

# TAIL-PCR 技术分离柞蚕丝素基因 3 端 非编码区未知 DNA 序列

冷春玲

(辽东学院 农学院生物系, 辽宁 丹东 118003)

**摘要:**以柞蚕基因组 DNA 为材料, 采用热不对称交错 PCR (TAIL-PCR) 技术分离出 1 998 bp 的 DNA 序列。将该序列与 Genebank 上的柞蚕丝素基因 DNA 序列 (AF083334) 进行比较分析结果表明, 新钓取的 DNA 片断中 1 758 bp 的 DNA 序列为柞蚕丝素基因 3 端非编码区未知 DNA 序列。TAIL-PCR 技术为柞蚕丝素基因 3 端非编码区未知 DNA 序列的钓取提供了一种简便、高效的方法。

**关键词:**TAIL-PCR; 丝素基因; 简并引物; 侧翼序列

**中图分类号:**Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)01-0108-04

## TAIL-PCR System for Isolation of an Unknown DNA Sequence Lying Inside the 3 Noncoding Region of the Fibroin Gene

LENG Chun-ling

(Department of Biology, Academy of Agriculture, Eastern Liaoning University, Dandong 118003, China)

**Abstract:** 1 998 bp DNA sequence was isolated here with genomic DNA of *Antheraea pernyi* by Thermal Asymmetric Interlaced PCR (TAIL-PCR). The results from comparing 1 998 bp DNA sequence with the sequence that already landed on the Genebank (AF083334) showed that the DNA sequence (1 758 bp) in the newly isolated DNA segments was an unknown DNA sequence lying inside the 3 noncoding region of the fibroin gene. The method we describe here provides a simple, rapid and efficient means to isolate an unknown DNA sequence lying inside the 3 noncoding region of the fibroin gene.

**Key words:** TAIL-PCR; Fibroin gene; Degenerate primer; Flanking sequences

分离已知 DNA 侧翼未知序列的传统方法是先构建基因组文库, 再利用探针杂交或 PCR 方法筛选目的片段, 此种方法工作量大、费时费力。近年来人们更多地采用反向 PCR 法<sup>[1]</sup>、接头介导的 PCR<sup>[2]</sup>等方法进行侧翼片段的钓取, 这些方法都要依靠待分离未知 DNA 序列中存在的适当酶切位点, 有了这些酶切位点, 才能将酶切片段自身环化成一个环状分子用于反向 PCR 的扩增或者与 DNA 接头连接起来用于加接头 PCR 的扩增。由于待分离侧翼序列中的酶切位点是未知的, 在运用反向 PCR 法获得目的片断时, 要对基因组 DNA 进行多种不同的限制性内切酶的切割、环化和 PCR 扩增, 才可能获得目的片断。这一过程受酶切片段长短、自身环化效率等多种因素的影响; 加接头 PCR 法, 尽管有多种试剂盒都在力图通过修饰接头的结构增加特异性, 但特异

性还是较差, 若要完全抑制非特异扩增仍然很困难。

热不对称交错 PCR (Thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR) 是由 Liu 和 Whittier<sup>[3]</sup>首先研究并报道的, 是一种用来分离已知 DNA 序列侧翼未知序列的技术。该技术用较高的退火温度和三轮半套式 PCR 扩增, 很好地解决了上述基因组 DNA 的酶切、连接等繁琐操作和非特异扩增问题<sup>[4,5]</sup>。为了从柞蚕基因组 DNA 中更加有效地钓取目的片断, 本试验在原有 TAIL-PCR 方法的基础上, 针对柞蚕丝素基因 DNA 序列的特点, 进行了一些改变: 设计相对较长的嵌套特异引物 (30 个碱基) 来提高退火温度, 以增加目的片段扩增的特异性和准确率。在第三次 PCR 反应中, 采用两个套式特异引物和增加一次温度非对称循环, 提高第三次 PCR 反应的特异性。

1 材料和方法

1.1 柞蚕品种

柞蚕 741 由辽宁省蚕业科学研究所提供。

1.2 菌株和载体

大肠杆菌 DH5 和 pMD18-T 载体为大连 TaKaRa 公司产品。

1.3 试剂和仪器

LA Taq PCR 试剂盒、DNA 片段回收试剂盒、T4-DNA 连接酶均为大连 TaKaRa 公司产品,其他试剂均为国产分析纯。高速冷冻离心机、Mastercycler gradient 5331PCR 仪(Eppendorf,德国),凝胶成像系统 CDS800(UVP,美国)。

1.4 引物的设计与合成

根据柞蚕丝素基因序列(AF083334),在靠近丝素基因 3 末端的已知区域,设计 4 个嵌套特异引物,引物位置如图 1 所示。引物 F1、F2、F3 和 F4 之间的间隔距离分别为 67、84 和 362 bp。为了增加特异性,设计引物长度为 30 bp。引物序列如下:

F1:5'-GTCGGAATTATGGAACAGACGATGCCTTC-3',  
 $T_m=66.8$  ;  
F2:5'-CCGICATCAAGTGGIAGATCTACTGAAGGT-3',  
 $T_m=66.8$  ;  
F3:5'-TACGAATGTGATTTCCTCTATATTGACCG-3',  
 $T_m=62.7$  ;  
F4:5'-CTGGIATATGAACTGTTTCACGGGGTAT-3',  
 $T_m=64.0$  。

参照 Liu<sup>[3]</sup>等,设计用于 TAIL-PCR 的简并引物 AD1、AD2、AD3 和 AD4,序列如下:

AD1:5'-NTCGA (G/C) T(A/T) T(G/C) G(A/T)  
GTT-3', $T_m=45.3$  ;  
AD2:5'-NGTCGA (G/C) (A/T) GANA(A/T) GAA-  
3', $T_m=46.6$  ;  
AD3:5'-(A/T) GTGNAG(A/T) A NCANAGA-3',  
 $T_m=45.3$  ;  
AD4:5'-AG(A/T) GNAG(A/T) A NCA(A/T)  
AGG-3', $T_m=46.6$  。

F1 - F4. 嵌套特异引物;AD. 简并引物。  
F1 - F4. Nesting special primer;AD. Degenerate primer.

图 1 嵌套特异引物示意图

Fig. 1 Schematic diagram of nesting special primer

1.5 TAIL-PCR 扩增

TAIL-PCR 反应液组成见表 1,反应参数见表 2。TAIL-PCR 共分 3 次反应。第一次 PCR 反应包括 5 次高特异性循环、1 次低特异性循环和 15 次热不对称循环反应;第二次 PCR 反应,将第一次 PCR 反应产物稀释 1 000 倍用作模板,通过 12 次热不对称循环反应使特异产物选择性放大;第三次 PCR 反应,又将第二次 PCR 反应产物稀释 1 000 倍用作模板,再通过 15 次热不对称循环反应,使特异产物进一步得到放大。通过以上 3 次 PCR 反应可获得与已知序列邻近的目标序列。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 1 TAIL-PCR 反应混合液的组成

Tab.1 Composition of TAIL-PCR reaction mixture			
反应液组成成分 Composition	第一次 PCR/ $\mu$ L First	第二次 PCR/ $\mu$ L Second	第三次 PCR/ $\mu$ L Third
10 $\times$ LA Buffer	5	5	5
2.5 mmol/L dNTPs	8	8	8
100 $\mu$ mol/L AD	1	1	1
20 $\mu$ mol/L SP	0.5	0.5	0.5
ddH <sub>2</sub> O	34.55	34.0	34.0
LA Taq(5 U/ $\mu$ L)	0.75	0.5	0.5
柞蚕基因组 DNA	1 (100 ng)	1 (稀释 1 000 倍的一次 PCR 产物)	1 (稀释 1 000 倍的二次 PCR 产物)

1.6 PCR 产物的克隆及测序

TAIL-PCR 扩增产物,经琼脂糖凝胶电泳,切胶回收目的带,用 T4-DNA 连接酶克隆到 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞,PCR 筛选阳性菌落,提取并纯化质粒进行测序鉴定。运用 Sequencer 软件和 BLAST 程序分析新钓取 DNA 片段的正确性。

1.7 新钓 DNA 序列的鉴定

在新钓取 DNA 的 3 末端设计引物 R(5'-CTGAAAAGGGAAA ACCATGCTTGA-3'),以柞蚕基因组 DNA 为模板,分别用 3 对引物 F1/ R1、F2/ R1 和 F3/ R1 进行 PCR 扩增。50  $\mu$ L 反应体系中含有 1  $\mu$ L 基因组 DNA(100 ng/ $\mu$ L),引物各 1  $\mu$ L(20  $\mu$ mol/L),8  $\mu$ L(2.5 mmol/L) dNTP,5  $\mu$ L 10(LA Buffer,0.5  $\mu$ L(10

U/ $\mu$ L) LA *Taq* 和 33.5  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O。反应条件为 98 预循环;后延伸 72 5 min。扩增产物经 1 % 琼脂糖凝胶电泳检测。

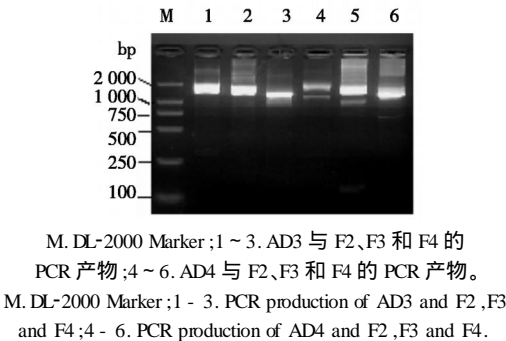
表 2 TAIL-PCR 反应参数

Tab. 2 Parameter of TAIL-PCR reaction					
轮次与引物组成	步骤顺序	循环次数	PCR 循环参数		
Rounds and primer compositions	Steps	Cycles	PCR cycles parameter		
一次 PCR (AD/ F1)	1	1	93	,1 min;98	,1 min
	2	5	94	,30 s;65	,1 min;72 ,2.5 min
	3	1	94	,30 s;25	,3 min;72 ,2.5 min
	4	15	94	,30 s;68	,1 min;72 ,2.5 min
			94	,30 s;68	,1 min;72 ,2.5 min
			94	,30 s;44	,1 min;72 ,2.5 min
二次 PCR (AD/ F2)	5	1	72	,10 min;4	,保存
	1	12	94	,10 s;64	,1 min;72 ,2.5 min
			94	,10 s;64	,1 min;72 ,2.5 min
三次 PCR (AD/ F3 or AD/ F4)			94	,10 s;44	,1 min;72 ,2.5 min
	2	1	72	,10 min;4	,保存
	1	20	94	,10 s;64	,1 min;72 ,2.5 min
			94	,10 s;64	,1 min;72 ,2.5 min
			94	,10 s;44	,1 min;72 ,2.5 min
	2	1	72	,10 min;4	,保存

2 结果与分析

2.1 侧翼未知序列的分离

运用简并引物 AD1、AD2、AD3 和 AD4 分别与 4 个特异引物 F1、F2、F3 和 F4 进行 TAIL-PCR 扩增,结果 AD1 和 AD2 与 4 个特异引物的 PCR 扩增产物没有出现特异条带。而 AD3 和 AD4 除 F1 之外,其他组合的 PCR 产物均出现很强的特异性条带,而且相互间表现出良好的预期嵌套的长度梯度(图 2),初步可以认为已获得了所需目的 DNA 片段。



M. DL-2000 Marker;1~3. AD3 与 F2、F3 和 F4 的 PCR 产物;4~6. AD4 与 F2、F3 和 F4 的 PCR 产物。

M. DL-2000 Marker;1-3. PCR production of AD3 and F2, F3 and F4;4-6. PCR production of AD4 and F2, F3 and F4.

图 2 TAIL-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of TAIL-PCR production

2.2 PCR 产物的克隆和鉴定

用引物 F2/ AD3 和 F2/ AD4 扩增的 PCR 产物克隆到 pDM18-T 载体进行测序。测序结果表明,钓取 DNA 片段长度为 1 998 bp,而且 5 端 240 bp 左右的 DNA 序列与柞蚕丝素基因序列 (Genebank, AF083334) 3 端的 DNA 序列完全相同,说明所分离的新片段为柞蚕丝素基因 DNA 未知侧翼序列(图

3)。将用引物 F2/ AD3 扩增 PCR 产物的测序结果,作为柞蚕丝素基因 3 端非编码区侧翼未知 DNA 序列,已经登陆在 DDBJ,EMBL 和 Genebank 上,接收序列号为 AY664874。

2.3 未知序列的再次鉴定

以柞蚕基因组 DNA 为模板,分别以 F1/ R、F2/ R 和 F3/ R(R:5'-CTGAAAAGGGAAAACCATGCTTGA-3') 3 对特异引物进行 PCR 反应。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳结果,可扩增出特异 DNA 片段,进一步证实了新钓取 DNA 片段的正确性(图 4)。

3 讨论

自从 1995 年 TAIL-PCR 技术被成功应用于 YAC 和 P1 文库筛选以及 T-DNA 插入侧翼的钓取以来,该方法已被广泛应用于已知 DNA 侧翼未知序列的分离<sup>[3]</sup>。与反向 PCR、加接头 PCR 等方法相比,TAIL-PCR 技术具有简单、快速、高效、特异性强等特点<sup>[6-8]</sup>。但 TAIL-PCR 技术也存在一些缺陷,如需要进行较多的引物组合和温度非对称循环条件的摸索等。

TAIL-PCR 反应的成功与否与嵌套特异引物的设计有直接关系。为了提高 PCR 反应的特异性,本试验采用相对较长的嵌套特异引物,使其具有较高的退火温度,来减少假阳性条带出现的几率。试验结果证明,使用较长的特异性引物,可明显提高 TAIL-PCR 反应的特异性。另外,在第三次 PCR 反应中使用两个套式特异引物和再一次的温度非对称循

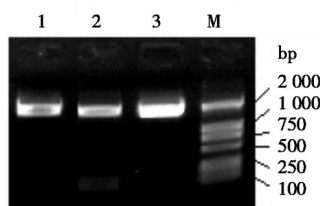
1.....8941-CGACAAGTCGGAATTTATGGAACAGACGATGGCTTCGTATTAGATGGAGGTTACGATTCAGAGGGATCAGCGCGCGCGCGG  
CAGCGGCACAGCAGCTGCG-GCGTCATCAAGTGGTAGATCTACTGAAGGTCATCCACTTCTTTCGATATGTCTGACGGCCGTGTCTCACAG  
1-GCGTCATCAAGTGGTAGATCTACTGAAGGTCATCCACTTCTTTCGATATGTCTGACGGCCGTGTCTCACAG  
TCATAGCTATGAAGCTTCCAGAATTTCCGTCCACTAATTAATACGAATGTGATTTCCTTTATATTGACCGGATACCTTTTATTTTATTT  
TCATAGCTATGAAGCTTCCAGAATTTCCGTCCACTAATTAATACGAATGTGATTTCCTTTATATTGACCGGATACCTTTTATTTTATTT  
CTTTATCAATAAATAACAGCATGTGAAAATGAGTTTAAATATACTTATTTATGCCTAGAGTCATCTTACCTTGGATCC-9282  
CTTTATCAATAAATAACAGCATGTGAAAATGAGTTTAAATATACTTATTTATGCCTAGAGTCATCTTACCTTGGATCC-CATGGATAAACC  
TGTTTCTTTTTCTGATTCTGTTTTTTGAACATACAGGAGATATATTATTACGTTTGTAAAGTTGTACCATGGCTCCGAGAGGCATAATCTA  
ACGATTTCTTTACTATCTTAACACCTTTTAGCGAATTATAATGCAATTACATGTCATGCAAAATGGCTATAAGTAGCTTTTTTACTTTTA  
ACTGTCGACTTTTTTACATTACACCCACAATAGTTGCTCGGTTAACCGTGTCAAGTTCGAAAACAGCTGGTATATGAAGTGTTCACGG  
GGTATATGAAATGTATTCGACTAAGCCGCGTTTCATTGTGAGCAAAATCATATGCATCTGCCGGGTGACTAGCGTTAAAAATGAAGTTTAA  
GTCAGAAAGTCGCTGTTGTGTTAGATGGCACTGACTTAGTTGTATATCCGGGTGCAACTATTTTATAGGGTAACACATGACCTATAA  
TATACAAAGATACTGCACACCTCTAAAAATTAAGGTTTCAACACAACAAACGGTAGAGCATAATCTAAAGAAAATACAATATTAATTTAC  
GTTTTGCTTAAACCTAGATTGATAAGGAACGAGTGTCTCTTGAATCGTCTGGGTCGATTATCATCTACTATTAGGGAGCTGATC  
AGTTTCATATGAATTTTCTGAGTTTGTGAGTCCGTAGAATGTTTGGATCATTTTTATTGAACCAACATAGCAAAATCGGCATTTTC  
ATTATTCGATAAAGAGAATCTGTCCCGAAGTGTGCAAGTGACGCTGTTCAAGTAAAGTGGTAGTAGTTAAACAATTTGGTCTGTGTGAGA  
CTTCCATTAATTTCTTTTAAAGTACTGATTTTATAAAGCGGAGTGCCCTGTCAATAACCTCAGCTGCCGTCCACTTTTGGACGCGCGC  
CCTATGGTCGAGCAAACTCGAACACCGACCGTAACGAAATCTTCGATAAGGCCGGATATGCACCGACTTTGCTCTCGGGATGCTTTT  
ATATTCTTTCAGGACTTGGTCTAAGCTCGTCTAAGTTATCTACTCAAAATGTTTACCAAAAATACTCCGCCGCGGCTACTCTAGTATAGT  
ATTTTCGCAACTTCTATATCAAAACAAAACCTTCGCAATCATCGTAGTCAAAACGCGTGTTCATGAGTGGCTTTTTTAAAGTTTATTACAT  
TGATTTTACACCGTTTTTCAGAGTCTTCAATACCAGCAATATATAGAACTAGTAATCGTGTGCGTTATTATACATTTATCATATAATATC  
TGCAATTAACAAGATCCAAATGATGGATCACCATCATTAAGTACACAGATAATCCGTAATAAGAGACAACGCAATATGTATACGTT  
GTCACAGTCGAGATGGAATAACCAAGGATGTAATAACGAACGCGGTGGTGGATCTCGTTGTTGAAGCAAGTACCACATCCCTATATAGA  
TTTTCTATTGTGAGTCTAAGTAAAGCCAGTATACAAATCTTCATTCTAACAACCTCTTATGTGCCCTCATGCAATATCTTAATATTGGCA  
TTCTTAATGCCTTCATGCAATATTACATTTATATAATACCGAGCTCTATCGACAGATAAGCTGTTTTTGGCATCAAGCATGGTTTTCCCT  
TTTCAGATGTAATTTTACTGGAGTAGCCGTGAATTATATAATGGGAAATATTTTGGACGCATTATCTGACTGTATCTCTGCTACTACACT

粗体字部分为序列号 AF083334DNA 序列与新钓取的 AY664874DNA 序列  
的重叠部分;带有下列线的部分为引物 F2 和 R 的位置。

Sequence of Chinese Oak Silkworm bold for overlap section of sequence AF083334DNA and newly isolated  
sequence AY664874DNA ;underline for primer F2 and R.

图 3 柞蚕丝素基因 DNA 序列( Genebank, AF083334) 与新钓 DNA 序列的分析比较

Fig. 3 Comparison of fibroin gene DNA sequence( Genebank, AF083334) and newly isolated gene.



M. DL-2000 Marker; 1. 引物 F1 和 R 的 PCR 产物;  
2. 引物 F2 和 R 的 PCR 产物; 3. 引物 F3 和 R 的 PCR 产物。  
M. DL-2000 Marker; 1. Production of primer F1 and R;  
2. Production of primer F2 and R; 3. Production of primer F3 and R.

图 4 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of PCR production

环,可增加目的片段的丰度和特异性。如果第二次或第三次 PCR 扩增产物中非特异扩增背景很浓,则这一改进更为必要。本试验通过改进的 TAIL-PCR 技术,分离出柞蚕丝素基因 3 端侧翼未知 DNA 序列,为进一步完善 TAIL-PCR 技术及其灵活运用提供了依据。运用 TAIL-PCR 技术获得未知序列的报道很多<sup>[9-11]</sup>。本试验结果也再次证明 TAIL-PCR 是一种简单、快速、高效分离未知 DNA 序列的好方法。

#### 参考文献:

[1] Liu Yao-Guang, Robert F Whitter. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert

end fragment from P1 and YAC clones for chromosome walking[J]. Genomics, 1995, 25: 674 - 681.  
[2] Trigla 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 Res, 1988, 16 (16) : 8186.  
[3] Warshawsk D, Miller L. A rapid genomic walking technique based on ligation-mediated PCR and magnetic separation technology[J]. Biotechniques, 1994, 16: 792 - 798.  
[4] Liu Yao-Guang, Norihiro M, Teroko O, et al. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR[J]. The Plant Journal, 1995, 8 (3) : 457 - 463.  
[5] Liu Yao-Guang, Huang N. Efficient amplification of insert end sequences from bacterial artificial chromosome clones by thermal asymmetric interlaced PCR [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1998, 16 (2) : 175 - 181.  
[6] 许 锋,程水源,王 燕. TAIL-PCR 方法快速克隆银杏查尔酮合成酶基因及序列分析[J]. 果树学报, 2007, 24 (2) : 237 - 243.  
[7] 杨梦莹,龙慈凡,李晓华. TAIL-PCR 方法扩增稀有放线菌小单孢菌中 C31 的 attB 序列研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35 (22) : 6729 - 6732.  
[8] 邵彦春,丁月娣,陈福生. TAIL-2PCR 法快速分离红曲霉色素突变株 T2DNA 插入位点侧翼序列[J]. 微生物学通报, 2007, 34 (2) : 323 - 326.  
[9] Wang P G, Chen J, Zheng A H. Expression cloning of functional receptor used by SARS coronavirus [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315 (2) : 439 - 444.  
[10] 杨 帆,林俊芳,苗灵凤,等. 利用 TAIL-PCR 和 RT-PCR 技术克隆云芝植酸酶基因[J]. 应用与环境生物学学报, 2006, 12 (5) : 618 - 622.  
[11] 苗灵凤,刘运广,杨 帆. TAIL-PCR 技术及其在医学上的应用[J]. 重庆医学, 2007, 36 (10) : 980 - 982.