 045,不稳定系数为 49.51,为略碱性的不稳定蛋白质。(2)C DNA 片段中没有 ORF,不编码蛋白质。但是,其类似启动子序列含有 3 处 TATA box,两处蛋白结合位点 HD-Zip 3,1 处光反应元件 CATT-motif,光响应要素 chs-CMA2a,防卫和胁迫响应元件(TC-rich repeats)、赤霉素响应元件 GARE-motif,2 处胚乳表达所需的顺式调控元件 Skn-1-motif 和参与光合作用基因的光调节表达以及叶片特异性表达的 I-box(图 3)。

2.4 多序列比对与系统进化树分析

将测序所得的序列在 BioXM2.6 软件上预测其开放阅读框并翻译相对应的蛋白序列,将该基因的蛋白序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析,其碱基序列及其编码的蛋白质氨基酸序列与已知的 10 个物种的纤维素合酶基因及其编码蛋白质的氨基酸序列高度同源(表 3)。用软件 MEGA5^[15]构建的系统进化树(图 4)表明,其与根瘤农杆菌的亲缘关系最近。

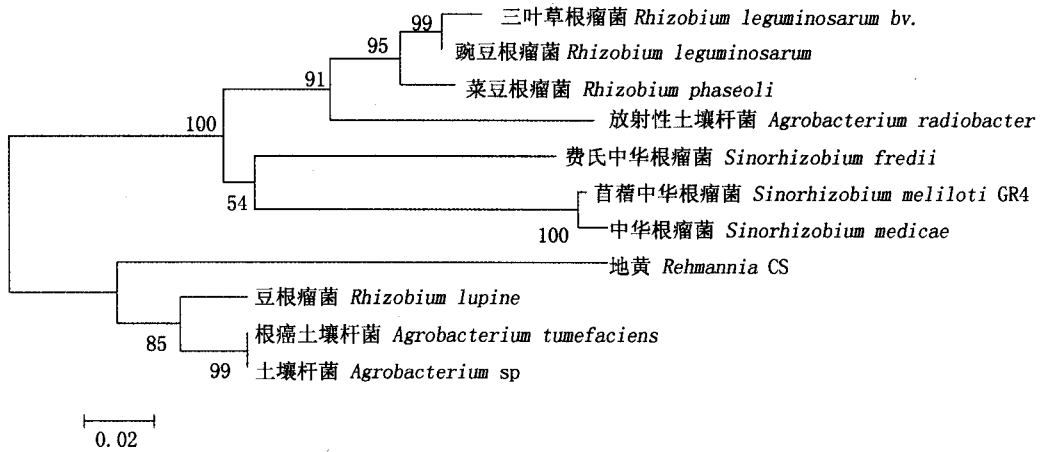
表 3 地黄与其他物种纤维素合酶的同源性比较

物种	GenBank 登录号	氨基酸同源性/%	核苷酸同源性/%
根瘤土壤杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	WP_003506371.1	99	91
土壤杆菌 <i>Agrobacterium sp</i>	WP_020011862.1	99	91
豆根瘤菌 <i>Rhizobium lupine</i>	WP_006698566.1	97	—
菜豆根瘤菌 <i>Rhizobium phaseoli</i>	WP_016734164.1	88	—
豌豆根瘤菌 <i>Rhizobium leguminosarum</i>	WP_003578482.1	88	—
三叶草根瘤菌 <i>Rhizobium leguminosarum bv.</i>	YP_002975124.1	87	—
费氏中华根瘤菌 <i>Sinorhizobium fredii</i>	YP_005192181.1	86	—
苜蓿中华根瘤菌 <i>Sinorhizobium meliloti</i>	YP_007193525.1	85	—
中华根瘤菌 <i>Sinorhizobium medicae</i>	WP_018010495.1	84	—
放射形土壤杆菌 <i>Agrobacterium radiobacter</i>	YP_002542489.1	83	81

注:—表示未有核苷酸同源性

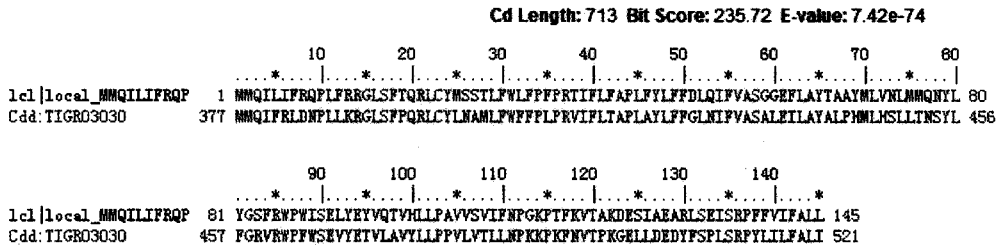
2.5 氨基酸保守域的预测

在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)预测该氨基酸的保守域,检测其含有纤维素合酶催化亚单位(UDP-forming)的保守域(如图 5)。



Rehmannia CS 是地黄纤维素合酶基因

图4 基于 Neighbor-Joining 法构建地黄和其他物种纤维素合酶氨基酸序列的系统进化树



Cdd:TTGR03030 为纤维素合酶催化亚单位的保守域

图5 怀地黄纤维素合酶保守区预测

3 讨论

hiTAIL-PCR 是 Liu 等^[9]为获得较长特异性产物而提出的,扩增已知序列旁邻的未知 DNA 序列的高效 TAIL-PCR 方法,结合利用 TAIL-PCR 和抑制 PCR 的原理.通过 hiTAIL-PCR 扩增的序列,非特异性条带少、扩增得到的片段较长、扩增效率高,同时该方法简单高效、灵敏度高、安全、降低了实验过程中的人为因素,近年来逐步成为克隆未知序列的一种常用方法并广泛应用于动植物、微生物基因克隆.马婧等^[11]利用 hiTAIL-PCR 法得到了 2 个蜡梅非特异性脂转移蛋白基因家族成员 *cpLTP3* 和 *cpLTP4* 翻译起始位点上游启动子序列;张亚敏等^[12]以天山雪莲为材料选用 TAIL-PCR 及 hiTAIL-PCR 的方法克隆 *rbcS* 基因的启动子并分析其顺式作用元件为天山雪莲基因的调控机制研究奠定基础;李莉等^[13]采用 hiTAIL-PCR 方法,对转基因猪外源基因在猪基因组中的整合位点进行研究,有效、快捷的鉴定外源基因在基因组中整合的具体位置;周莉莉等^[14]使用 hiTAIL-PCR 从海单胞菌中克隆 β-半乳糖苷酶基因.

但是,迄今,未见该技术用于地黄基因克隆的报道.本次研究 hiTAIL-PCR 技术从地黄基因组 DNA 中扩增出了 3 个片段,其中包括预测具有纤维素合酶作用的基因和含有启动子元件的基因.因此,我们首次 hiTAIL-PCR 技术从地黄中分离克隆了基因,表明该技术是克隆地黄基因的行之有效的技术,由其克隆的地黄基因为地黄基因分子作用机制和分子育种研究奠定基础.

参 考 文 献

[1] Young S K, Jin A R, Byoung S K. Discrimination of Korean *Rehmannia glutinosa* from Chinese *Rehmannia glutinosa* using sequence-characterized amplified region marker [J]. Korean Soc Appl Biol Chem, 2012, 55: 1-6.

[2] Yang Y H, Chen X J, Chen J Y, et al. Differential miRNA expression in *Rehmannia glutinosa* plants subjected to continuous cropping [J].

BMC Plant Biology, 2011, (11): 53-56.

- [3] 孙 鹏,郭玉海,祁建军,等. 地黄肌动蛋白基因片段的克隆与序列分析[J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (20): 8470-8471, 8474.
- [4] Peng S, Guo Y H, Qi J J, et al. Isolation and expression analysis of tuberous root development related genes in *Rehmannia glutinosa* [J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37(2): 1069-1079.
- [5] 孙 鹏,郭玉海,祁建军,等. 地黄 RgPR-10 基因的克隆与表达[J]. 西北农业学报, 2009, 18(1): 300-304.
- [6] 周延清,姚焕灵,段红英,等. 怀地黄基因片段及其中转座酶基因的克隆与序列分析[J]. 河南农业科学, 2012, 41(1): 106-109.
- [7] 周延清,张永华,陈艳梅,等. 怀地黄液泡质子泵焦磷酸水解酶基因的克隆与生物信息学分析[J]. 河南农业科学, 2013, 42(3): 107-111.
- [8] 孙 鹏,周丽莉,李先恩. 转录组分析生物合成相关基因及萜类挖掘地黄环烯醚萜[EB/OL]. [2012-07-09]. <http://www.paper.edu.cn>.
- [9] Liu Y G, Chen Y L. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences[J]. Biol Techniques, 2007, 43: 649-650.
- [10] 周延清,张永华,张 喻,等. 怀地黄 3-酮酯酰 CoA-硫解酶基因的克隆、序列特征和时空表达分析[J]. 中草药, 2013, 44(1): 84-92.
- [11] 马 婧,刘 群,王晓斌,等. 2 个蜡梅 nsLTP 基因启动子的克隆及其在烟草中的瞬时表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(4): 601-608.
- [12] 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.
- [13] 李 莉,李小平,任林柱,等. hiTAIL-PCR 技术鉴定转基因猪整合位点的研究[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(9): 1235-1238.
- [14] 周莉莉,陈瑞琴,陈秀兰,等. 应用 hiTAIL-PCR 技术克隆 *Marinomonas* sp. BSi20584 菌株 β -半乳糖苷酶基因[J]. 极地研究, 2013, 25 (3): 249-256.

Gene Cloning of *Rehmannia glutinosa* by High-efficient Thermal Asymmetric Interlaced PCR

ZHOU Yanqing¹, WANG Wanshen¹, ZHANG Yu¹, LI Jingyun¹,
CHEN Juanjuan¹, YUAN Lulu², WEI Jun¹

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xixiang 453007, China;

2. Zhoukou City Academy of Agricultural Sciences, Zhoukou 466000, China)

Abstract: High-efficient thermal asymmetric interlaced PCR (hiTAIL-PCR) was used to clone genes from *Rehmannia glutinosa* genomic DNA. Three DNA amplified fragments were separated on agarose gel, extracted, purified, cloned and sequenced. One DNA fragment is composed of 578 bp, while another is 385bp. Bioinformatics Analyses showed that the former contained a 453 bp open reading frame (ORF), encoding a deduced protein of 151 amino acid residues, which had a high homology of 81%–91% and 83%–99% to some known cellulose synthase genes at the DNA level and the amino acid level, respectively, and that its deduced protein is characteristic of the structure domain of other organisms cellulose synthases; that the latter did not have any homology to any known genes at the DNA level and the amino acid level, respectively, and did not contain any ORF but some promoters elements. These results indicated that hiTAIL-PCR is an efficient gene cloning technique from *Rehmannia glutinosa*, by which the genes were cloned and will lay a foundation for the further study of its molecular functional mechanism and its application in *Rehmannia glutinosa* molecular breeding in future.

Keywords: *Rehmannia glutinosa*; high-efficient thermal asymmetric interlaced PCR; gene cloning; promoter