

优化的反向 PCR 结合 TAIL-PCR 法克隆棉花线粒体 *atpA* 双拷贝基因及其侧翼序列

张晓^{1,2}, 张锐¹, 孙国清¹, 史计¹, 孟志刚¹, 周焘¹, 侯思宇¹, 梁成真¹,
于源华², 郭三堆¹

1 中国农业科学院生物技术研究所 国家农作物基因资源与遗传改良重大科学工程, 北京 100081

2 长春理工大学生命科学技术学院, 吉林 长春 130022

张晓, 张锐, 孙国清, 等. 优化的反向 PCR 结合 TAIL-PCR 法克隆棉花线粒体 *atpA* 双拷贝基因及其侧翼序列. 生物工程学报, 2012, 28(1): 104-115.

Zhang X, Zhang R, Sun GQ, et al. High efficiency genome walking method for flanking sequences of cotton mitochondrial double-copy *atpA* gene based on optimized inverse PCR and TAIL-PCR. Chin J Biotech, 2012, 28(1): 104-115.

摘要: 双拷贝基因及其侧翼序列的克隆是分子生物学中的一个难点。将优化的反向 PCR (Inverse PCR, iPCR) 与 TAIL-PCR 相结合, 有效地克隆双拷贝基因及其侧翼序列。先用 Southern blotting 方法确定一种能获得合适长度片段的限制性内切酶, 然后用优化的 iPCR 方法对该酶切产物进行自连和扩增, 将 2 个拷贝的侧翼序列区分开。根据 iPCR 结果, 进一步用 TAIL-PCR 扩增更远侧翼的序列。利用这套方法, 获得了棉花可育胞质和不育胞质线粒体双拷贝 *atpA* 基因的所有 *EcoR* I 限制片段 (2.2~5.1 kb) 和 *Hind* III 限制片段 (8.5~11.7 kb), 克隆到 2 个拷贝各自的侧翼序列。研究结果说明, 优化的 iPCR 与 TAIL-PCR 相结合是克隆双拷贝基因及其侧翼序列的一种高效方法。

关键词: 反向 PCR, TAIL-PCR, 细胞质雄性不育, 棉花, *atpA*, 双拷贝基因, 侧翼序列

High efficiency genome walking method for flanking sequences of cotton mitochondrial double-copy *atpA* gene based on optimized inverse PCR and TAIL-PCR

Received: March 20, 2011; **Accepted:** June 20, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30771371), Genetically Modified Organisms Breeding Major Projects of China (No. 2008ZX08005-004).

Corresponding author: Sandui Guo. Tel/Fax: +86-10-82106140; E-mail: gsdui@mail.caas.net.cn

国家自然科学基金 (No. 30771371), 国家转基因重大专项 (No. 2008ZX08005-004) 资助。

Xiao Zhang^{1,2}, Rui Zhang¹, Guoqing Sun¹, Ji Shi¹, Zhigang Meng¹, Tao Zhou¹, Siyu Hou¹,
Chengzhen Liang¹, Yuanhua Yu², and Sandui Guo¹

¹ Biotechnology Research Institute/National Key Facility of Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

² College of Life Science, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, Jilin, China

Abstract: Cloning of flanking sequences of double-copy gene is a challenge in molecular biology. We developed a method to solve this problem by combining an optimized inverse PCR (iPCR) with TAIL-PCR. First, Southern blotting analysis was used to determine a proper restriction enzyme that could obtain proper-length restriction fragments that contained the target gene. Then optimized iPCR was performed to amplify the restriction fragments that contained the separated copies of the gene. Based on the obtained sequences, TAIL-PCR was performed to amplify further flanking regions of the gene. With this method, we obtained all of the *EcoR* I restriction fragments (2.2–5.1 kb) and *Hind* III restriction fragments (8.5–11.7 kb) of mitochondrial *atpA* gene in cytoplasmic male sterile (CMS) line and maintainer line of Upland cotton. The results showed that this method was an efficient approach to clone flanking sequences of double-copy gene.

Keywords: inverse PCR, TAIL-PCR, cytoplasmic male sterility, cotton, *atpA*, double-copy gene, flanking sequences

在分子生物学中,为更好地研究某个基因的结构和功能,往往需要克隆其侧翼序列。目前,已有多种技术用于扩增基因的侧翼序列^[1-10]。但双拷贝基因侧翼序列的克隆仍是一个难点,因为难以确定所克隆到的序列是属于2个拷贝中的哪一个。以往要克隆双拷贝基因的侧翼序列,往往需要建立基因文库,然后筛选阳性克隆子进行测序,但这种方法费时费力。

棉花 *Gossypium hirsutum* L. 线粒体基因组中 *atpA* 基因以双拷贝形式存在,该基因编码线粒体 ATP 酶复合体 F₁ 因子中的 α 亚基。研究发现, *atpA* 基因在棉花细胞质雄性不育 (CMS) 系和保持系之间,以及棉花 A、D 基因组二倍体之间都存在明显的限制性片段长度多态性 (RFLPs)^[11-15],这说明该基因是棉花线粒体基因组中的一个重组活跃位点,并很可能与棉花细胞质雄性不育相关。巩养仓^[11]利用外源接头介导 PCR 法克隆到哈克尼西棉 CMS 系及其保持系 *atpA* 基因的部分侧翼序列,但未能将棉花 *atpA*

基因的 2 个拷贝区分开并加以详细解析。

为了克隆棉花双拷贝 *atpA* 基因侧翼序列,我们将 iPCR 方法进行优化,并与 TAIL-PCR 相结合,摸索出一套高效简便的克隆双拷贝基因侧翼序列的方法。利用该方法,我们将 *atpA* 两个拷贝进行了明确区分,并且获得的单条完整片段长达 12 kb。结合实验结果,对该方法在扩增双拷贝甚至多拷贝基因侧翼序列中的应用进行了讨论。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

陆地棉 CMS 不育系 P30A (不育胞质)、保持系 P30B (可育胞质)、三系杂交种“银棉 2 号” (不育胞质)。P30A 和 P30B 是同核异质系; P30A 与“银棉 2 号”具有相同胞质。

1.1.2 菌株与质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* TOP10 感受态细

胞购自北京博迈德生物技术公司; pGEMT-easy 载体购自 Promega 公司。

1.1.3 试剂

Southern blotting 检测试剂盒 (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II) 购自 Roche 公司; 尼龙膜 Hybond-N+ 购自 Amersham 公司; 凝胶回收试剂盒购自 Axygene 公司; 限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶购自北京天根生物公司; LA-*Taq* 酶购自 TaKaRa 公司; DNA ladder 0331 购自 Fermentas 公司; 其他化学试剂购自北京拜尔迪生物技术公司, 均为分析纯。引物合成及 DNA 测序由上海生工生物工程技术服务公司完成。iPCR 和 TAIL-PCR 所用引物如表 1 所示。

1.2 方法

1.2.1 棉花总 DNA 提取

使用改良 CTAB 法^[16]提取棉花 CMS 系、保持系、杂交种叶片总 DNA。

1.2.2 棉花材料的 Southern blotting 分析

Southern blotting 分析参考王教瑜等^[17]的方法。

1.2.3 反向 PCR (iPCR) 扩增 *atpA* 基因 *EcoR* I 限制片段

参考 Kim 等^[18]的方法并加以修改: 取 10 μg 棉花总 DNA, 在 200 μL 酶切体系 (含 50 U *EcoR* I 酶) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 6 h; 用等体积苯酚: 氯仿进行抽提, 然后用无水乙醇沉淀。将 DNA 用 3 U 的 T4 DNA 连接酶在 300 μL 体系中 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 24 h。然后, 自连产物用等体积苯酚: 氯仿进行抽提, 然后用无水乙醇沉淀, 20 μL 双蒸水重溶。从中取 500 ng DNA 作为模板, 用 LA-*Taq*

酶在 50 μL 体系中进行 PCR 反应。反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; 60 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; 72 $^{\circ}\text{C}$, 2 min, 共 35 个循环; 然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。后续实验步骤参照分子克隆实验手册^[19]。扩增产物用 0.9% 琼脂糖凝胶进行电泳, 回收纯化目的片段, 连接到 pGEMT-easy 载体, 然后转化 *E. coli* TOP10 感受态细胞, 将阳性质粒送上海生工生物工程技术服务公司测序。

1.2.4 TAIL-PCR 扩增 *atpA* 基因 *Hind* III 限制片段

具体方法参见文献^[20]。简并引物选用 AD10 (表 1); 采用 50 μL PCR 体系; 从第一步 (Primary) 和第二步 (Secondary) 反应液中取 0.5 μL 作为各自下一步的模板。具体反应步骤如表 2 所示。

2 结果与分析

2.1 *atpA* 基因在陆地棉 CMS 不育胞质和可育胞质间存在明显的 RFLPs

以 *atpA* 核心编码区 (引物为 P1 和 P2, 图 3 所示) 为探针, 对陆地棉细胞质雄性不育系 P30A、保持系 P30B、三系杂交种“银棉 2 号”进行 Southern blotting 分析。结果表明, 可育胞质 (保持系) 和不育胞质 (不育系和杂交种) 间存在明显的 RFLP 多态性: 用 *EcoR* I 酶切时, 可育胞质出现 2.2 kb 和 5.1 kb 两条杂交带, 而不育胞质的杂交带是 2.2 kb 和 3.3 kb; 用 *Hind* III 酶切时, 可育胞质出现 8.5 kb 和 11.6 kb 两条杂交带, 而不育胞质的杂交带是 9.1 kb 和 11.6 kb。这表明, 陆地棉可育胞质和不育胞质在 *atpA* 位点存在明显差异。所以, 如果能克隆到 *atpA* 基因所在的 *EcoR* I 和 *Hind* III 限制片段, 对研究棉花胞质雄性不育机理将很有意义。

表 1 本实验所用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
AD10	TCTTICGNACITNGGA	20
R1	AGATCCAGTGCCTTGACAAGATCTCCT	28
R2	TCAACCAATTCCCCAGCTTGAATCTCGT	28
R3	ATAGAGTCGTTAGTTCGCGAGCTCTGGG	28
R4	CTGTGGACCTTCTTCTCTTACG	23
R5	AGAGAGTCTCAGTCGAGTCACTC	23
R6	ATCCACTTGTGGAGTGCTAGTGG	23
F1	AGAAGACATGGCATGGTACTCGG	21
F2	TCGGCTTCTTCTGTGCTAGACTTGG	23
F3	CACAATAGCCCGTCTCTTTGGCCGACG	28
F4	AGTCTTCCGCTCTGTCTGCTC	21
F5	TCCCTTCGATTCCCATACACAAC	23
F6	ATCTATCT ATTTCCGCCGACAGA	23
SF1	CGTTCGGAAACCTCTAAGTGG	21
SF2	AGGGCGTTAAGGCAGCAGTAAAG	23
SF3	TCACAGCAGGCTGCTAAAGAGGATTTC	28
P1	ATTTTCAAGTGGATGAGATCGG	22
P2	GTGGTTGTTTCGGTACTTCTG	21
P3	TCAACCAATTCCCCAGCTTGAATCTCGT	28
P4	AGATCCAGTGCCTTGACAAGATCTCCT	28
P5	TGCTATTAACGTCGGCTTATCTGTCACT	28
P6	CTGGAATTGGCACAATATCGCGAAGTGG	28
P7	TTACCAGCTCGGGGATCTAATC	20
P8	CACTCGCTCGCCTTCGGGTGAGG	23
P9	ATCGAGTTAGAGATCGGGTTGCAGG	25
P10	ATGGAAATCCTCTTTAGCAGCCTGC	25
P11	TGCCTGATTGGTCCGCAATCAGTTACTGATGC	32
P12	TGCATCACATCATAGGTAAGGCAAAGCG	28
P13	ACTCCTAAAAACCAGAACGAGGG	23
P14	ATTCCTAAAAAGCGGAACGACGG	23
P15	CGCTTTGCCTTACCTATGATGTGATGCA	28
P16	GCTTTGCTGTACTGGGACTTAGGAG	25
P17	CCGTCGTTCCGCTTTTTAGGAAT	23
P18	CCTTGTCGTCTAAGTGAGTTAG	23

表 2 TAIL-PCR 反应条件

Table 2 Cycling conditions of TAIL-PCR

Reaction step	No.	Thermal cycling condition	Cycle number
Primary	1	94 °C, 1 min, 98 °C, 1 min	1
	2	94 °C, 30 s, 60 °C, 1 min, 72 °C, 2 min	5
	3	94 °C, 30 s, 25 °C, 2 min, 72 °C, 2 min, 94 °C, 30 s, 60 °C, 1 min, 72 °C, 2 min, 94 °C, 30 s, 60 °C, 1 min, 72 °C, 2 min, 94 °C, 30 s, 44 °C, 1 min, 72 °C, 2 min	15
	4	72 °C, 10 min	1
Secondary	1	94 °C, 1min	1
	2	94 °C, 30 s, 60 °C, 1 min, 72 °C, 2 min, 94 °C, 30 s, 60 °C, 1 min, 72 °C, 2 min, 94 °C, 30 s, 44 °C, 1 min, 72 °C, 2 min	15
	3	72 °C, 10 min	1
Tertiary	1	94 °C, 1min	1
	2	94 °C, 30 s, 60 °C, 1 min, 72 °C, 2 min, 94 °C, 30 s, 60 °C, 1 min, 72 °C, 2 min, 94 °C, 30 s, 44 °C, 1 min, 72 °C, 2 min	15
	3	72 °C, 10 min	1

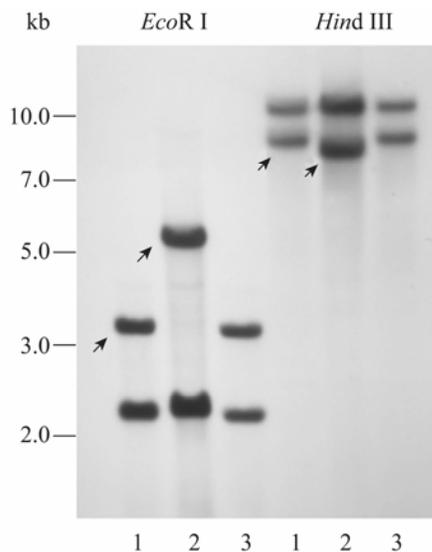


图 1 *atpA* 基因为探针的 Southern blotting 杂交结果
Fig. 1 Southern blotting analysis of total DNA from CMS line P30A (1), maintainer line P30B (2) and hybrid cultivar "Yinmian 2" (3) hybridized with *atpA* probe. Polymorphic bands between the fertile cytoplasm (2) and sterile cytoplasm (1, 3) are indicated by arrows.

2.2 iPCR 法扩增 *atpA* 基因 *EcoR* I 限制片段

根据 *atpA* 基因编码序列设计 iPCR 所需的两对反向引物: P4 和 P5, P3 和 P6。P4 和 P5 分别对应 *atpA* 编码区的 258~285 bp 和 1 098~1 125 bp, 二者相距 812 bp; P3 和 P6 分别对应 *atpA* 编码区的 140~167 bp 和 1 183~1 210 bp, 相距 1 015 bp (表 1 和图 3)。首先按照常规的 iPCR 方法: 先用 P4 和 P5 为引物, 以 100 ng 自连产物为模板进行一次 iPCR (1st iPCR), 然后用 P3 和 P6 为引物, 以 "1st iPCR" 产物为模板进行巢式 PCR ("2nd iPCR")。结果发现, 在 P30A 中 "1st iPCR" 可以扩增出相应条带, 但亮度很弱; "2nd iPCR" 时目的条带未获得富集反而亮度更淡。在 P30B 中, "1st iPCR" 可以将 2.2 kb Southern blotting 杂交片段所对应的条带扩增出来, 但无法扩增出 5.1 kb 杂交片段所对应的条带; "2nd iPCR" 时目

的条带未获得富集反而亮度更淡 (图 2B)。然后, 我们参照 Kim 等的方法^[18], 将自连条件改为 37 °C, 2 h, PCR 模板量增大到 500 ng 进行 iPCR。结果发现可以将图 2A 中杂交片段所对应的条带都扩增出来, 但是亮度偏弱 (图 2C), 很难进行回收克隆, 这说明连接时间太短会明显降低环化效果。

所以, 我们对 iPCR 技术在 2 个方面进行了优化, 以保证通过一次 PCR 反应就能获得足够的目的产物。一是自连时间延长到 24 h 以上 (16 °C), 以获得足够的目的环化 DNA; 二是将 PCR 的起始模板量增大到 500 ng, 以保证目标产物获得高效扩增。结果从不育胞质线粒体基因组中扩增出 1.2 kb 和 2.3 kb 两条带, 分别对应 2.2 kb 和 3.3 kb *EcoR* I 限制片段; 从可育胞质线粒体基因组中扩增出 1.2 kb 和 4.1 kb 两条带, 分别对应 2.2 kb 和 5.1 kb *EcoR* I 限制片段 (图 2 D)。

将上述片段分别克隆测序后与 *atpA* 基因核心保守序列进行拼接还原, 发现 *atpA* 基因在不育胞质和可育胞质线粒体基因组中各有两个不同的拷贝, 如图 3 所示。

可育胞质中 2 条 *EcoR* I 限制片段的长度是 2 225 bp 和 5 083 bp, 分别命名为 N-1 和 N-2, 二者 5'端的 *EcoR* I 位点相同, 都是位于 *atpA* 基因编码序列的第 4 bp 处 (ATGG AATTC)。N-1 中含有完整 *atpA* 基因 (需要加上 *EcoR* I 酶切位点上游的 4 个碱基 ATGG), 长度 1 524 bp, 编码 507 aa。N-2 中含有截短型 *atpA* 基因, 截断位点位于编码区第 1 352 bp 处。不育胞质中相应的两条 *EcoR* I 限制片段分别命名为 S-1 (2 194 bp) 和 S-2 (3 297 bp)。S-1 中含有完整 *atpA* 基因; S-2

中含有 3'截短型基因, 截断位点位于编码区第 1 336 bp 处。

iPCR 结果中, 可育胞质除 1.2 kb 和 4.1 kb 两条目的带之外, 还存在一条 2.5 kb 和一条 0.3 kb 的条带。克隆测序结果表明, 二者分别由 N-2 中 3 599 bp 处 (GAATT T) 和 1 327 bp 处 (A AATTC) 的 *EcoR* I 星号活性产生。同样, 不育胞质 0.35 kb 条带是由 S-2 中 1 369 bp 处 (GAATT T) 的星号活性产生。

为验证所克隆到的 *EcoR* I 限制片段是否正确, 我们根据片段两端序列设计引物: P7 结合 P8 扩增 N-1 和 S-1, P7 结合 P9 和 P10 来分别扩增 N-2 和 S-2。结果扩增出与 Southern blotting 结果相符的条带 (图 4)。证明 iPCR 法成功将棉花线粒体 *atpA* 基因 2 个不同拷贝进行正确区分。

2.3 TAIL-PCR 扩增 *atpA* *Hind* III 限制片段

atpA 基因 *EcoR* I 限制片段的大小在 2.2~5.1 kb 之间, *Hind* III 限制片段的大小在 8.5~11.6 kb 之间, 这说明前者总体上只是后者的一部分。为进一步解析后者的多态性, 我们在前者的基础上, 采用 TAIL-PCR 方法, 进一步克隆 *atpA* 的侧翼序列。分析发现, 前者 4 条片段中只在 N-2 的第 4 143 bp 处发现一个 *Hind* III 位点。所以, 要获得后者的 4 条片段, 需要以前者片段为核心, 分别向上、下游进行基因组步移 (TAIL-PCR), 理论上共需要向 7 个方向进行, 即: N-1、S-1、N-2、S-2 片段的 5'上游和 N-1、S-1、S-2 片段的 3'下游。进一步分析发现 4 条 *EcoR* I 限制片段的 5'末端都是相同的, 且先前对 *atpA* 基因 5'上游进行 TAIL-PCR 时发现, 两种胞质 TAIL-PCR

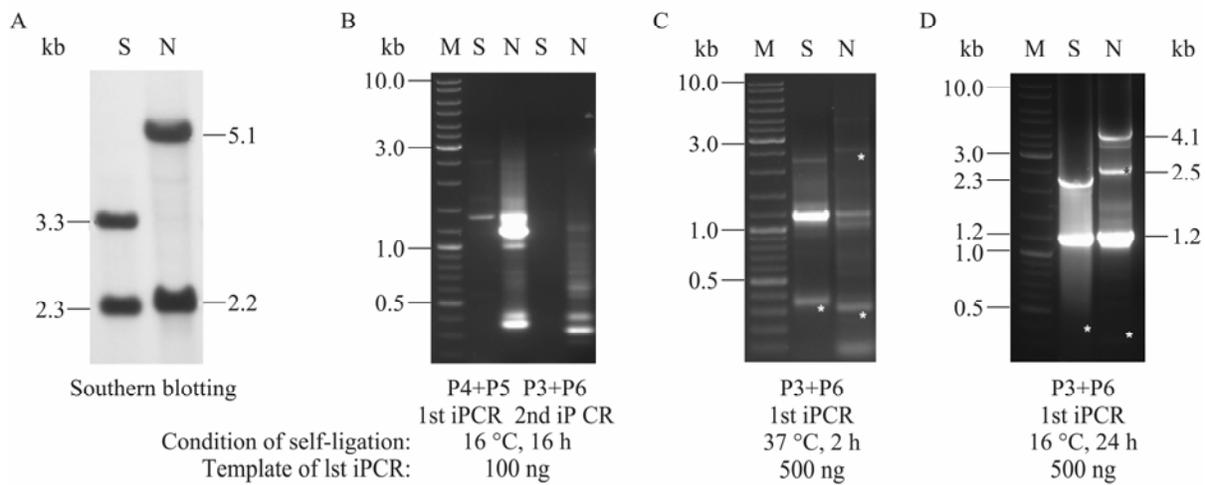


图 2 *atpA* 基因的 Southern blotting (*EcoR* I 酶切) 及反向 PCR 结果

Fig. 2 Southern blotting and iPCR results of *atpA* gene. (A) Southern blotting analysis of *atpA* probe (*EcoR* I digested). (B, C, D) Results of iPCR with *atpA*-specific primer pairs. M: DNA marker; S: P30A; N: P30B; asterisks (*) indicate the bands resulted from star activity of *EcoR* I.

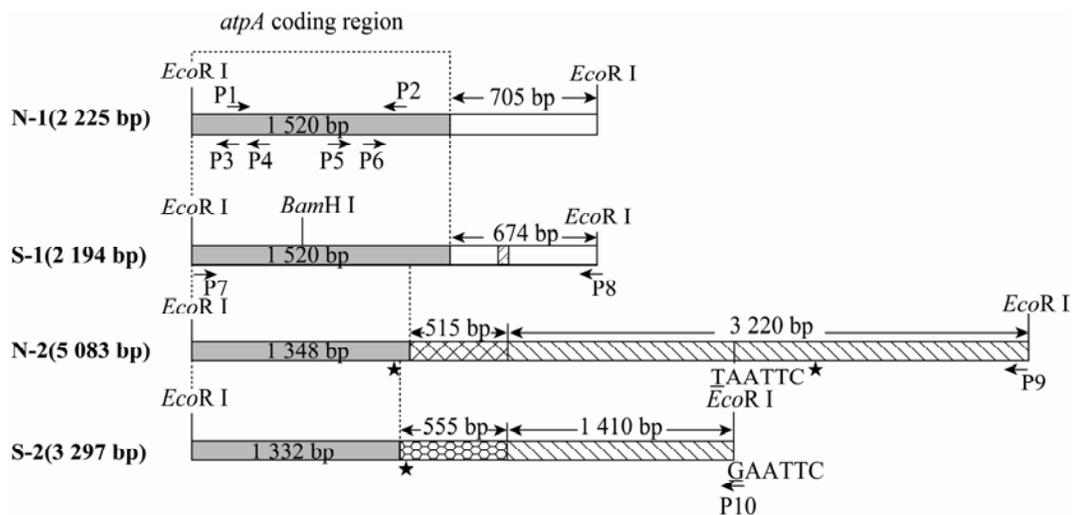


图 3 陆地棉可育胞质和不育胞质中 *atpA* 基因 *EcoR* I 限制片段示意图

Fig. 3 Schematic structures of all *EcoR* I restriction fragments of *atpA* in fertile and sterile cytoplasm. The *atpA* coding sequences are indicated by gray boxes. The 3' identical noncoding regions in N-1 and S-1 are represented by open bars. The deletion of the sequences at the SSR loci located downstream of the full-length *atpA* gene in S-1 is shown in hatched bars. The truncated regions of N-2 and S-2 are indicated by different cross-hatched bars. The 3' identical regions in N-2 and S-2 following the truncated regions are represented by hatched bars. P1 and P2 indicate the primers used for amplifying the core sequence of *atpA* for Southern blotting. P3-P6 indicate the primers used for inverse PCR. P7-P10 indicate the primer used for amplifying the *EcoR* I restriction fragments of *atpA*. Pentagrams indicate the sites that show star activity of *EcoR* I.

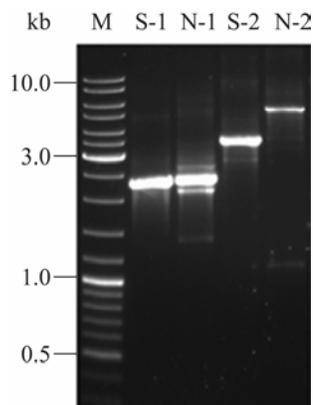


图 4 克隆片段的 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of the cloning fragments by PCR. M: generuler 0331 marker; four primer pairs (P7/P8, P7/P8, P7/P10, and P7/P9) were used to amplify fragments of S-1, N-1, S-2, and N-2, respectively.

扩增条带是相同的,这说明两种胞质 *atpA* 基因的 5'上游序列基本一致。所以,“N-1、S-1、N-2、S-2 片段的 5'上游”这四者的基因组步移工作可以简化成其中之一。同样,“N-1、S-1 片段的 3'下游”这两者的基因组步移工作也简化成其中之一。这样,7 个步移任务简化成 3 个: S-1 片段的 5'上游和 3'下游、S-2 片段的 3'下游。

2.3.1 *atpA* 基因 5'上游区的基因组步移

我们以 P30A 总 DNA 为模板,向 *atpA* 5'上游进行了两轮 TAIL-PCR (图 5A),第 I 轮 TAIL-PCR 的 3 步反应中使用的特异引物分别为 R1、R2、R3;第 II 轮使用的引物分别为 R4、R5、R6 (表 1,图 6)。通过两轮 PCR 反应,共获得了 4 837 bp 的侧翼序列,在 *atpA* 起始密码子 5'上游 4 351 bp 处发现了 *Hind* III 酶切位点。

为验证这段 4 351 bp 序列是否为 4 个片段

(N-1、S-1、N-2、S-2) 所共有,我们在该序列的 5'端设计引物 P11,在全长 *atpA* 编码区 3'末端设计引物 P12,在 N-2 和 S-2 *atpA* 编码区截短位点后分别设计引物 P13 和 P14 (表 1,图 6),分别以 P30A 或 P30B 总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,获得了与预期相符的条带 (数据未显示),测序结果证明该序列是 4 个片段所共有。

2.3.2 *atpA* 全长拷贝 3'下游区的基因组步移

以 P30A 总 DNA 为模板,向 S-1 3'下游进行了两轮 TAIL-PCR (图 5B),两轮反应所使用的特异引物分别是 F1、F2、F3; F4、F5、F6 (表 1,图 6)。结果共获得 5 509 bp 侧翼序列,其中在 S-1 下游 5 109 bp 处发现了 *Hind* III 位点。为验证所获序列是否正确,我们在全长 *atpA* 编码区 3'末端设计引物 P15,在 5 509 bp 序列 3'端设计引物 P16,分别以 P30A 或 P30B 总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,结果获得了与预期相符的条带 (数据未显示),测序结果证明该序列是 S-1 和 N-1 所共有。

2.3.3 不育胞质截短型 *atpA* 拷贝 (S-2) 3'下游区的基因组步移

以 P30A 总 DNA 为模板,以 SF1、SF2、SF3 (表 1,图 6) 为特异引物,向 S-2 下游进行了一轮 TAIL-PCR (图 5C),获得了 3 369 bp 侧翼序列,其中在第 1 482 bp 处,发现了 *Hind* III 位点。为验证正确与否,我们在 S-2 *atpA* 编码区截短位点及所获序列 3'末端处分别设计引物 P17 和 P18 (表 1,图 6),以 P30A 总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,结果获得了与预期相符的条带 (图片未显示)。

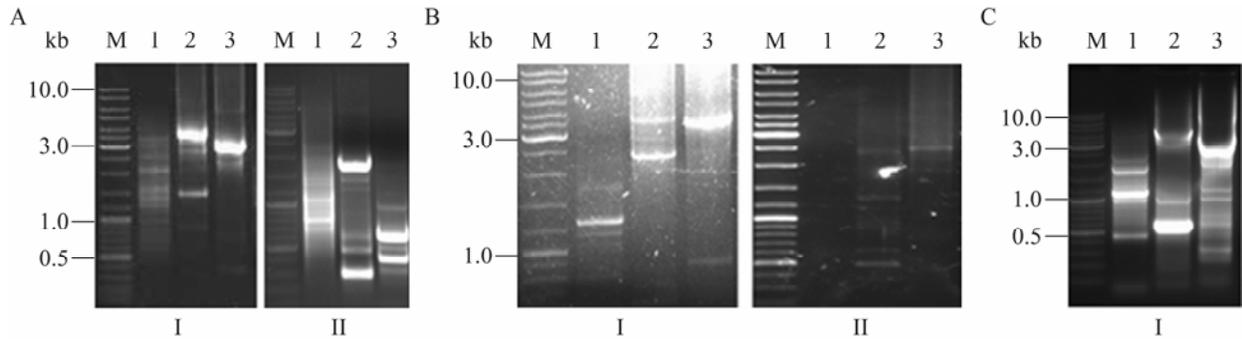


图5 不育胞质 *atpA* 基因侧翼序列 TAIL-PCR 结果

Fig. 5 TAIL-PCR results of flanking sequences of *atpA* in CMS line. (A) TAIL-PCR results of 5' flanking sequences of *atpA* in CMS line. (B) TAIL-PCR results of 3' flanking sequences of intact *atpA* gene in CMS line. (C) TAIL-PCR results of 3' flanking sequences of truncated *atpA* gene in CMS line. M: generuler 0331 marker; 1, 2, and 3 indicate the primary, secondary and tertiary reaction of TAIL-PCR (Table 2); I and II indicate the first and second round of TAIL-PCR.

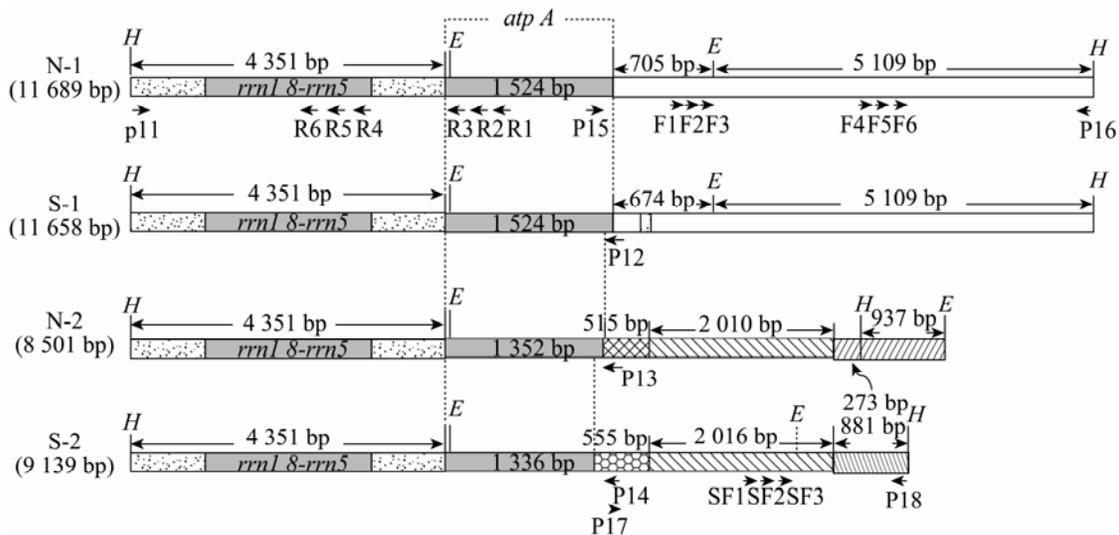


图6 棉花可育胞质和不育胞质中 *atpA* 基因 *Hind* III 限制片段示意图

Fig. 6 Schematic structures of all *Hind* III restriction fragments of *atpA* in fertile and sterile cytoplasm of cotton. The 5' identical regions in N-1, N-2, S-1 and S-2 are represented by dotted bars. The 3' identical regions in N-1 and S-1 following the *atpA* coding regions are represented by open bars. The differential sequences near 3' *Hind* III sites in N-2 and S-2 are indicated by different hatched bars. F1-F6, R1-R6, SF1-SF3 indicate the primers used for TAIL-PCR. P11-P14 indicate the primers used for amplifying 5' flanking and coding regions of *atpA*; P15-P18 indicate the primers used for amplifying 3' flanking regions of *atpA*.

通过以上TAIL-PCR反应,获得了棉花线粒体 $atpA$ 基因 $EcoR$ I与 $Hind$ III酶切位点之间的序列(图6),发现了两种胞质间新的差异序列,并确定了可育胞质和不育胞质中两条 $Hind$ III限制片段长度分别是11 689 bp和8 501 bp;11 658 bp和9 139 bp。

综上所述,通过iPCR和TAIL-PCR相结合的方法,我们获得了陆地棉可育胞质和不育胞质 $atpA$ 基因所有的 $EcoR$ I限制片段和 $Hind$ III限制片段,将该基因的2个拷贝进行了明确区分,确定了导致RFLP多态性的序列,在两种胞质中各获得了超过20 kb的线粒体DNA序列,这些序列将有助于研究棉花CMS机理及开发CMS相关分子标记。

3 讨论

通过优化的iPCR和TAIL-PCR相结合的方法,我们获得了陆地棉可育胞质和不育胞质线粒体双拷贝 $atpA$ 基因每个拷贝各自的侧翼序列,证明可育胞质和不育胞质中各有一个全长拷贝和一个3'截短型拷贝,但3'截断的位置不同。分析发现,在 $atpA$ 编码区存在一个 $BamH$ I位点(图3),这解释了为何在 $BamH$ I酶切产物中 $atpA$ 显示出4条杂交条带^[14]。将我们的结果与巩养仓的结果^[11]进行比较发现,巩养仓所获得的 $atpA$ 侧翼序列属于3'截短型拷贝。iPCR方法具有较高的灵敏性,我们不只扩增出目的条带,同时也扩增出由 $EcoR$ I酶星号活性所产生的条带。我们在对 $atpA$ 基因进行Southern blotting实验过程中发现,如果酶切产物上样量较大,就很容易出现一些弱杂交带。通过iPCR方法便明确了这些弱杂交带通常是由内切酶的星号活性产生的。所

以,iPCR技术还可以用来鉴别某个基因Southern blotting的杂交信号中哪些是真拷贝,哪些是假拷贝。

iPCR在扩增基因侧翼序列方面的优势就是它可以通过一个PCR反应同时扩增出5'和3'侧翼序列,并且它可以在一个反应中扩增出多拷贝基因的侧翼序列并加以区分,这是其他染色体步移方法很难做到的。传统的iPCR需要连续进行两步PCR反应,我们用一步PCR就扩增出信号很强的条带,关键因素之一就是加大iPCR反应的起始模板量,本实验所用的模板量在500 ng以上。自连效率是iPCR成功的关键因素,由于连接体系中要求DNA浓度不能太高,为获得产量较高的自连产物,需要适当加大自连体系,并延长连接时间。我们利用优化的iPCR方法还成功克隆到棉花线粒体 $atp9$ 、 $nad6$ 、 $nad7$ 基因的侧翼序列(未发表),表明该方法重复性较好。利用获得的差异序列,我们已将棉花可育胞质和不育胞质之间的RFLP标记转化成SCAR和SSR标记,说明该方法在分子标记开发中也具有很大的潜力。

从图2可看出,优化后的iPCR法不仅可以扩增出目的条带,而且可以将星号活性位点产生的片段也扩增出来:在P30A中,共扩增出了3条带;在P30B中,共扩增出了4条带。这说明只要酶切产生的线性片段具有互补的粘性末端,并且长度不是过长(超过5 kb),就可以自连环化并进而被有效扩增。所以,优化后的iPCR方法不仅可以克隆双拷贝基因的侧翼序列,而且也可以扩增多拷贝基因的侧翼序列。

iPCR法对于片段自连效果要求高,如果一个限制片段很长,就很难有效连接并扩增。一般

来说,在进行 iPCR 反应之前,先要进行 Southern blotting 分析,以确定一种能获得合适长度杂交片段的限制性内切酶。棉花 *atpA/EcoR I* 限制片段的大小是 2.2~5.1 kb,长度比较合适。但是 *Hind III* 限制片段长达 11.7 kb,需要借助 TAIL-PCR 方法。TAIL-PCR 方法不受限制片段长度的束缚,只要控制好方向,它理论上可以无限地往侧翼方向扩增延伸。在进行 TAIL-PCR 实验时,我们使用了 LA-*Taq* 酶,该酶具有很强的扩增能力,我们进行了多轮 TAIL-PCR 反应,基本上每轮都能获得 2~3 kb 的目的条带。

REFERENCES

- [1] Ochman H, Ajioka JW, Garza D, et al. Inverse polymerase chain reaction. *Nat Biotechnol*, 1990, 8(8): 759–760.
- [2] Liu YG, Whittier RF. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, 1995, 25(3): 674–681.
- [3] Shyamala V, Ames GFL. Genome walking by single-specific-primer polymerase chain reaction: SSP-PCR. *Gene*, 1990, 84(1): 1–8.
- [4] Jones DH, Winistorfer SC. Sequence specific generation of a DNA panhandle permits PCR amplification of unknown flanking DNA. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(3): 595–600.
- [5] Nelson DL, Ledbetter SA, Corbo L, et al. Alu polymerase chain reaction: a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(17): 6686–6690.
- [6] Kim YJ, Kwak CI, Gu YY, et al. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *Biotechniques*, 2004, 36(3): 424–426.
- [7] Rosenthal A, Jones DSC. Genomic walking and sequencing by oligo-cassette mediated polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(10): 3095–3096.
- [8] Parker JD, Rabinovitch PS, Burner GC. Targeted gene walking polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res*, 1991, 19(11): 3055–3060.
- [9] Sarkar G, Turner RT, Bolander ME. Restriction-site PCR: a direct method of unknown sequence retrieval adjacent to a known locus by using universal primers. *PCR Methods Appl*, 1993, 2(4): 318–322.
- [10] Liang CZ, Zhang R, Guo SD. Progress of chromosome walking. *Biotechnol Bull*, 2009(10): 75–82, 87.
梁成真, 张锐, 郭三堆. 染色体步移技术研究进展. *生物技术通报*, 2009(10): 75–82, 87.
- [11] Gong YC. Screening of mitochondrial genes associated with cytoplasmic male sterility in cotton[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008.
巩养仓. 棉花细胞质雄性不育相关线粒体基因筛选[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.
- [12] Feng CD, Guo JH, Nie YC, et al. Cytoplasmic-nuclear male sterility in cotton: comparative RFLP analysis of mitochondrial DNA. San Antonio: Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences, 2000, 1: 511–512.
- [13] Wang F, Feng CD, O'Connell MA, et al. RFLP analysis of mitochondrial DNA in two cytoplasmic male sterility systems (CMS-D2 and CMS-D8) of cotton. *Euphytica*, 2010, 172(1): 93–99.
- [14] Small RL, Wendel JF. The mitochondrial genome of allotetraploid cotton (*Gossypium* L.). *J Hered*, 1999, 90(1): 251–253.
- [15] Wu JY, Gong YC, Cui MH, et al. Molecular characterization of cytoplasmic male sterility conditioned by *Gossypium harknessii* cytoplasm (CMS-D2) in upland cotton. *Euphytica*, 2011, 181(1): 17–29.
- [16] Huang J, Ge X, Sun M. Modified CTAB protocol using a silica matrix for isolation of plant genomic DNA. *Biotechnology*, 2000, 28(3): 432–434.

[17] Wang JY, Zhang Z, Du XF, et al. Dual screening for targeted gene replacement mutant in *Magnaporthe oryzae* with GUS as negative marker. *Chin J Biotech*, 2009, 25(1): 129-138.
王教瑜, 张震, 杜新法, 等. GUS 为负标记的稻瘟病菌目标基因替换突变体双筛选体系. *生物工程学报*, 2009, 25(1): 129-138.

[18] Kim DH, Kim BD. The organization of mitochondrial *atp6* gene region in male fertile and CMS lines of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Curr Genet*, 2006, 49(1): 59-67.

[19] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 20-25.

[20] Liang CZ, Zhang R, Sun GQ, et al. Cloning of stress-related transcription factors gene from cotton by optimized TAIL-PCR. *Cott Sci*, 2010, 22(3): 195-201.
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. *棉花学报*, 2010, 22(3): 195-201.



2011 年度《生物工程学报》“优秀审稿专家”、“优秀特邀编辑”获奖名单

《生物工程学报》近几年学术质量稳步上升(影响因子由 2007 年的 0.799 升至 2011 年的 1.145), 编委会和各位审稿专家在保证本刊的学术水平和质量中付出了辛勤劳动。为了感谢优秀审稿专家所做的工作, 编辑部从今年开始, 每年根据审稿专家在过去一年中的审稿数量、质量进行综合评估, 排名居前 20 位的专家将被评为“生物工程学报优秀审稿专家”。另外, 为了感谢帮助本刊组织专刊和专栏的特邀编辑, 每年评选出 2~3 名“生物工程学报优秀特邀编辑”。

获奖专家将获得编委会颁发的证书, 同时再向本刊投稿时还可享受一定的优惠: 凡在投稿中有优秀审稿专家署名 的文章, 1) 在下一年度免收投稿的审理费; 2) 在下一年度录用的优秀论文可优先发表。

2011 年度“生物工程学报优秀审稿专家”获奖名单 (按姓名拼音排序)

姓 名	单 位	姓 名	单 位
陈受宜 研究员	中国科学院遗传与发育生物学研究所	裴雪涛 研究员	军事医学科学院输血医学研究所
陈苏民 教授	中国人民解放军第四军医大学	彭景樵 研究员	中国科学院动物研究所
陈昭烈 研究员	军事医学科学院生物工程研究所	钱世钧 研究员	中国科学院微生物研究所
仇华吉 研究员	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所	邵蔚蓝 教授	南京师范大学生命科学学院
崔福斋 教授	清华大学材料科学与工程系	童光志 研究员	中国农业科学院上海兽医研究所
董志扬 研究员	中国科学院微生物研究所	邢建民 研究员	中国科学院过程工程研究所
方福德 研究员	中国医学科学院基础医学研究所	张彦定 教授	福建师范大学生命科学学院
李 寅 研究员	中国科学院微生物研究所	张智清 研究员	中国疾病预防控制中心病毒所
李 震 研究员	上海市农科院畜牧兽医研究所	赵德修 研究员	中国科学院植物研究所
马清钧 研究员	军事医学科学院生物工程研究所	周 琪 研究员	中国科学院动物研究所

2011 年度“生物工程学报优秀特邀编辑”获奖名单 (按姓名拼音排序)

姓 名	单 位
刘德华 教 授	清华大学应用化学所
刘文军 研究员	中国科学院微生物研究所