

文章编号: 1000 1735(2007) 01 0096 04

TAIL-PCR 技术获取树状多节孢融合子的 FSTs 序列

迟彦^{1,2}, 周东坡¹, 平文祥¹, 李姗姗¹, 朱婧¹

(1. 黑龙江大学 微生物重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150080; 2. 大连大学 生物有机化学重点实验室, 辽宁 大连 116622)

摘要: 采用 TAIL-PCR 技术, 对随机选取的 6 个 HDF 68 阳性 T-DNA 转化子进行扩增, 只利用 1 d 的时间, 即获取了 T-DNA 标签侧翼序列(FSTs), 对其序列进行分析后, 分析了影响 TAIL-PCR 扩增的主要因素. 该项研究, 为从 T-DNA 的突变子中分离紫杉醇产生菌产紫杉醇的相关基因提供了一条可行途径, 也为阐明紫杉醇产生菌的代谢途径以及最终构建高产基因工程菌株奠定了基础.

关键词: TAIL-PCR; FSTs; 紫杉醇

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A

由 Liu 和 Whitter 首先研究并报道的热不对称交错 PCR (Thermal Asymmetric Interlaced PCR, TAIL-PCR) 技术^[1], 是一种用来分离与已知标签序列邻近的未知 DNA 序列的分子生物学技术. 该技术因其特异性强, 效率高, 灵敏等优点而在 DNA 标签侧翼序列获得方面有着广泛的应用.

树状多节孢 (*Nodulisporium sylviforme*) HQD33 是周东坡等从东北红豆杉 (*Taxus cuspidata*) 韧皮部中分离到的一株可产紫杉醇 (51.06~125.70 μg/L) 的内生真菌^[2,3]. 以 HQD33 作为原始出发株, 利用原生质体诱变及双亲灭活原生质体融合技术, 最终获得了一株高产融合子, 定名为 HDF 68, 其摇瓶发酵产量提高了 3 倍, 最高可含紫杉醇 448.52 μg/L^[4,5]. 目前, 我们已经通过根癌农杆菌介导的转化方法 (*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation, ATMT) 建立了其遗传转化系统, PCR 及 Southern 杂交证明 T-DNA 已整合到 HDF 68 的基因组中. 本研究随机选取了 6 个 HDF 68 的 ATMT 转化子, 采用 TAIL-PCR 技术, 获取其 T-DNA 标签侧翼序列(FSTs, Flanking Sequence of Tags).

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

ATMT HDF 68 转化子, T1~T6, 本实验室构建; 大肠杆菌 JM109 (*E. coli* JM109), PmD18 T 本实验室保存.

1.2 试剂

LA Taq DNA 聚合酶, IPTG, X-gal, dNTPs, DNA 凝胶回收试剂盒及 DNA 连接试剂盒均购自宝生物工程大连有限公司. 引物合成及测序工作由上海生物工程技术服务公司完成.

1.3 ATMT HDF 68 转化子的基因组 DNA 提取

采用 CTAB 方法提取基因组 DNA. 具体方法参见文献[6].

1.4 TAIL-PCR 引物的设计

根据已插入 HDF 68 基因组中的 T-DNA 边界内侧的 Nos 启动子序列设计 3 个嵌套式特异引物 NOS R1, NOS R2, NOS R3. 按照物种普遍存在的蛋白质的保守氨基酸序列设计 3 个简并引物^[7] AD1, AD2, AD3. 引物序列及分布如图 1.

NOS R1: 5'-GCTAGCTGATAGTGACCTTAGGCGACTT-3'; NOS R2: 5'-CGCGCAATAATGGTTTCTGACGTATGTG-3'; NOS R3: 5'-GGTCTGTCAGTTCCAAACGTAACG-3'; AD1: 5'-NTCGASTWTSGWGT-3'; AD2: 5'-NGTCGASWGANAWGAA-3'; AD3: 5'-WGTGNAGWANCANAGA-3'; S: G/C; W: A/T; N: 任意碱基.

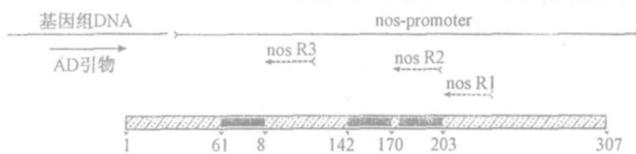


图 1 TAIL-PCR 引物位置图谱

收稿日期: 2006 04 18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30570025)

作者简介: 迟彦(1974), 女, 辽宁营口人, 大连大学讲师, 东北农业大学博士研究生; E-mail: chiyan@dl.cn

周东坡(1941), 男, 黑龙江哈尔滨人, 黑龙江大学教授, 博士生导师; E-mail: zhoudp@hlju.edu.cn

1.5 TAIL PCR 技术获取 HDF 68 转化子的 FSTs 序列

以转化子 T1~T6 基因组 DNA 为模板, 分别利用 3 种简并引物和特异引物进行 3 次半巢式 PCR 反应, 进行扩增. 由于引物中一个为特异引物而另一个为非特异的简并引物, 因此, 在 1 个 PCR 循环过程中, 设定 2 个高退火温度的反应, 使得此时只有长的特异性引物能特异地与模板结合, 并延伸; 一个低退火温度的反应, 使得 2 种引物同时退火并扩增. 通过在 1 个 PCR 循环高退火温度和低退火温度反应的交替使用, 大大增强目的片段在 PCR 产物中的优势.

具体做法见表 1、2 的反应体系及反应程序. 将第 1 次 PCR 反应产物稀释 50 倍用作第 2 次反应的模板, 将第 2 次反应的产物稀释 50 倍用作第 3 次的模板. PCR 反应结束将第 2 次及第 3 次 PCR 产物各取 5 μ L, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳(1 \times TAE Buffer) 观察扩增产物的大小分布.

表 1 TAIL PCR 反应混合液的组成

试剂	第 1 次反应/ μ L	第 2 次反应/ μ L	第 3 次反应/ μ L
10 \times PCR buffer	2.5	2.5	2.5
dNTP Mix (2.5 mmol/L)	4	4	4
AD Primer(100 μ mol/L)	2.5	2	1.5
NOS RSP(20 μ mol/L)	0.5	0.5	0.75
Taq DNA Polymerase (5 U/ μ L)	0.2	0.2	0.2
Template (30 ng/ μ L)	3	1	1
ddH ₂ O up to	25	25	25

表 2 TAIL PCR 反应条件

反 应	温 度 设 置	循环数
第 1 次	94 $^{\circ}$ C, 1 min; 95 $^{\circ}$ C, 1 min	1
	94 $^{\circ}$ C, 20 s; 65 $^{\circ}$ C, 5 s; 74 $^{\circ}$ C, 30 s	5
	94 $^{\circ}$ C, 20 s; 30 $^{\circ}$ C, 30 s; 41 $^{\circ}$ C, 55 s; 52 $^{\circ}$ C, 55 s; 63 $^{\circ}$ C, 55 s; 74 $^{\circ}$ C, 30 s	1
	94 $^{\circ}$ C, 20 s; 68 $^{\circ}$ C, 5 s; 74 $^{\circ}$ C, 30 s; 94 $^{\circ}$ C, 20 s; 68 $^{\circ}$ C, 5 s; 74 $^{\circ}$ C, 30 s; 94 $^{\circ}$ C, 20 s; 44 $^{\circ}$ C, 5 s; 74 $^{\circ}$ C, 30 s	13
	74 $^{\circ}$ C, 1 min	1
第 2 次	94 $^{\circ}$ C, 1 min; 95 $^{\circ}$ C, 1 min	1
	94 $^{\circ}$ C, 20 s; 68 $^{\circ}$ C, 5 s; 74 $^{\circ}$ C, 30 s; 94 $^{\circ}$ C, 20 s; 68 $^{\circ}$ C, 5 s; 74 $^{\circ}$ C, 30 s; 94 $^{\circ}$ C, 20 s; 44 $^{\circ}$ C, 5 s; 74 $^{\circ}$ C, 30 s	10
	74 $^{\circ}$ C, 1 min	1
第 3 次	94 $^{\circ}$ C, 1 min; 95 $^{\circ}$ C, 1 min	1
	94 $^{\circ}$ C, 20 s; 68 $^{\circ}$ C, 5 s; 74 $^{\circ}$ C, 30 s; 94 $^{\circ}$ C, 20 s; 68 $^{\circ}$ C, 5 s; 74 $^{\circ}$ C, 30 s; 94 $^{\circ}$ C, 20 s; 44 $^{\circ}$ C, 5 s; 74 $^{\circ}$ C, 30 s	10
	74 $^{\circ}$ C, 1 min	1

1.6 HDF 68 转化子 FSTs 的 T/A 克隆与鉴定

按凝胶回收试剂盒方法回收第 3 次 PCR 产物, 并按连接试剂盒说明方法将其分别克隆至 pMD18 T 载体上. 连接产物转化 JM109 感受态细胞, 最后在含有 IPTG 和 X gal 的 LB/Amp 平板上筛选白色菌落. 挑取白色菌落, 在 LB/Amp 液体培养基上过夜培养后, 提取质粒 DNA 作为模板, 分别以 pMD18 T 载体上的 RV M 和 M13 47 为引物, 进行 PCR 扩增. 反应条件为 94 $^{\circ}$ C, 1 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 55 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 7 min, 1 个循环.

1.7 HDF 68 转化子 FSTs 的序列分析

利用 pMD18 T 载体上通用引物对阳性转化子进行测序, 利用 Sequencher 软件分析 FSTs 中的 T DNA 边界序列.

2 结果与分析

2.1 HDF 68 转化子的基因组 DNA

HDF 68 转化子 T1~T6 基因组 DNA 的提取结果见图 2. 从图 2 可知, HDF 68 转化子基因组 DNA 条带完整, 无 RNA 污染, 适合于下面的基因克隆.

2.2 HDF 68 转化子的 FSTs 序列鉴定及分析

采用 TAIL PCR 方法, 分别利用 3 种简并引物和特异引物进行 3 次半巢式 PCR 反应, 扩增转化子 T1~T6 的 FSTs, 结果如图 3 显示, 简并引物 AD1 和特异引物的组合在转化子 T1 和 T2 中能够扩增出目的片段, 而利用其他 2 种简并引物 AD2、AD3 进行 PCR 扩增对于 T1~T6 转化子均没有产生特异条带.

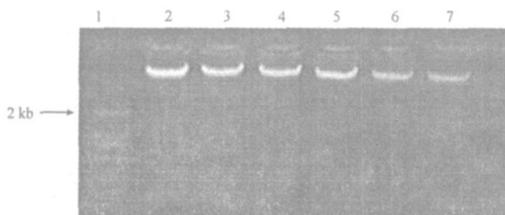


图 2 转化子的基因组 DNA

1: DL2000 Marker; 2~7: 转化子的基因组 DNA

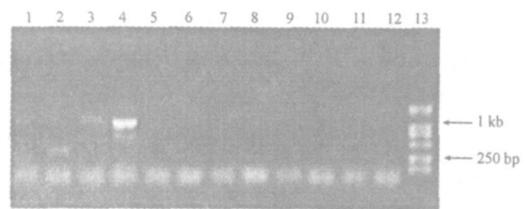


图 3 TAIL-PCR 结果

1,3,5,7,9,11: 转化子 T1~T6 的第 2 次 TAIL-PCR 产物; 2,4,6,8,10,12: 转化子 T1~T6 的第 3 次 TAIL-PCR 产物; 13: DL2000 Marker

将得到的 T1 和 T2 转化子的 TAIL PCR 三级产物回收(回收结果见图 4)后克隆至 T 载体(克隆检测见图 5), 分别挑取 1 个阳性克隆, 过夜培养后送上海生物工程技术公司测序.

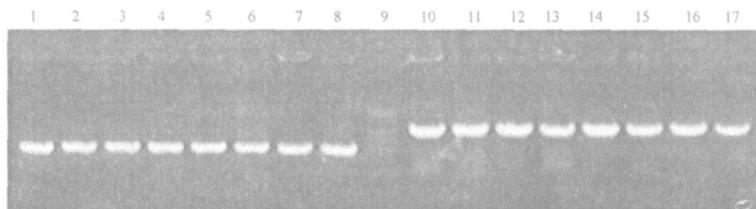
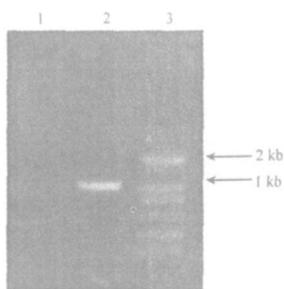


图 4 TAIL-PCR 三级产物的回收
1: 转化子 T1 的第 3 次 TAIL-PCR 产物;
2: 转化子 T2 的第 3 次 TAIL-PCR 产物;
3: DL-2000 Marker

图 5 阳性克隆的 PCR 鉴定
1~8: 转化子 T1 第 3 次 TAIL-PCR 产物的阳性克隆; 10~17: 转化子 T2 第 3 次 TAIL-PCR 产物的阳性克隆; 9: DL2000 Marker

由测序结果及序列分析结果(图 6)表明, 利用 TAIL PCR 技术获得 T1 转化子的 FST 为 350 bp, 其中 0~224 bp 为 HDF 68 基因组序列, 225~350 bp 为 pBI121 43 载体的 T DNA 区, 在 225~350 bp 范围内没有得到 T DNA 的右边界序列, 推测 pBI121 43 载体的右边界序列全部被剪切掉.

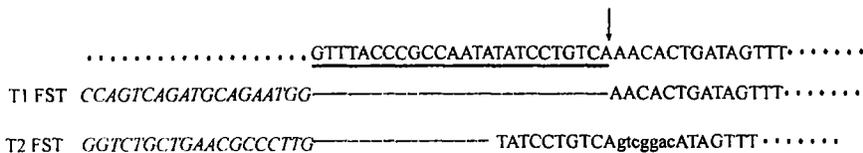


图 6 T1 和 T2 转化子的 FSTs 分析
画线部分表示 T DNA 的右边界序列; 箭头右侧表示右边界旁的载体序列; - 表示截短; 小写字母代表非 T DNA 载体序列; 斜体字母表示真菌基因组序列.

T2 转化子的 FST 为 1 061 bp, 其中 0~926 bp 为 HDF 68 基因组序列, 927~936 bp 为部分 pBI121 43 载体的右边界序列, 其中右边界中有 15 bp 的序列被剪切掉. 937~942 bp 为 pBI121 43 的非转化部分, 即非 T DNA 序列. 943~1 061 bp 为 pBI121 43 载体的 T DNA 区.

T DNA 插入真菌基因组后, 其整合方式因不同情况而进行不同的整合, 当与寄主基因组中有同源序列时, 发生同源重组; 当与寄主基因组中序列不同源时, 发生异常重组. 若发生异常重组事件, 则 T DNA 可能完全整合到宿主基因组上, 也有可能左右臂删除一部分后整合到染色体上^[8,10]. 从以上我们分析的结果看, T DNA 是按照异源重组方式整合进 HDF 68 基因组中, 并且其右边界序列全部被删除或删除了很大一部分. 非 T DNA 区的 7 个碱基的载体序列 CAG GCTG 出现在 T2 FSTs 的序列中(937~942 bp). 这一结果与以往报道^[8,11] 相一致.

T DNA 边界序列的大量截短或删除以及非 T DNA 载体序列的插入, 均有可能影响特异引物的有效结合. 这也一定程度上解释了我们从 T1~T6 转化子中只得到了 2 条特异条带的原因. 另外, 我们所采用的随机简并引物与 HDF 68 转化子基因组 DNA 的结合位点可能有限, 因此也影响了 TAIL PCR 的反应效率.

3 讨论

目前用于分离 T DNA 标签侧翼序列的方法还有很多, 包括杂交法, 反向 PCR 法^[12,13], YADE 法^[14,15] 等, 但以上这些方法操作步骤比较烦琐, 在 PCR 反应以前, 还需要酶切、连接等实验过程, 不但实验周期长, 且多个实验步骤势必也会造成对结果影响因素的增多. 而 TAIL PCR 方法同以上方法相比, 避免了以上烦琐的操作步骤, 具有简单, 特异, 灵敏, 快速等特点而为分子生物学者获取已知序列邻近的未知侧翼序列提供了一条简易而又有效的手段.

本研究在对随机选取的 6 个 HDF 68 的阳性转化子采用 TAIL PCR 技术, 只利用 1 d 的时间, 即获取了转化子的 FSTs 序列, 省去了连接、酶切等烦琐过程, 缩短了实验周期. 经对其序列进行分析后, 分析了影响 TAIL PCR 扩增的主要因素.

目前我们已经获得了 HDF 68 的 T DNA 标记的突变子库, 其中在产紫杉醇能力发生改变的突变子中, 因 T DNA 的插入而失活或突变的基因很可能为 HDF 68 生物合成紫杉醇的相关基因. 分离 T DNA 标签的侧翼序列即可获得 HDF 68 的生物合成紫杉醇的相关基因. 近年来, 红豆杉细胞合成紫杉醇过程中相关酶基因的克隆和鉴定取得了突破性

的进展,然而,迄今还未见有从紫杉醇产生菌中分离到紫杉醇合成相关基因的报道。该项研究,为从 T DNA 的突变子中分离紫杉醇产生菌产紫杉醇的相关基因,为阐明紫杉醇产生菌的代谢途径及最终为构建高产的基因工程奠定了基础。

参考文献:

- [1] LIU Yao guang, ROBERT F Whitter. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable a amplification and sequencing of insert end fragment from Pl and YAC clones for chromosome walking[J]. *Genomics*, 1995, 25: 674 681.
- [2] 周东坡, 平文祥, 孙剑秋, 等. 紫杉醇产生菌分离的研究[J]. *菌物学杂志*, 2001, 21(1): 18 19, 32.
- [3] 周东坡, 孙剑秋, 于寒颖, 等. 中国一新记录属—多节孢属[J]. *菌物系统*, 2001, 20(2): 277 278.
- [4] ZHOU D B, ZHAO K, PING W X, et al. Study on the mutagenesis of protoplasts from taxol producing fungus *Nodulisporium sylviforme*[J]. *The Journal of American Science* 2005, 1: 55 62.
- [5] ZHAO K, ZHOU D P, PING W X, et al. Study on the preparation and regeneration of protoplast from taxol producing fungus *Nodulisporium sylviforme*[J]. *Nature and Science* 2004, 2(2): 52 59.
- [6] 吴志红, 汪天虹, 黄卫, 等. 简便易行的丝状真菌染色体 DNA 提取法[J]. *菌物系统*, 2001, 20(4): 575 577.
- [7] CASAS Flores S, ROSALES Saavedra T, HERRERA Estrella A. Three decades of fungal transformation: novel technologies[J]. *Methods Mol Biol* 2004, 267: 315 325.
- [8] TSUJI G, FUJII S, FUJIHARA N, et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*[J]. *J Gen Plan Pathol*, 2003, 69: 230 239.
- [9] COMBIER JP, MELAYAH D, RAFFIER C, et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 220: 141 148.
- [10] LECLERQUE A, WAN H, ABSCHUTZ A, et al. *Agrobacterium* mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. *Curr Genet*, 2004, 45: 111 119.
- [11] MICHIELSE C B, RAM A F, HOOYKAAS P J, et al. *Agrobacterium* mediated transformation of *Aspergillus awamori* in the absence of full length VirD2, VirC2, or VirE2 leads to insertion of aberrant T DNA structures[J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(7): 2038 2045.
- [12] TRIGLIA T, PETERSON M G, KEMP D J. A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 16(16): 8186.
- [13] 韩志勇, 王新其, 沈革志, 等. 反向 PCR 克隆转基因水稻的外源基因旁侧序列[J]. *上海农业学报*, 2001, 17(2): 27 32.
- [14] PRARSHAR Y, WEISMAN S M. Analysis of differential gene expression by display of 3' end restriction fragments of cDNA[J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 659 663.
- [15] 方卫国, 张永军, 马金成, 等. 用 YADE 法克隆球孢白僵菌类枯草杆菌蛋白酶基因 CDEP 1 的启动子及启动子序列分析[J]. *菌物系统*, 2003, 22(2): 252 258.

Obtaining FSTs of *Nodulisporium sylviforme* fusant by TAIL PCR techniques

CHI Yan^{1, 2}, ZHOU Dong po¹, PING Wen xiang¹, LI Shan shan¹, ZHU Jing¹

(1. Key Laboratory of Microbe Heilongjiang University, Harbin 150080, China;

2. Key Laboratory of Bio organic Chemistry, Dalian University, Dalian 116622, China)

Abstract: TAIL PCR technique was performed to get the flanking sequence of T DNA tags (FSTs) from six randomly selected HDF 68 positive T DNA transformants only in one day time. After analysis of its sequences, the main factors of influencing TAIL PCR amplification were discussed. This study provided a feasible way to separate taxol biosynthesis related genes for taxol producing fungi from T DNA mutants, and also laid solid foundation for clarifying taxol pathway in taxol producing fungi and for finally constructing high yield gene engineering strain.

Key words: TAIL PCR; FSTs; Taxol