

SOE 法对大豆苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因拼接的应用研究^{*}

宋 柬¹ 马会勤² 陈尚武¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 中国农业大学果树学系, 北京 100094)

摘要 利用 SOE (Splicing by Overlap Extension) 法对大豆苯丙氨酸解氨酶(PAL)的两个外显子进行拼接, 得到完整的 PAL 基因, 表明这种方法是有效可行的。这种技术是作为对 cDNA 克隆的初步改进与尝试, 节约了成本, 有一定的应用价值。

关键词 SOE 法; cDNA 克隆; 苯丙氨酸解氨酶(PAL)

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2006)03-0228-06

1989 年, Horton 等人提出了 SOE 法 (Gene Splicing by Overlap Extension, Gene SOEing), 即通过复制时 DNA 链的交错延伸实现基因拼接^[1]。该方法是利用 PCR 技术在体外进行有效的基因重组, 而且不需要内切酶消化和连接酶处理, 该技术使用简易。由于引物只需要与模板有效结合, 尤其是 5' 端序列不必与模板完全配对, 因此扩增引物的 5' 端可以添加两种酶切位点以便于后期克隆^[2,3]。SOE 法正是利用这一特点, 使两个基因出现一个重叠区域, 进而利用这段重叠区制造“长引物”(mega primers), 使基因拼接或重组得以实现^[4,5], SOE 原理示意图如图 1 所示。利用这一方法, 把大豆中的苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因的两个外显子拼接在一起, 与从 mRNA 反转录为 cDNA 的技术路线相比, 简化了克隆方法, 节约了成本, 降低了 RNA 污染降解的风险。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 栽培品种东北春大豆系列(北丰 12)幼嫩叶片。

1.1.2 质粒和菌种

质粒 pGEM-T-Easy T 载体试剂盒购自 Promega 公司; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 为本实验室保存。

1.1.3 工具酶及其它试剂

限制性内切酶、T4 DNA Ligase、Ex Taq DNA 聚合酶、Pyrobest DNA 聚合酶、dNTP、DL2000DNA Marker 等购自 TaKaRa 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (QIAquick Gel Extraction Kit) 为 QIAGEN 公司产品, 质粒 DNA 小量提取试剂盒购自泽星科技公司(北京); Tryptone 和 Yeast Extract 为 OXOID 产品; 琼脂糖为西班牙产品; X-Gal、IPTG、氨苄青霉素等药品均为进口或国产生物试剂。

1.2 方法

1.2.1 大豆 DNA 提取纯化

利用 CTAB 法进行 DNA 的提取纯化, 稍有改进。原理方法参见文献^[6]。

1.2.2 引物设计与合成

^{*} 收稿日期: 2006-03-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (Item number: 30371005 & 39970469)

作者简介: 宋柬 (1980-), 女, 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 硕士研究生, 主要从事食品分子生物学研究, 电话: 010-62733986 E-mail: songirlike@163.com

通讯作者: 陈尚武, swchen@cau.edu.cn

2 结果与分析

2.1 外显子片断扩增结果

大豆中的苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因的两个外显子分别为 392bp 和 1770bp。以提取的大豆 DNA

为模板, 分别以 F1 B1 和 F2 B2 为引物扩增, 获得如图 2 和图 3 中的结果。两对引物分别扩增到 400bp 和 1900bp 的片断。回收连接到 T 载体中, 分别命名 GM PAL1 和 GM PAL2, 测序结果如后。

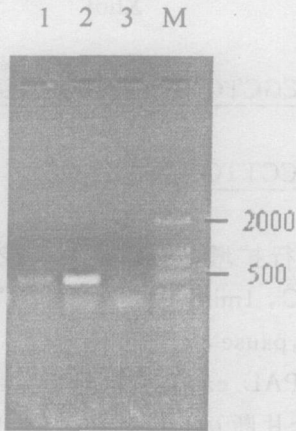


图 2 GM PAL1 的扩增结果

Fig. 2 The amplification of GM PAL1

1, 2, 3; PCR amplification 4; DNA marker DL2000

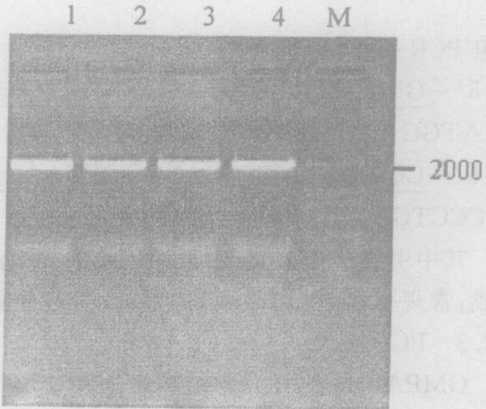


图 3 GM PAL2 的扩增结果

Fig. 3 The amplification of GM PAL2

1, 2, 3, 4; PCR amplification 5; DNA marker DL2000

2.2 重组 PCR 的扩增结果

分别以测序正确的阳性克隆质粒 pGEM - T - Easy GM PAL1 和 pGEM - T - Easy GM PAL2 为模板, 再分别以 F1 B3 和 F3 B2 为引物扩增, 得到如图 4 中的结果。回收获得约 400 bp 和 1900bp 的

片断, 各自为模板引物进行重组 PCR, 20 个循环后, 加入引物 F1 和 B2, 补充 PCR 反应体系, 尤其是 dNTP 和 Ex Taq 酶, 继续进行 35 个循环的 PCR 反应, 得到如图 5 中的结果。回收连接到 T 载体中, 命名为 GM PAL exon, 测序结果如后。

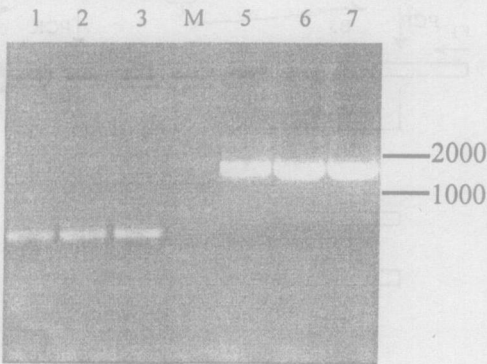


图 4 F1B3 和 F3B2 的扩增结果

Fig. 4 The amplification of F1B3 F3B2

1, 2, 3; PCR amplification of F1B3

M; DNA marker DL2000

5, 6, 7; PCR amplification of F3B2

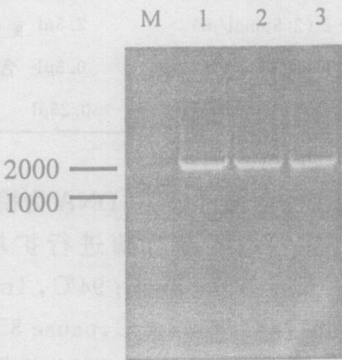


图 5 重组 PCR GM PAL exon 的扩增结果

Fig. 5 The amplification of SOE

M; DNA marker DL2000

1, 2, 3; PCR amplification of SOE

2.3 PCR 扩增产物的测序分析结果

将 F1、B1 和 F2、B2 两扩增产物经 T - 载体克隆、酶切鉴定阳性亚克隆质粒进行 DNA 测序, 与 Genbank 序列比对分析证明所获得的 GM PAL 1、2 (相应于第一和第二个外显子) 的序列同源率达到 99%(图 6 和图 7)。将 SOE - PCR 重组扩增的产物

亚克隆 GM PAL exon 酶切鉴定阳性质粒测序, 序列分析拼接区域外显子结合正确(阴影部分为重叠区域, 如图 8 所示), 其它序列与 Genbank 大豆 PAL1 序列同源率也达到 99%, 完全符合预期的设计结果。这表明 SOE - PCR 法重组技术对本实验的 PAL 基因拼接是成功的。

1 ATGGAAGCACTAATGGCCACCAAAACGGTTCATTTTGCTTGTCAC TGCCAAGGGAAGT
61 AGTGATCCCTTGAAGTGGAGAGCGCGGCGAGGCGATGAAGGGAGTCACTGGACGAG
121 GTGAAGCGCATGGTGGCCGAGTACCGCAAGCCGGTGGTCCGGCTCGGCGGAGAGACTCTC
181 ACCATCGCTCAGGTGGCCGCCGTGGCCGACACGACCACGGCGTGCCGGTGGAGCTCTCA
241 GAGTCAGCGAGAGAAGGAGTAAAGGCGAGCAGTGAGTGGGTGATGAACAGCATGAACAAC
301 GGCAGTACAGTTACGGCGTCAACACCGGCTTCGGTGCCACGTACACCGCCGAACCAAA
361 CAGGGTGGTGTCTGTGAGAAGAACTCATCAGGTAACATA

图 6 GM PAL1 的测序结果

Fig 6 The result of sequencing for PCR products of GM PAL1

1 ATTCTTAAACGCTGGAATATTTGGAATGGAAGTGAATCAAGCCATACCTTGCCACACAC
61 TGCAACCAAGAGCAGCCATGTTAGTGAGAAATCAACACTCTTCTTCAGGGGTACTCAGGCAT
121 TAGATTTGAAATCTTAGAAGCCATCAACCAAGCTCCTGAACAACAACGTTACCCCATGTTT
181 GCCACTTCGTGGTACAATCACAGCTTCTGGAGATCTTGTTCCACTTTCTTACATTGCTGG
241 TTTGCTAACTGGCAGACCCAACCTCCAAGCTGTTGGACCTTCTGGAGAAGTACTTAACGC
301 AAAAGAAGCTTTTGAATTGGCTAGCATCAACTCTGAGTTCTTTGAATTGCAACCCAAGGA
361 AGGTCTTGCCCTGTTAATGGCACTGCTGTTGGTCTTGATTAGCTCTATGCTACTCTT
421 TGAGGCTAATATACTAGCTGTGTTGTCTGAAGTTCTATCAGCTATTTTTGCTGAAGTGAT
481 GCAGGGGAAACCTGAATTCAGTACCATTGACACACAAGCTAAAGCACCATCCTGGTCA
541 AATTGAGGCTGCTGCTATTATGGAGCATATCTTGGATGGAAGTTCCTACATGAAAGCTGC
601 TAAGAAGTTGCATGAGATTGATCCCTTGCAAAAGCCAAAACAAGATAGATATGCCCTTAG
661 AACTTACCACAGTGGCTTGGTCCCTCTTA TTGAAGTGATTGCTTCTCAACCAAGTCAAT
721 TGAGAGAGAGATCAACTCTGTGAATGACAACCTTTGATTGATGTTTCAAGGGAACAAGG
781 CATTGCATGGTGGCAATTTCAGGAACCCCTATTGGAGTCTCTATGGACAACACAGCTT
841 TGGCACTTGCATCTATTGGCAAACTCATGTTTGCTCAATTCTCTGAGCTTGCTAA TGACT
901 TTTACAACAATGGATTGCCCTTCAAATCTCACTGCTAGCAGAAATCCAAGCTTGCACTATG
961 GTTTCAGGGAGCTGAAATTGCCA TGCTTCTTACTGCTCTGAACTCCAATATCTTGCAA
1021 ATCCAGTAACTACCCATGTCCAAAGTGCTGAGCAACACAACCAAGGATGTCAACTCTTGG
1081 GCTTGATCTCATCTAGAAAGACAAATGAAGCCATCGAGATCCTTAAGCTCATGTCTTCCA
1141 CATCTTTGATTGCACTTTGCCAAGCAATTGACTTGAGGCA TTTAGAGGAGAATTGAAAA
1201 ACTCGGTCAAGAACACCGTGAGCCAAGTTCCAAAAGGATTCTTACCACAGGTGTCAATG
1261 GAGAACTCCATCCTTCAAGATTTTGAGAGAAGGATCTGCTAAAAGTGGTTGATAGGGAGT
1321 ATATATTTTCCATATTGATGACCCCTGCAGTGCTACATACCATTTGATGCAAAAACCTTA
1381 GGCAAGTGCTTGTAGATCATGCATTTGTAATGACAGAGAGTGAGAAGGATGTGAAGTCTG
1441 CCATCTTTCAAAGATAGCAATCTTTGAGGAAGAGTTGAAGAATCTCTTGCCAAAAGAGG
1501 TTGAAGGTGCAAGGGCTGCTTATGAGAGTGCCAAAGCTGCAATTCAAAACAAGA TCCAAG
1561 AATGCAGATCTTACCCACTGTACAAGTTTGTGAGAGAGGAATTAGGGACTGGGTTGCTAA
1621 CTGAGAGAAAAGGTGAGGTACCCGGGTGAAGAGTTTGACAAATTATTCACAGCAATGTGCC
1681 AAGGGAAAATTATTGATCCTCTTATGGAGTGCTTGGGGAGTGAATGGAGCTCCTCTTC
1741 CAATCTCTTAAATTTATTGTAACCTTAACAAATATTTTATTGTACCTATGCAAGAAAA
1801 ACCATAATCATTGGTTTGTCTATCATTTAACAAATGTTTCTTCAATGTCAAATAGGACC
1861 TTGTAATTTAATATTTTAAATGAAATTTTCAGTTGTTTGCAGA

图 7 GM PAL2 的测序结果

Fig 7 The result of sequencing for PCR products of GM PAL2

1 ATGGAAGCACTAATGGCCACCAAAACGGTTCATTTTGCTTGTCAC TGCCAAGGGAAGT
61 AGTGATCCCTTGAAGTGGAGAGCGCGGCGAGGCGATGAAGGGAGTCACTGGACGAG
121 GTGAAGCGCATGGTGGCCGAGTACCGCAAGCCGGTGGTCCGGCTCGGCGGAGAGACTCTC
181 ACCATCGCTCAGGTGGCCGCCGTGGCCGACACGACCACGGCGTGCCGGTGGAGCTCTCA
241 GAGTCAGCGAGAGAAGGAGTAAAGGCGAGCAGTGAGTGGGTGATGAACAGCATGAACAAC

301 GGCACTGACAGTTACGGCGTCACCAACGGCTTCGGTGCCACGTCAACACGCCGAACCAAA
361 CAGGGTGGTGCTCTGCAGAAAGGAATCATCAGATTCTTAAACGCTGGAATATTTGAAAT
421 GGAAC TGAAATCAAGCCATACCTGCCACACTGCAACCAAGAGCAGCCATGTTAGTGAGA
481 ATCAACACTCTTCTTCAGGGGTACTCAGGCATTAGATTTGAAA TCTTAGAAGCCA TCACC
541 AAGCTCCTGAACAACAACGTTACCCCATGTTTGGCACTTCGTGGTACAATCACAGCTTCT
601 GGAGATCTTGT TCCACTTTCTTACATTGCTGGTTTGCTAACTGGCAGACCCAACTCCAAA
661 GCTGTTGGACCTTCTGGAGAAGTACTTAACGCAAAAAGAAGCTTTGAATTGGCTAGCATC
721 AACTCTGAGTTCTTTGAATTGCAACCCAAGGAAGGTCTTGCCCTTGTTAATGGCACTGCT
781 GTTGGTTC TGGA TTAGCTTCTATGGTACTCTTTGAGGCTAATATACTAGCTGTGTGTGCT
841 GAAGTTCTATCAGCTATTTTGCTGAAGTGATGCAGGGGAAACCTGAATTCAC TGACCAT
901 TTGACACACAAGCTAAA GCACCA TCCTGGTCAAATTGAGGCTGCTGCTATTATGAGCAT
961 ATCTTGGATGGAAGTTCTTACATGAAAGCTGCTAAGAAGTTGCATGAGATTGATCCCTTG
1021 CAAAAGCCAAAACAAGATAGATATGCCCTTAGAACTTCACCACAGTGGCTTGGTCCTCTT
1081 ATTGAAGTGATTCGTTTCTCAACCAAGTCAATTGAGAGAGAGATCAACTCTGTGAATGAC
1141 AACCCTTTGATTGATGTTTCAAGGAACAAGGCA TTGCATGGTGGCAATTTCCAAGGAACC
1201 CCTATTGGAGTCTCTATGGACAACACACGTTTGGCAC TTGCATCTATTGGCAAAC TCATG
1261 TTGCTCAA TTCTCTGAGCTTGTC AATGACTTTTACAACAATGGATTGCCTTCAAATCTC
1321 ACTGCTAGCAGAAATCCAAGCTTGACTATGGTTTCAAGG GAGCTGAAATTGCCATGGCT
1381 TCTTACTGCTCTGAAC TCCAATATCTTGCAAATCCAGTAACTACCCATGTCCAAAGTGCT
1441 GAGCAACACAACCAGGATGTCAACTCTTTGGGCTTGATCTCATCTAGAAAGACAAATGAA
1501 GCCA TCGAGATCCTTAAGCTCATGTCTTCCACATTCTTGATTGCACTTTGCCAAGCAATT
1561 GACTTGAGGCATTTAGAGGAGAATTTGAAAACTCGGTCAAGAACACCGTGAGCCAAGTT
1621 TCCAAAAGGATTCTTACCACAGGTGTCAATGGAGA ACTCCATCCTTCAAGATT TTGTGAG
1681 AAGGATCTGCTAAAAGTG GTTGATAGG GAGTATATTTTCTACATTGATGACCCCTGC
1741 AGTGCTACATACCCATTGATGCAAAA ACTTAGGCAAGTGCTTG TAGATCATGCATTGGTA
1801 AATGCAGAGAGTGAGAAGGATGTGAACTCGTCCATCTTTCAAAAGATAGCAATCTTTGAG
1861 GAAGAGTTGAAGAATCTCTTGCCAAAAGAGGTTGAAGTGCAAGGGCTGCTTATGAGAGT
1921 GGCAAAGCTGCAATTCCAAACAAGATCCAAGAATGCAGATCTTACCCACTGTACAAGTTT
1981 GTGAGAGAGGAATTAGG GACTGGGT TGCTAACTG GAGAAAAGGTGAGGTCACCGGTGAA
2041 GAGTTTGACAAATTATTCA CAGCAATGTGCCAAGGGA AATTATTGA TCCTCTTATGGAG
2101 TGCCTTGGGGAGTGGAATGGAGCTCCTCTTCCAATCTCTTAAATTTATGTAACTCTTAA
2161 CA

图 8 重组 PCR 产物 GM PAL exon 的测序结果

Fig 8 The result of sequencing for PCR products of GM PAL exon

3 讨论

重组 PCR 反应要分成两步: 第一步只加两个长引物, 彼此作为引物和模板进行配对扩增, 使产物得到富集; 第二步再加入两个短引物进行扩增, 最终得到目的基因。在引物 F1 和 B2 的 5' 端设计的 NdeI 和 XhoI 位点就是为了使基因定向插入 pET 表达载体, 得到阳性克隆, 实现原核表达。

本实验中用 Ex Taq DNA 聚合酶克隆到两个外显子后, 采用了关键的高保真 Pyrobest DNA 聚合酶, 此酶具有 3'→5' Exonuclease 的耐热活性, 在 PCR 扩增产物的 3' 端不加碱基 A, 而且非特异带得

到了控制, 大大提高了 PCR 的准确性。如果不采用可信度高的 Pyrobest DNA 聚合酶, 用引物 F1、B3 和 F3、B2 分别进行 PCR 扩增的两个片段的 3' 端就会出现 A, 在两个外显子重叠的区域就会多出碱基 A, 造成开放阅读框(Open reading Frame, ORF)移码, 翻译时无法得到特异性蛋白, 从而就不能进行目的蛋白的表达。

本实验从大豆基因组 DNA 克隆得到 PAL 基因的 2 个外显子, 通过 SOE 的方法拼接成完整的 PAL 基因, 与从 mRNA 反转录 cDNA 的技术路线相比, 简化了克隆方法, 节约了成本。首先大豆总 RNA 和 mRNA 的提取要比 DNA 的提取严格得多, 而且操作容易受到污染使 RNA 降解; 其次从

mRNA 反转录 cDNA 所需的反转录酶及相应的试剂较昂贵;再次, cDNA 克隆能实现原核表达, 本实验重组 PCR 的扩增产物也已通过 pET 系统在大肠杆菌 BL21(DE3) 中实现原核表达, 内容另作他叙。此外, SOE 的成功应用, 提供了一条非依赖 cDNA 的和 PAL 相似结构基因的克隆方法, 也为后期的蛋白质进化工程提供了可行的方法。

参 考 文 献

- 1 Horton R. M, Cai Z. L, Ho S. N, Pease L. R. Gene splicing by overlap extension: tailor made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques*. 1990, 8(5): 528–535
- 2 李德葆, 徐平. 重组 DNA 的原理和方法[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社 1994; 403–405
- 3 张学敏, 王宜强. 靶向新基因的分子克隆策略—理论与方法[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1999; 69–73
- 4 周鹏, 董克家. 利用套叠 PCR 技术进行基因突变和拼接[J]. 生命科学研究, 2001, 5(1): 52–55
- 5 刘金龙, 刘津, 杨瑞锋, 等. SOEing 法在构建人瘦蛋白乳腺表达载体中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 6: 90–92
- 6 F. M. 奥斯伯, R. E. 金斯顿, J. G. 塞德曼等著, 马学军, 舒跃龙等(译校). 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2005; 54–55
- 7 Yang Y. S, Watson W. J, Tucker P. W, Capra J. D. Construction of recombinant DNA by exonuclease recession[J]. *Nucleic Acids Res.* 1993, 21(8): 1889–1893
- 8 Horton R. M. PCR mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor made genes[J]. *Mol Biotechnol.* 1995, 3(2): 93–99
- 9 Horton R. M. In vitro recombination and mutagenesis of DNA. SOEing together tailor made genes[J]. *Methods Mol Biol.* 1997, 67: 141–149
- 10 Chen Q, Zhu D. Y, Luo X. D, Jiang Y, Jiang S. Preparation and application of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* CFP10 ES A T 6 fusion protein[J]. *Zhonghua Jiehe He Huxi Zazhi.* 2004, 27(4): 244–248
- 11 Wang J. J, Greenhut W. B, Shih J. C. Development of an asporogenic *Bacillus licheniformis* for the production of keratinase[J]. *J Appl Microbiol.* 2005, 98(3): 761–767
- 12 Xu Z, Zhong Z, Huang L et al. High level production of bioactive human beta defensin 4 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression[J]. *J Appl Microbiol Biotechnol.* 2006, 1–9

APPLICATION OF GENE SPLICING BY OVERLAP EXTENSION ON *Glycine max* PHENYLALANINE AMMONIA LYASE (PAL)

Song Jian¹ Ma Huiqin² Chen Shangwu¹

(1. College of Food Science & Nutritional Engineering, Beijing 100083;
2. Department of Pomology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract The two exons of *Glycine max* phenylalanine ammonia lyase (PAL) were recombined together by gene splicing by overlap extension (gene SOEing). Results showed that gene SOEing was a successful specific PCR technique for gene recombination. It was the improvement of cloning cDNA.

Key words SOE; cDNA; Phenylalanine ammonia lyase (PAL)

欢迎订阅《中国种业》

《中国种业》是由农业部主管, 中国农业科学院作物科学研究所、中国种子协会共同主办的专业技术期刊。全国中文核心期刊、全国优秀农业期刊。覆盖范围: 包括大田作物、蔬菜、花卉、林木、果树、草坪、牧草、特种种植、种子机械等。读者对象: 各级种子管理、经营企业的领导和技术人员, 各级农业科研、推广部门人员, 大中专农业院校师生, 农村专业户和广大农业生产经营者。

月刊, 大 16 开, 每期定价 5.80 元, 全年 69.60 元。国内外公开发行, 邮发代号: 82–132。漏订者可汇款至编辑部订阅(汇款请注明刊期、详细通讯地址), 邮寄挂号者需每期另加 3 元。

E-mail: chinaseedqks@163.com chinaseedqks@sina.com

地址: 100081 北京中关村南大街 12 号 中国种业编辑部

电话: (010)62186657 62180279 62180257 传真: (010)62180279