

简报

# 用 PCR 方法扩增深红红螺菌的 draT 基因

何路红 阎大来 李季伦

(北京农业大学农业生物技术国家重点实验室,北京 100094)

聚合酶链反应<sup>(1)</sup>是最近几年分子生物学领域中一项重大的技术突破。典型的 PCR 引物内应含 50% G+C,且没有自身互补序列,特别是在其 3'-末端不应有内部二级结构。引物与靶 DNA 的退火温度一般为 50℃,但当已有的引物不太符合要求时,就要调整退火温度。本文报道了用 PCR 方法扩增深红红螺菌 draT 基因,介绍了当引物 GC 含量较低时,可采用适当降低退火温度,然后梯度升温的方法获得 PCR 产物。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及模板 DNA 的制备

深红红螺菌(ATCC11170)由北京农业大学生物学院微生物专业固氮研究室提供。该菌总 DNA 的提取,纯化参照 Robert<sup>(2)</sup>等人的方法。

### 1.2 引物

DNA 寡核苷酸引物由北京农业大学农业生物技术国家重点实验室 DNA 合成室合成,核苷酸序列的设计参照 Fitzmaurice<sup>(3)</sup>发表的红螺菌 draT/G 序列,共两对,分别是:

第一对:引物 1 5' AAAGGATCCCGAACAGCAGGACCAC 3'  
+231 +252

引物 2 5' GGGGTCGACTGGTCAGCAGCGTATTGA 3'  
+760 +740

第二对:引物 3 5' TTGAAGGACATGGGGGAAGACAG 3'  
0 +23

引物 4 5' CACCTTAAGTACTGGTT 3'  
+958 +941

引物1和引物2的5'端分别带有人工设计的酶切位点(BamHI 和 SalI 位点)及保护性碱基;引物序列下面的数字表示该段序列在 draT 基因中的位置;引物2、4分别为互补链序列。

### 1.3 PCR 方法

PCR 中所用试剂的浓度、配方见文献[4],Taq DNA 聚合酶为 NEB 产品;PCR 仪为 HYBAID THERMAL REACTOR;PCR 程序据文献[4]修改。

### 1.4 斑点杂交

PCR 产物经氯仿抽提,乙醇沉淀纯化后溶于 TE(10mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,1mmol/L EDTA)中,然后分别用 Biotin-11-dUTP 按随机引物法标记<sup>(5)</sup>,并进行斑点杂交试验<sup>(6)</sup>。

本文于 1992 年 7 月 31 日收到。

## 2 结果与讨论

### 2.1 用第一对引物扩增 draT 基因片段

与 Fitzmaurice 的 draT 基因序列对照可知,由第一对引物扩增的 PCR 产物应为 541bp,由于这对引物的 G+C 含量,内部结构及核苷酸长度均符合典型 PCR 引物的要求,因此用 PCR 标准程序很容易获得所需片段。本实验所用的 PCR 程序为 94℃ 变性 1 分钟,50℃ 退火 2 分钟,72℃ 引物延伸 3 分钟,30 次循环。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测与预期结果完全相符(见图 1),经酶切鉴定,证实为 draT 片段(称为 PCR 产物 1)。

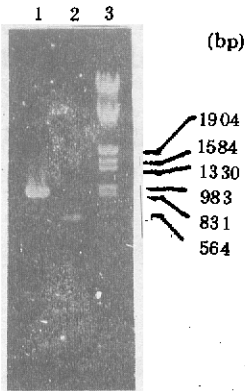


图 1 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

1. PCR product 2; 2. PCR product 1;
3.  $\lambda$ DNA digested by Hind III + EcoR I

### 2.2 用第二对引物扩增 draT 全基因

用第一对引物扩增的 draT 片段只有 541bp(其中含 11bp 的人工序列),为了扩增出 draT 全基因(958bp),我们又设计了第二对引物,但是应用上述的 PCR 程序没有扩增出 draT 基因。分析原因后发现,引物 4 较短(只有 17bp),且 G+C 含量偏低(40%),根据人工寡核苷酸解链温度公式  $T_D^{\circ}C = 4(G+C) + 2(A+T)^{[9]}$  计算得出:引物 4 的解链温度  $T_D^{\circ}C = 48^{\circ}C$ ,标准程序中退火温度一般为 50—55℃,此时引物 4 不能与模板 DNA 配对结合,这可能是用该对引物按标准反应不能得到 PCR 产物的主要原因。为此,我们设计了新的 PCR 程序:适当降低退火温度,采用梯度升温方式,即退火温度由标准程序的 50℃ 2 分钟,改为 37℃、45℃、55℃ 各 40 秒。结果得到所需的 PCR 产物(称为 PCR 产物 2),琼脂糖凝胶电泳鉴定符合要求(图 1),此时,虽有非特异

PCR 产物出现,但主要的产物为预期产物,将其回收纯化后,用 Sac III 酶切得到 487bp 和 570bp 两个片段,与文献[2]报道的 draT 基因序列分析结果一致,用 Ava I 酶切得到的片段也与之相符。

在实验中,我们曾经将最初退火温度降至 30℃,结果表明这样得到的非特异性 PCR 产物明显增多,不宜采用。

上述适当降低退火温度的方法不仅适用于 G+C 含量偏低的产物,也适用于引物与模板 DNA 不完全配对的 PCR 要求<sup>[9]</sup>,对于由蛋白质的氨基酸序列推导合成的寡核苷酸引物,由于密码子简并现象的存在,用标准程序不能得到所需 PCR 产物,则可试用上述方法。当然如果引物与模板 DNA 的同源性太低,如巴西固氮螺菌的 draT 基因与红螺菌 draT 的核苷酸序列有 69.4% 同源性<sup>[9]</sup>,上述引物 3 与巴西固氮螺菌 draT 基因相应区域相差太大,只有 40% 配对,在这种条件下,即使将退火温度降至 30℃,仍不能得到巴西固氮螺菌 draT 基因(本实验室未发表资

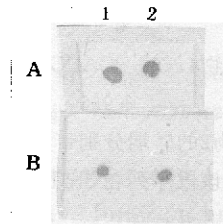


图 2 斑点杂交结果

Fig. 2 The result of Dot-blot

- A1, B1: PCR product 1; A2, B2: PCR product 2;
- A. Hybridized with Biotin-PCR product 1;
- B. Hybridized with Biotin-PCR product 2

料),这点在使用本程序时应予注意。

### 2.3 斑点杂交

用第二对引物扩增时退火温度较低,非特异性 PCR 产物出现,为了进一步确证所得 PCR 产物为 draT 基因,我们分别将由两对引物得到的 PCR 产物纯化,并用 Biotin-11-dUTP 标记,制成探针,相互进行斑点杂交试验,结果(见图2)表明由第二对引物扩增的 PCR 产物确为 draT 基因。draT 基因的获得为在国内开展固氮活性调控的研究提供了实验材料。

## 参 考 文 献

- [1] Mullis K F *et al.* *Methods Enzymol*, 1987, **155**:335.
- [2] Robert R L *et al.* *Recombinant DNA Techniques*, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. 1983, p45.
- [3] Fitzmaurice W P *et al.* *MGG*, 1989, **218**:340—347.
- [4] Sambrook J *et al.* *Molecular Cloning 2nd.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p14—16.
- [5] 何路红等. *微生物学通报*, 1992, **19**(4):241—245.
- [6] 何路红,李季伦. *微生物学报*, 1991, **31**(1):255—260.
- [7] 吴冠芸等. *基因诊断*, 北京:人民卫生出版社, 1988, p. 175.
- [8] 阎大米,李季伦. *微生物学报*, 1992, **32**(5):309—313.
- [9] Zhang Y P *et al.* *J Bacterial*, 1992, **174**(10):3364—3369.

## Amplification of draT Gene of *Rhodospirillum rubrum* by PCR Method

He Luhong Yan Dalai Li Jilun

(National Laboratories for Agrobiotechnology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

**Abstract** draT gene of *Rhodospirillum rubrum* was amplified by PCR with different primers. When G+C content of the primer is lower, the products of PCR can be obtained by changing the annealing temperature from 50°C for 2 minutes to 37°C, 45°C, 50°C for 40 seconds each. The results of Dot-blot hybridization showed that the product of PCR is draT gene.

**Key words** *Rhodospirillum*, draT gene, PCR primer, Dot-blot