

产物可直接进行“TA”克隆的高保真 PCR 法

孙达权, 张钦真, 胡桐, 湛钊, 石松, 薛殿婷 (贵州医科大学基础医学院, 贵州贵阳 550025)

摘要 [目的]介绍一种 PCR 产物直接进行“TA”克隆的高保真 PCR 法,减少高保真 PCR 产物“TA”克隆的中间步骤。[方法]Trizol 法提取人肝癌细胞 SMMC-7721 总 RNA,并将 mRNA 反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板,联合不同特性的 *Taq* DNA 聚合酶扩增 *PKC* 基因的蛋白编码区。PCR 产物经纯化后进行“TA”克隆、细菌转化、筛选培养、质粒抽提、酶切鉴定和测序鉴定等。[结果]高保真 DNA 聚合酶扩增的 PCR 产物未发现 DNA 突变,但不能直接进行“TA”克隆。*Taq* DNA 聚合酶扩增的产物可直接进行“TA”克隆,但其内部存在多个突变位点,保真性明显不足。联合使用高保真 DNA 聚合酶和 *Taq* DNA 聚合酶(双酶联用)扩增的 PCR 产物可直接进行“TA”克隆,且 DNA 测序未发现突变。[结论]双酶联用 PCR 可以获得高保真 PCR 产物,并直接进行“TA”克隆。

关键词 聚合酶链式反应;DNA 聚合酶;“TA”克隆;DNA 突变

中图分类号 Q 78 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)05-0109-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.05.030

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



A High-fidelity PCR Method with Its Product Used in “TA” Cloning Directly

SUN Da-quan, ZHANG Qin-zhen, HU Tong et al (School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025)

Abstract [Objective] To introduce a high-fidelity PCR method with its product used in “TA” cloning directly, which could simplify the “TA” cloning step. [Method] Total RNAs were extracted from human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 by Trizol reagent, and the mRNAs were reverse transcribed into cDNAs. Employing cDNAs as the templates, the cDNA region that codes protein of *PKC* was amplified by different types of DNA polymerases. The PCR products were subjected to a series of processes such as “TA” cloning, bacterial transformation, screening culture, plasmid extraction, restriction enzyme digestion and DNA sequencing. [Result] No DNA mutation was found in the product of PCR amplification with high fidelity DNA polymerase, but the product could not be linked directly to T vector. On the other hand, the product of PCR amplification with *Taq* DNA polymerase could be cloned into T vector directly, but it possessed multiple DNA point mutations and its fault was low fidelity. The product of PCR amplification with an alliance of high fidelity DNA polymerase and *Taq* DNA polymerase could be directly inserted into T vector without any point mutation. [Conclusion] Combined utilization of high fidelity DNA polymerase and *Taq* DNA polymerase in PCR can obtain high fidelity PCR product which is utilized in “TA” cloning directly.

Key words Polymerase chain reaction; DNA polymerase; “TA” cloning; DNA mutation

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)起源于美国 Cetus 公司,是由 Mullis 和 Saiki 发明的一种用于体外快速扩增 DNA 的技术,也是分子生物学领域中最经典、最常用的一种实验方法,主要用于基因克隆和检测^[1-3]。由于其过程简单、实验周期短、重复性好,因而成为现代分子生物学领域中最基本和最受欢迎的方法之一^[4-5]。根据扩增所使用的 DNA 聚合酶不同,可将 PCR 分成普通 PCR 和高保真 PCR。常用的 *Taq* DNA 聚合酶是一种从嗜热细菌 *Thermus aquaticus* 中分离的 DNA 聚合酶,其特点是可以耐受高温而不变性^[6-7]。它扩增出来的 PCR 产物的 3' 末端带有突出的“A”,但其内部常常含突变位点。高保真 DNA 聚合酶来源各有差异,如 Vent 来源于 *Thermococcus litoralis*, pfu 来源于 *Pyrococcus furiosus*,或由这 2 种酶的基因突变和改造而来^[8-9]。它扩增出来的 PCR 产物具有较高的保真性,但其 3' 末端为平末端,不能直接进行“TA”克隆,需要对产物 3' 端额外加“A”后才能进行“TA”克隆。此外,也有公司推出了平末端克隆技术,但其克隆效率不理想,大大限制了其利用和推广。

目前在保证 PCR 产物具有较高保真性的同时还能直接进行“TA”克隆的方法鲜见报道。该研究在前人的技术基础上,利用高保真 DNA 聚合酶的高保真性和 *Taq* DNA 聚合酶的加“A”特性,通过联合使用来有效解决这一问题。

1 材料与方法

1.1 材料 RPMI-1640 细胞培养液来源于 GIBCO 公司(美国),新生牛血清来源于杭州四季青(中国),人肝癌细胞 SMMC-7721 来源于中国科学院上海细胞库(中国),Trizol 来源于 Invitrogen 公司(美国),反转录试剂盒、DNA A-Tailing Kit、*Z-Taq*TM DNA 聚合酶、LA *Taq*[®] DNA 聚合酶、PrimeSTAR[®] GXL DNA 聚合酶、TA 克隆试剂盒(pMD18-T vector)、DNA 凝胶回收试剂盒、*Xho* I 和 *Bam*HI 来源于大连宝生物公司(中国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养。用含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 细胞培养基在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 SMMC-7721 细胞,待细胞长到 80% 时备用。

1.2.2 引物设计和测序。基因 *PKCε* (NM_005400) PCR 引物和 DNA 测序委托广州 Invitrogen 公司完成。*PKCε* 上游引物序列为 5'-TCTCGAGCGACCATGGTAGTGTCAATGGCC-TTC-3',下游引物序列为 5'-TGGATCCCAGGGCATCAG-GTCTTCACCAAAGTAG-3'。

1.2.3 Trizol 法抽提肝癌细胞总 RNA。当 SMMC-7721 细胞在 6 cm 的培养皿中生长融合至 80% 时,用无菌 PBS 清洗培

基金项目 国家自然科学基金项目(81560390);贵州省科学技术基金项目(黔科合基础[2017]1147);贵州省大学生创新创业项目(201710660034,2018520351)。

作者简介 孙达权(1981—),男,浙江慈溪人,副教授,博士,从事生物化学与分子生物学研究;张钦真(1996—),男,贵州毕节人,从事临床医学研究。孙达权与张钦真为共同第一作者。

鸣谢 贵州医科大学基础医学科学研究中心张庆海、吴晓娟、翟素珍、高杰。

收稿日期 2019-08-15;修回日期 2019-08-28

养皿中的细胞3次。然后加入1 mL Trizol,反复吹打直至细胞全部裂解。将裂解后的液体转移到RNase-free的1.5 mL离心管中,加入200 μ L 氯仿,剧烈振荡15 s,4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min离心10 min。将水相溶液转移入新的RNase-free的1.5 mL离心管中,并加入500 μ L 异丙醇,倒置混匀后7 500 r/min离心5 min,弃去上清液。白色沉淀用DEPC处理过的75%乙醇清洗2次,每次7 500 r/min离心5 min。室温自然干燥3 min,用100 μ L RNase-free ddH₂O溶解沉淀,即为RNA溶液,浓度定量至1 mg/mL,-80 $^{\circ}$ C冻存。

表1 PCR反应组分及反应程序

Table 1 Reaction components and procedures of PCR

操作步骤 Steps	原料名称 Material name	反应管1 Reaction tube 1	反应管2 Reaction tube 2	反应管3 Reaction tube 3
添加 PCR 反应组分 Adding PCR reaction components	PCR 反应缓冲液	2 \times GC 缓冲液 I, 25 μ L	5 \times G \times L 缓冲液, 10 μ L	5 \times G \times L 缓冲液, 10 μ L
	dNTPs (2.5 mmol/L)	4 μ L	4 μ L	4 μ L
	上下游引物 (10 μ mol/L)	各 1 μ L	各 1 μ L	各 1 μ L
	cDNA 模板	1 μ L	1 μ L	1 μ L
	DNA 聚合酶	LA <i>Taq</i> [®] , 0.25 μ L	G \times L, 1 μ L	G \times L, 1 μ L
	灭菌水	17.75 μ L	32 μ L	32 μ L
首次 PCR First time PCR	程序: 94 $^{\circ}$ C 120 s; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 28 个循环			
添加组分 Adding components	DNA 聚合酶	—	Z- <i>Taq</i> [™] , 0.5 μ L	—
再次 PCR PCR again	程序: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 3 个循环; 72 $^{\circ}$ C 300 s			

1.2.5 “TA”克隆。将上述3管PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶回收试剂盒回收DNA,并用无菌水定容至0.4 mg/mL。反应1、反应2、反应3的纯化产物分别标记为Tube 1、Tube 2、Tube 3。取一部分Tube 3纯化的DNA产物,按DNA A-Tailing Kit说明书对DNA进行加“A”,并将产物标记为Tube 4。对Tube 1、Tube 2、Tube 3、Tube 4中的DNA进行“TA”克隆,其中反应液配制如下:各取上述纯化产物0.4 μ g,并各自加入pM18-T vector 1 μ L,用ddH₂O将体积补足至5 μ L,再各自加入solution I 5 μ L,4 $^{\circ}$ C反应过夜。

1.2.6 细菌转化和鉴定。取100 μ L感受态细菌置于冰浴中,将连接产物加入到感受态细菌中,冰浴30 min、42 $^{\circ}$ C热激60 s、冰浴2 min、加入900 μ L LB细菌培养基,37 $^{\circ}$ C复苏1 h,取200 μ L菌液涂布于Amp⁺ LB固体培养基中,37 $^{\circ}$ C培养过夜。挑取克隆菌落扩大培养,质粒提取后用限制性核酸内切酶(*Xho* I/*Bam* H I)酶切鉴定,并进行DNA测序鉴定。

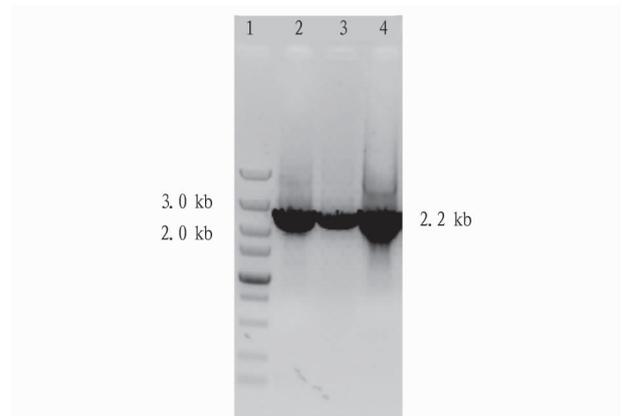
2 结果与分析

2.1 双酶联用PCR可扩增出PKC ϵ 的编码区DNA片段用LA *Taq*[®] DNA聚合酶、双酶(PrimeSTAR[®] G \times L/Z-*Taq*[™] DNA聚合酶)、PrimeSTAR[®] G \times L DNA聚合酶分别作为PCR反应的DNA聚合酶,琼脂糖凝胶电泳结果显示均可以扩增出靶基因PKC ϵ 的编码区DNA片段,其分子量约为2.2 kb,与理论长度一致(图1)。

2.2 双酶联用PCR产物可直接进行TA克隆将纯化的3管PCR产物和用高保真PCR扩增并加“A”的产物分别进行“TA”克隆,其结果如图2所示。由于PrimeSTAR[®] G \times L DNA聚合酶是一种高保真DNA聚合酶,其DNA产物的3'末

1.2.4 RT-PCR与PCR。取2 μ g RNA,按反转录试剂盒PrimeScript[™] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明书操作,将mRNA反转录成cDNA。用不同特性的*Taq* DNA聚合酶按表1配制PCR反应液,并按程序进行PCR扩增。其中,LA *Taq*[®] DNA聚合酶的特性是长链DNA扩增、产物3'末端有突出“A”、高保真性低;PrimeSTAR[®] G \times L DNA聚合酶的特性是长链DNA扩增、产物3'末端为平末端、高保真性强;Z-*Taq*[™] DNA聚合酶的特性是短链DNA扩增、产物3'末端有突出“A”、高保真性低。

端是平末端,所以TA克隆不能成功(图2C);当用加“A”试剂盒对其产物3'末端加“A”后,其TA克隆成功(图2D)。另外,用LA *Taq*[®] DNA聚合酶、双酶联用(PrimeSTAR[®] G \times L/Z-*Taq*[®] DNA聚合酶)扩增产生的PCR产物均可以直接进行TA克隆(图2A和2B),说明双酶联用PCR扩增出的DNA产物的3'末端有突出“A”,可直接进行“TA”克隆。

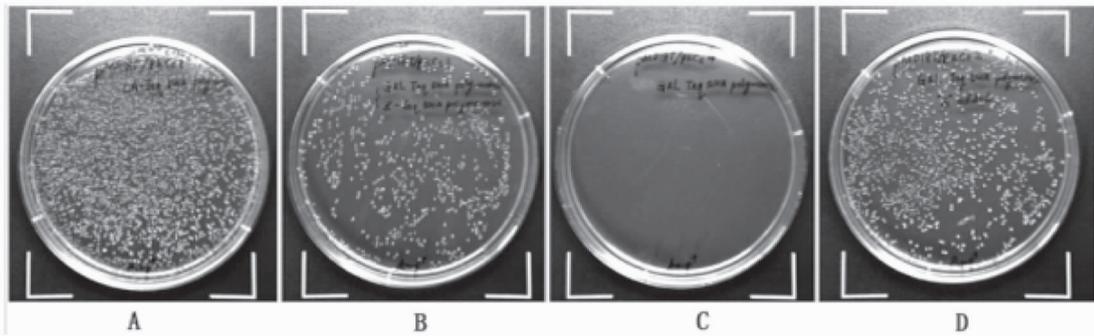


注:1. DL5000 DNA Marker;2. LA *Taq*[®] DNA聚合酶;3. 双酶联用(PrimeSTAR[®] G \times L/Z-*Taq*[™] DNA聚合酶);4. PrimeSTAR[®] G \times L DNA聚合酶

图1 双酶联用PCR扩增靶基因PKC ϵ 的蛋白编码区

Fig. 1 Amplification of target gene PKC ϵ coding protein region by PCR with linkage of two types of *Taq* DNA polymerase

2.3 双酶联用PCR扩增的产物具有高保真性不同来源的单克隆菌落经扩大培养,质粒抽提和*Xho* I酶切鉴定后,发现T载体中所含有的靶序列长度均一致(图3)。对这些质



注:A. LA *Taq*[®] DNA 聚合酶;B. 双酶联用(PrimeSTAR[®] G×L/ Z-*Taq*[®] DNA 聚合酶);C. PrimeSTAR[®] G×L DNA 聚合酶;D. PrimeSTAR[®] G×L DNA 聚合酶扩增,产物经加“A”处理

图 2 PCR 产物的“TA”克隆

Fig. 2 “TA” cloning of PCR products

粒进行 DNA 测序,测序结果显示用 LA *Taq*[®] DNA 聚合酶扩增的 2.2 kb 的 DNA 产物中存在多处点突变和缺失突变,其中一株克隆菌落中的靶 DNA 有 6 处点突变;而用 PrimeSTAR[®] G×L DNA 聚合酶和双酶联用扩增的 PCR 产物具有高度保真性,无基因突变。说明双酶联用可以保证 PCR 扩增产物的高保真性。

面,PCR 主要用于体外高效扩增靶基因或目的 DNA,是当今科研工作者获取靶 DNA 的主要方法之一。这种技术主要依赖于高品质的 *Taq* DNA 聚合酶,即酶的属性决定扩增产物的品质。目前,不同商业公司已针对客户不同的需求开发了多种不同特性的 DNA 聚合酶,这些酶在靶基因获得上起着重要的作用。

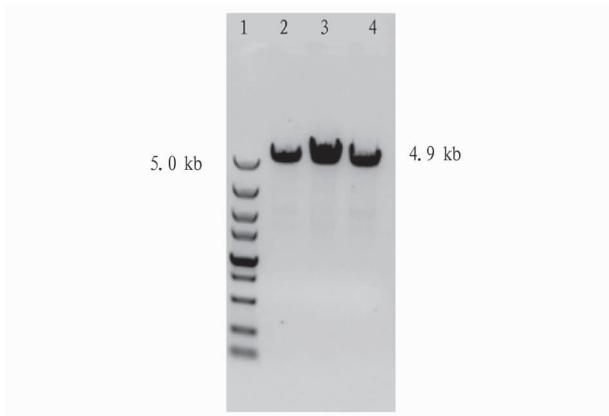
根据 PCR 反应中 DNA 聚合酶属性差异,其可分为普通型和低保真型两大类。普通型 *Taq* DNA 聚合酶扩增的 PCR 产物的 3' 末端有一个突出的“A”,它可以与市面上的“TA”克隆载体直接通过 A-T 配对而形成环形质粒,用于高效的“TA”克隆。但是,由于这种酶的高保真性较低,在基因克隆时会随机引入各种突变,使获得的目的 DNA 往往与模板之间有一定的差异,这对基因功能研究带来了诸多不便。低保真 DNA 聚合酶就很好地解决了这一难题,利用其较强的外切酶活性,能够最大限度地维持 PCR 产物的高保真性。这一特性受到广大科研工作者的喜爱。但是,其自身也有不可回避的难题,即由于其 PCR 产物高度保真、产物 3' 末端无突出的“A”,不能直接进行“TA”克隆。

在该研究中,首先利用低保真 *Taq* DNA 聚合酶扩增目的片段,保证 PCR 产物的高保真性,然后在 PCR 反应的最后 3 个循环中直接加入普通 *Taq* DNA 聚合酶,利用其 3' 末端加“A”特性获得既有高度保真性又能在产物 3' 末端加“A”的 PCR 产物,实现低保真 PCR 产物的直接“TA”克隆。此方法简单方便,可直接跳过低保真 PCR 产物需要额外加“A”的步骤,实现快速“TA”克隆的目的,具有一定的应用前景。

参考文献

- [1] WATERS D L E, SHAPTER F M. The polymerase chain reaction (PCR): General methods[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1099: 65-75.
- [2] ISHMAEL F T, STELLATO C. Principles and applications of polymerase chain reaction: Basic science for the practicing physician[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2008, 101(4): 437-443.
- [3] LORENZ T C. Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies[J]. *J Vis Exp*, 2012, 63: 1-15.
- [4] BAE J M, WEN X Y, KIM T S, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 (*FGFR1*) amplification detected by droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) is a prognostic factor in colorectal cancers[J/OL]. *Cancer Res Treat*, 2019-05-08 [2019-05-10]. <https://www.e-crt.org/upload/pdf/crt-2019-062.pdf>. DOI: 10.4143/crt.2019.062.

(下转第 116 页)



注:1. DL5 000 DNA Marker;2. LA *Taq*[®] DNA 聚合酶;3. 双酶联用(PrimeSTAR[®] G×L/ Z-*Taq*[®] DNA 聚合酶);4. PrimeSTAR[®] G×L DNA 聚合酶

图 3 含 *PKCε* 编码区 DNA 的克隆载体的 *Xho* I 酶切鉴定

Fig. 3 *Xho* I digestion identification of cloning vectors containing the target DNA fragments

3 讨论

PCR 技术自出现以来,就受到生物学界和医学界的高度关注,在短短的数年时间里,PCR 技术经历了高速发展。到目前为止,PCR 技术已经成为生物医学领域最重要的技术手段之一。根据 PCR 的作用可将其分为检测型 PCR 和基因克隆型 PCR 两大类。检测型 PCR 根据其实验目的差异,可延伸出不同的 PCR,如对目的 DNA 进行定量分析的荧光定量 PCR^[10]、制备探针用的不对称 PCR^[11]、检测基因突变的单链构型多态性 PCR 和低严格单链特异性引物 PCR^[12-13]、分析基因表达差异的随机引物扩增 PCR^[14]、用于肿瘤亚类分型的低温 PCR^[15]、检测流行性传染病的免疫 PCR 等^[16],这些特殊 PCR 在当今生物、医学界发挥重要的作用。另一方



图5 野生花卉和芳香类花卉组合花镜

Fig. 5 Combined flower border with wild flowers and aromatic flowers

种类有限的难题,丰富城市植物种类,创造良好的城市景观,又能降低成本,节约投入,同时,还为花镜景观增添了独特的地域色彩,是寒地花镜景观创新设计的一大亮点和突破点。

4.3 拓宽维度建设,打造特色花镜景观 从专类花镜方面入手,选择具有医学、药用、经济等方面价值的植物作花镜材料,以满足视觉系景观为前提,结合功能的塑造,打造既美观,又具有特殊功能性价值的花镜,拓展花镜景观的人文效益、社会效益、经济效益和生态效益,实现多维一体化建设,成就特色花镜景观。

在花镜设计的道路上,作为设计师,需要不断寻求更多的创新方式和途径,让花镜景观的形式和内容更加丰富、有创意,让城市的绿地建设更加的多元化^[10],力争突破各种不利因素的限制,让寒冷地区的人们也能感受到花镜的存在和魅力。

(上接第111页)

- [5] KANE S R, SHAH S R, ALFARO T M. Development of a rapid viability polymerase chain reaction method for detection of *Yersinia pestis* [J]. *J Microbiol Methods*, 2019, 162: 21–27.
- [6] SUNDARRAJAN S, PARAMBATH S, SURESH S, et al. Novel properties of recombinant *Sso7d-Taq* DNA polymerase purified using aqueous two-phase extraction; Utilities of the enzyme in viral diagnosis [J]. *Biotechnol Rep (Amst)*, 2018, 20: 1–10.
- [7] SCHULTZ H J, GOCHI A M, CHIA H E, et al. *Taq* DNA polymerase mutants and 2'-modified sugar recognition [J]. *Biochemistry*, 2015, 54(38): 5999–6008.
- [8] LUNDBERG K S, SHOEMAKER D D, ADAMS M W W, et al. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus* [J]. *Gene*, 1991, 108(1): 1–6.
- [9] GUO J X, ZHANG W L, COKER A R, et al. Structure of the family B DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum caldifontis* [J]. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2017, 73(Pt 5): 420–427.
- [10] 黄小玲, 张登, 廖嘉明, 等. 荧光定量 PCR 技术的原理及其在植物研究

参考文献

- [1] 魏凡翠, 蒋快乐, 林蓉. 园林景观中花坛和花镜的应用 [J]. *福建农业*, 2014(21): 111.
- [2] 董丽. 园林花卉应用设计 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2003.
- [3] 梁志刚. 花坛和花镜在园林设计中的运用 [J]. *华东科技(学术版)*, 2017(4): 157.
- [4] 韦琦. 花镜在道路景观设计中的应用: 以上海锦绣路为例 [J]. *中国园艺文摘*, 2013(11): 100–101, 184.
- [5] 张韦韦. 花镜景观设计中色彩学运用的探讨 [J]. *农技服务*, 2017(22): 63–64.
- [6] DISABATO-AUST T. The well-designed mixed garden [M]. Portland, OR: Timber Press, 2003.
- [7] 陈志岗. 探究花镜在园林植物造景中的应用 [J]. *江西建材*, 2017(17): 187, 192.
- [8] 叶春旺. 浅析花镜在现代园林植物造景中的应用 [J]. *黑龙江科技信息*, 2013(19): 205.
- [9] 王海峰. 花镜在北方园林中的应用 [J]. *中国科技纵横*, 2012(3): 211.
- [10] 张善峰, 王剑云. 让自然做功——融合“雨水管理”的绿色街道景观设计 [J]. *生态经济*, 2011(11): 182–189, 192.
- 中的应用 [J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(25): 36–40.
- [11] FINCKH U, LINGENFELTER P A, MYERSON D. Producing single-stranded DNA probes with the *Taq* DNA polymerase: A high yield protocol [J]. *BioTechniques*, 1991, 10(1): 35–36, 38–39.
- [12] 撒云俐, 那冬晨. 山楂 PCR-SSCP 反应体系与反应条件的优化 [J]. *安徽农业科学*, 2016, 44(33): 137–139, 142.
- [13] NASRABADI N N, SARGAZI F, SHOKRZADEH M, et al. Expression of MTR1 receptor in patients with gastric adenocarcinoma and its relationship with clinicopathological features [J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2018, 39(2): 111–118.
- [14] RUNGSRI P, AKKARACHANEYAKORN N, WONGSUWANLERT M, et al. Effect of fermented milk containing *Lactobacillus rhamnosus* SD11 on oral microbiota of healthy volunteers: A randomized clinical trial [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(10): 7780–7787.
- [15] 梁卉, 陈国杰, 于燕, 等. 低温变性下复合 PCR 技术及其应用 [J]. *遗传*, 2018, 40(3): 227–236.
- [16] ANZAI H, TERAI T, JAYATHILAKE C, et al. A novel immuno-PCR method using cDNA display [J]. *Anal Biochem*, 2019, 578: 1–6.