

菌落 PCR 产物直接测序方法的建立及在水稻基因测序中的应用

毛伟华 (浙江大学 分析测试中心, 浙江 杭州 310029)

Establishment of Direct Sequencing Method with Colony PCR Products and Its Application in Rice Gene Sequencing

MAO Wei-hua (Center of Analysis and Measurement, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: A method for direct sequencing using colony PCR products was established. Under controlled conditions, colony PCR could be used to screen and identify positive clone, and its products could be used as sequencing templates directly. The sequencing result was reliable. Compared with conventional plasmid DNA sequencing method, colony PCR products sequencing method was faster and simpler. However, when the products were used to sequence the DNA with long PolyT and PolyA, the sequencing efficiency was low.

Key words: colony PCR; plasmid; sequencing; methodology; rice

摘要: 建立了以菌落 PCR 产物作为 DNA 测序模板进行快速测序的技术方法。研究结果表明,采用菌落 PCR 技术,以载体插入位点两端序列互补的通用引物(如 M13 正反向引物)为引物,在控制菌落 PCR 反应条件的情况下,不仅可用于筛选和鉴定阳性克隆,而且菌落 PCR 产物还可作为 DNA 测序模板,结果准确可靠。与常规质粒测序方法比较,该法快速、简便,但对具有 PolyT、PolyA 过多的序列进行测序时,该法测序效率较低。

关键词: 菌落 PCR; 质粒; 测序; 实验技术; 水稻

中图分类号: Q94-336; Q943; S-3

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2005)05-0463-04

转化菌阳性克隆的筛选鉴定和测序技术已成为当今分子生物学领域一项不可缺少的实验技术手段。当前在阳性克隆的筛选和测序过程中一般采用抗生素筛选、蓝白斑筛选、质粒抽提、酶切等一系列工作程序^[1],然后再对已鉴定的阳性克隆进行接种、质粒抽提、琼脂糖凝胶电泳检测质粒浓度和纯度,最后进行 DNA 测序。整个过程烦琐费时,而且存在着重复步骤,特别在筛选量大时,不仅浪费大量人力财力,工作效率还受到很大限制。菌落 PCR 是以转化菌单个克隆为模板,采用特异性引物或通用引物对目的基因进行扩增,用来鉴定和筛选阳性转化菌的技术。Gussow 等首先应用菌落 PCR 直接鉴定抗性平板上的重组克隆^[2]。随后 Sathe 等^[3]发现经 94 °下变性处理,大部分转化菌细胞破裂并释放出 DNA,因此可以直接作为 PCR 反应的模板,而无需抽提质粒。由于这种菌落 PCR 法直接以菌落为模板,不需特殊处理且适合于各种载体,较传统的鉴定方法简便、快速、经济,很快被应用于转化后的重组克隆,特别是大量阳性克隆的筛选和鉴定^[4,5],但至目前罕有将菌落 PCR 产物直接应用于测序的报道。针对上述情况,本研究在前人采用菌落 PCR 方法进行阳性克隆的筛选和鉴定的研究基础上,以载体插入位点两端序列互补的通用引物(如 M13 正反向引物)为引物,通过控制模板引物退火温度,建立菌落 PCR 产物直接测序技术体系对水稻基因进行测序,并对该技术体系的特点进行分析。

1 材料与方法

1.1 供试材料

需克隆的目的基因片段来源于水稻基因 PCR 产物,克隆载体 pGEM-T vector 购自 Promega 公司,pUCmr T vector 购自上海博采公司,菌落 PCR 引物和测序引物都选用 M13 正向引物: 5'-CGCCAGGGTTTCCCAATTCACACAGGA-3' 和

M13 反向引物: 5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA-3',转化受体菌为 TGI。

1.2 步骤

1.2.1 菌落和菌液培养

将水稻基因 PCR 产物与载体进行连接,连接产物转化大肠杆菌 TGI 感受态细胞,并涂布于含氨苄青霉素的 LB 培养基上,37 °下培养 12 ~ 16 h,待菌落长出后,用灭菌牙签挑取白斑,接种到 1 mL LB 液体培养基(含抗生素)的 96 孔深孔板中,37 °、200 r/min 下振荡培养 20 h。

1.2.2 菌落 PCR 扩增和电泳鉴定(阳性克隆的筛选和鉴定)

25 µL 体系 PCR 反应液组成: Taq DNA 聚合酶(5 U/µL) 0.2 µL; 10 ×PCR 缓冲液 2.5 µL; 10 mmol/L dNTPs 0.4 µL; 10 µmol/L M13 正反向引物各 0.2 µL,加灭菌蒸馏水至反应体积 24.75 µL,菌液 0.25 µL,直接将 96 孔板置于 PCR 仪上进行反应。反应条件如下: 94 °下 3 min, 54 °下 50 s, 72 °下 1 min, 30 个循环后 4 °下保存。0.8 % 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物的纯度和浓度。

1.2.3 阳性克隆 PCR 产物纯化和检测

菌落 PCR 产物先于 3990 r/min 下离心 40 min,吸取上清液 20 µL;然后采用醋酸铵乙醇沉淀法或无水乙醇沉淀法纯化,前者每孔上清液加入 2.0 µL 7.5 mol/L 的 NH₄OAc 和 55 µL 无水乙醇混和液,后者每孔上清液加入 50 µL 无水乙醇,两者均需 3990 r/min 下离心 40 min,倒去上清并用纸吸干;再加入 100 µL 70 %乙醇,3990 r/min 下离心 20 min,

收稿日期: 2005-03-15; 修改稿收到日期: 2005-05-07。

基金项目: 浙江省分析测试基金资助项目(04185)。

第一作者简介: 毛伟华(1970 -),女,助理研究员,在职博士研究生。

倒去上清并用纸吸干;室温下干燥沉淀后,将沉淀溶于 10 μL 去离子水中,0.8 % 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物纯度和浓度。

1.2.4 质粒提取和电泳鉴定 (CK)

以我们实验室建立的提取质粒的标准方法提取质粒 DNA^[6]。进行 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳,以标准 DNA 为参照,鉴定质粒 DNA 的纯度和浓度。

1.2.5 测序反应和测序

采用 Sanger 双脱氧链终止法进行测序反应,以 Mega-BACE 1000 DNA 分析系统进行测序,具体操作步骤按参考文献[7]进行。

2 结果与分析

2.1 既适合于阳性克隆的筛选又适合于测序的菌落 PCR 体系的建立

已有报道菌落 PCR 可以作为筛选和鉴定阳性克隆的方法,但我们的目的在于菌落 PCR 不仅可筛选和鉴定阳性克隆,而且其产物也能作为 DNA 测序模板进行直接测序,因此在建立菌落 PCR 体系时就必须考虑产物作为测序模板的要求。因为纯度是测序模板的首要条件,所以 PCR 测序模板必须是以最少的引物扩增出单一的特异性条带。本实验以 M13 正反向引物为引物,通过模板、温度和引物梯度 PCR,最后确定最佳反应条件。

图 1 中泳道 2~8 为模板梯度 PCR 电泳图,泳道 2 为白斑菌液离心后去上清液用牙签挑取少量沉淀作为 PCR 模板,泳道 3~8 直接以菌液为模板。从电泳图清晰可见,以菌液离心后沉淀为模板,电泳条带不明显且有杂带;以菌液为模板,0.25 μL 菌液足以产生明亮的单一的特异性条带,菌液用量越大,PCR 产物反而越少。图 1 中第 9 泳道以阴性转化菌(蓝斑)为模板,所扩增条带为载体上 M13 正反向引物结合位点之间的序列,长度为 250 bp 左右,故在鉴定阳性克隆时,根据 DNA marker 所示片段大小与目的基因长度加 250 bp 数目大致相符者可确定为所需的阳性克隆。

图 2 为引物梯度 PCR,从泳道 2~7 反应体系中不同引物加量电泳结果分析可知,0.05 μL 引物反应产物最少,随引

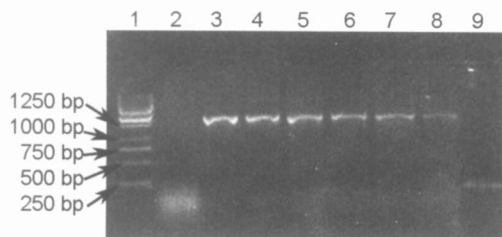


图 1 不同模板加样量条件下的菌落 PCR 产物琼脂糖电泳图
Fig. 1. 0.8 % agarose gel electrophoresis of colony PCR products under different amounts of template.

1 - 1 kb DNA marker; 2 - 白斑菌液沉淀物; 3~8 - 白斑菌液依次为 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 μL ; 9 - 蓝斑菌液 0.25 μL 。

Lane 1, 1 kb DNA marker; Lane 2, The precipitation of cell suspension; Lanes 3 - 8, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 μL cell suspension of white colony in turn; Lane 9, 0.25 μL cell suspension of blue colony.

物加量增加,产物量也增加,但经紫外分光光度计检验,0.2、0.4、0.6 和 0.8 μL 引物所产生的产物量相差不多,鉴于引物会影响测序效果,故引物加量选择 0.2 μL 为宜。

根据资料,实际退火温度要比 T_m 值低 5 $^{\circ}\text{C}$,而 M13 引物的 T_m 值为 60 $^{\circ}\text{C}$ 左右,故将退火温度设为 50、52、54、56 和 58 $^{\circ}\text{C}$ 进行温度梯度 PCR,结果表明(图 3),退火温度对产物的量和条带清晰度影响不大。本研究选择适中温度 54 $^{\circ}\text{C}$ 。

综合以上结果,我们确定菌落 PCR 总反应体系为 25 μL ,菌液用量为 0.25 μL ,10 $\mu\text{mol/L}$ M13 正反向引物各 0.2 μL ,退火温度为 54 $^{\circ}\text{C}$ 。为了验证本菌落 PCR 体系对阳性克隆的鉴定效果,我们对同一转化菌还提取质粒进行质粒 PCR,对 500 份质粒 PCR 和菌落 PCR 结果统计表明,若以质粒 PCR 阳性率(100 %)为对照,直接用菌落进行 PCR 鉴定,阳性率约 98 % 左右。

2.2 已筛选阳性克隆的菌落 PCR 产物纯化体系的建立

对上述经过电泳鉴定为阳性克隆的菌落 PCR 产物进行纯化,纯化分两个步骤进行:1) 由于菌落 PCR 的反应模板为菌液,在反应产物中存在着蛋白质、细胞壁等杂质,故在纯化前先在 4000 r/min 下离心 40 min,吸上清以去除这类杂质。

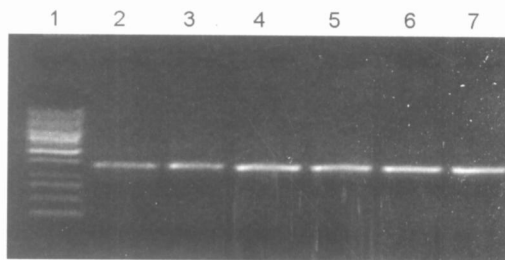


图 2 PCR 体系中引物不同加样量条件下的菌落 PCR 产物琼脂糖电泳结果

Fig. 2. 0.8 % agarose gel electrophoresis of colony PCR products under different amounts of primer.

1 - 1 kb DNA marker; 2~7 - 引物加量依次为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6 和 0.8 μL 。

Lane 1, 1 kb DNA marker; Lanes 2 - 7, The amount of primer is 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8 μL in turn.

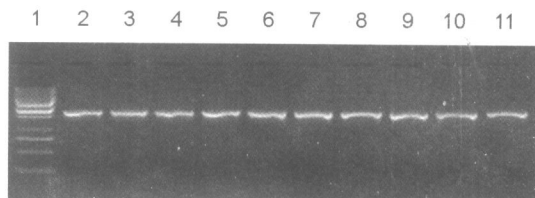


图 3 不同退火温度条件下的菌落 PCR 产物琼脂糖电泳图

Fig. 3. 0.8 % agarose gel electrophoresis of colony PCR products under different anneal temperatures.

1 - 1 kb DNA marker; 2, 3 - 退火温度为 50 $^{\circ}\text{C}$; 4, 5 - 退火温度为 52 $^{\circ}\text{C}$; 6, 7 - 退火温度为 54 $^{\circ}\text{C}$; 8, 9 - 退火温度为 56 $^{\circ}\text{C}$; 10, 11 - 退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$ 。

Lane 1, 1 kb DNA marker; Lanes 2 and 3, Anneal temperature is 50 $^{\circ}\text{C}$; Lanes 4 and 5, Anneal temperature is 52 $^{\circ}\text{C}$; Lanes 6 and 7, Anneal temperature is 54 $^{\circ}\text{C}$; Lanes 8 and 9, Anneal temperature is 56 $^{\circ}\text{C}$; Lanes 10 and 11, Anneal temperature is 58 $^{\circ}\text{C}$ 。

2) 由于在菌落 PCR 中已通过控制 PCR 模板、引物、退火温度等环节获得明亮而单一的特异性条带，菌落 PCR 纯化可采用沉淀法直接纯化以去除 PCR 产物中的酶、离子。图 4 为采用醋酸铵乙醇法沉淀和无水乙醇沉淀所得的沉淀产物溶解后的电泳图。从图中结果的分析比较可知，两种方法均可得到明亮而单一的特异性条带。通过紫外分光光度计检测，醋酸铵乙醇法沉淀回收效率为 30 % ~ 40 %， A_{260} / A_{280} 为 1.8 ~ 2.0，而无水乙醇沉淀回收效率为 50 % ~ 60 %， A_{260} / A_{280} 为 1.8 ~ 2.0。测序结果表明两种方法所沉淀的产物测序效果

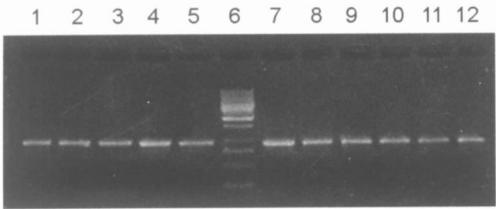


图 4 不同纯化方法对菌落 PCR 产物纯化的电泳图
Fig. 4 . 0.8 % agarose gel electrophoresis of colony PCR products purified with different methods.
1 ~ 5 - 无水乙醇沉淀；6 - 1 kb DNA marker；7 ~ 12 - 醋酸铵乙醇法沉淀。
Lanes 1 - 5, Purification with ethanol；Lane 6, 1 kb DNA marker；Lanes 7 - 12, Purification with NH_4OAc and ethanol.

无显著差别。
2.3 阳性克隆菌落 PCR 产物测序体系的建立及在水稻基因测序中的应用

菌落 PCR 测序本质上就是 PCR 产物测序，测序方法和普通 PCR 产物测序相同，通过大量实验比较，将总反应体系定为 10 μL ，其中 PCR 产物模板用量根据 PCR 产物长度确定，测序混合液 4 μL ，引物 1 μL ，其余为去离子水。测序结果表明同一转化菌的菌落 PCR 产物和质粒测序两者结果相符；对大量实验结果统计表明，只要菌落 PCR 产物为明亮而单一的特异性条带，菌落 PCR 产物测序出峰整齐，色谱峰峰形尖锐整齐，一次性测序成功率为 90 % 左右（短片段为测通，长片段为测序长度 500 bp 以上）。图 5 为随机选取的一菌落 PCR 产物测序尾部电泳图谱，在测序尾部 700 bp 左右仍保持尖锐清晰的峰形。而常规质粒一次性测序成功率（测序长度大于 500 bp）为 66.7 % 左右^[7]。对于菌落 PCR 测序失败的原因进行分析表明，该部分序列基本上都含有 PolyA、PolyT 结构，测序电泳图谱则表现为在经历几个 T 后色谱峰突然变乱，开始出现干扰峰，峰与峰之间难以清楚区别，使测序难以继续（图 6-A）。而常规质粒测序对于几十个 PolyA、PolyT 结构的片段基本上可顺利测序（图 6-B）。

3 讨论

阳性克隆的筛选和测序技术是分子生物学领域最基本

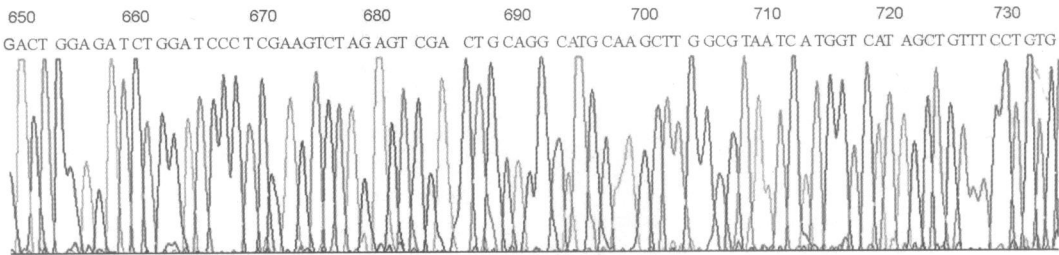


图 5 测序电泳图尾部图例
Fig. 5. Tail portion of sequencing electrophoretogram.

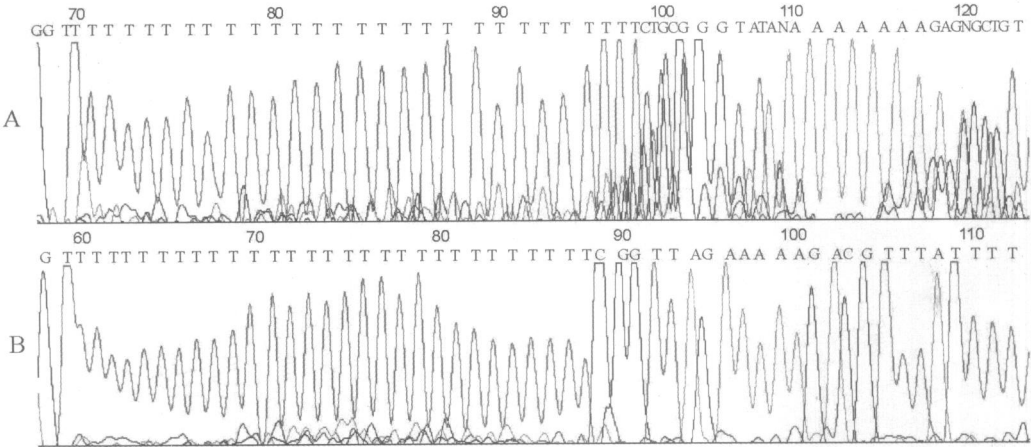


图 6 不同测序方法对具有 Poly T 结构的序列测序的电泳图谱
Fig. 6. Sequencing electrophoretogram of DNA with PolyT by different methods.
A - 菌落 PCR 产物测序；B - 质粒 DNA 测序。
A, Sequencing with colony PCR products；B, Sequencing with plasmid DNA.

的技术之一,在目前的研究中,阳性克隆的筛选鉴定和测序通常是两个独立的过程。虽然近来菌落 PCR 法被引入用来鉴定和筛选阳性转化菌,大大简化了鉴定步骤^[2-5],但仍很少有人从总体角度建立集筛选和测序为一体的菌落 PCR 产物直接测序方法。本研究以水稻基因克隆为材料、以测序为终目的,针对符合测序要求的菌落 PCR 体系的建立至测序的各个环节,着重研究了大规模菌落 PCR 产物直接测序技术及其特点。就本质而言,所谓菌落 PCR 产物直接测序就是以菌落 PCR 产物为 DNA 测序模板进行直接测序,因此本研究的特殊性在于不仅考虑其作为鉴定阳性克隆的可靠性,同时也充分地考虑了测序对测序模板的要求。我们实验室的研究和已有的报道都表明 PCR 产物直接测序的首要条件是 PCR 产物必须具有特异性,这是影响测序成败的关键,只有产生惟一扩增产物时,其产物才能被用来直接测序^[8]。针对这一特点,我们通过大量试验,建立以 0.2 μL 的 10 $\mu\text{mol/L}$ M13 正反向引物为引物、0.25 μL 菌液为模板、退火温度为 54 $^{\circ}\text{C}$,总反应体系为 25 μL 的菌落 PCR 体系,以获得明亮而单一的特异性条带,这是菌落 PCR 测序体系建立的关键和基础。在这个体系中,我们选用载体上的通用引物 M13 正反向引物为测序引物,一方面可以尽可能减少非特异性扩增的产生,另一方面可以方便 PCR 操作,此外,也便于测序时可用 M13 正反向引物为测序引物,避免了 PCR 产物直接测序常因引物不适于测序而造成测序失败。同时,为了避免引物过剩而干扰测序,本体系引物的用量也受到控制,实验证明 0.2 μL 的 10 $\mu\text{mol/L}$ 的引物足以扩增出明亮条带,引物过多不能增加 PCR 产物,反而会引起引物过剩。在进行菌液模板梯度 PCR 时,我们发现菌液过多反而会抑制 PCR 反应,推测这可能是由于菌液中所含 LB 培养基对 PCR 反应会有影响,培养基越多,影响越大,而另一方面,菌液沉淀为模板也引起 PCR 产物减少,菌液沉淀中所含的细菌过多,94 $^{\circ}\text{C}$ 下变性处理,转化菌细胞破裂所产生的蛋白质、细胞壁等杂质也随之增加,从而干扰了 PCR 反应。可见在菌落 PCR 体系中,菌液加量也必须加以控制。

其次,由于 PCR 反应体系残留混合物(dNTPs、引物等)对测序质量有明显不利影响,PCR 产物纯化后其测序质量能明显提高^[8]。我们采用 NH_4OAc 乙醇法和无水乙醇沉淀法纯化 PCR 产物,结果表明,两者都可以作为测序前的 PCR 纯化方法,测序结果没有显著差异。实际上,通过以上的菌落

PCR 体系和纯化体系,产物的特异性和纯度都得到控制,菌落 PCR 测序已转化为普通的 PCR 产物测序,测序时根据电泳结果遵守 PCR 测序的加样原则即在一定长度范围内最适模板用量随 PCR 产物长度增加而增加准确加样即可。

对同聚物的测序一直是测序中的难题之一,我们的研究表明常规质粒测序对于几十个 PolyA、PolyT 结构的片段基本上可顺利测序,但对于过长的同聚物测序成功率很低,普遍认为这可能是由于连续过多消耗某一种 dNTP 引起测序反应中 dNTP 和 ddNTP 之间的比例失调所致。菌落 PCR 产物测序与常规质粒测序结果比较表明,在 DNA 序列无 PolyA、PolyT 结构的情况下,菌落 PCR 测序的一次成功率明显高于同一转化菌的质粒测序,但菌落 PCR 测序在对含 PolyA、PolyT 结构的序列测序时较质粒测序更易受阻。这可能是由于纯化后的质粒不含 dNTP,而无论采用 NH_4OAc 乙醇法和无水乙醇沉淀法纯化 PCR 产物,都可能少量地残留一些 dNTP,而这些残留物可能更易引起测序时 dNTP 和 ddNTP 之间的比例失调。至于具体机理及如何避免还需进一步研究。

参考文献:

- 1 李 华,刘延琳,夏 惠,等. 菌落 PCR 技术在重组质粒筛选与鉴定中的应用. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(9): 35 - 37.
- 2 Gussow D, Clackson T. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucl Acids Res*, 1989, 17(10): 4000.
- 3 Sathe G M, O'Brien S, McLaughlin M M, et al. Use of polymerase chain reaction for rapid detection of gene insertions in whole yeast cells. *Nucl Acids Res*, 1991, 19(17): 4775.
- 4 沈关心,朱慧芬,张 悦,等. 菌落 PCR 和质粒 PCR 对转化菌的筛选. 免疫学杂志, 2000, 16(2): 149 - 151.
- 5 徐 丽,蔡俊鹏. 菌落 PCR 方法的建立及其与常规 PCR 方法的比较. 华南理工大学学报(自然科学版), 2004, 32(5): 51 - 55.
- 6 高其康,毛伟华. 基于 MegaBACE 1000 DNA 分析系统的标准化质粒提取方法. 理化检验, 2002, 338: 106 - 107.
- 7 毛伟华,高其康. 水稻大规模质粒测序影响因素分析. 中国水稻科学, 2004, 18(5): 420 - 425.
- 8 徐元祖,包其郁,牛宇欣. PCR 产物直接测序技术中影响因素的研究. 遗传, 2002, 24(5): 548 - 550.