

文章编号: 1000 - 0615(2001)02 - 0127 - 04

用 PCR 法快速筛选中国对虾含微卫星 的重组阳性克隆

徐 鹏, 周岭华, 相建海

(中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:运用 PCR 法在中国对虾的小片段基因组文库中快速筛选含有微卫星序列的重组阳性克隆。PCR 中使用的引物为载体 pGEM - 3zf (+) 上多克隆位点两侧的 T₇/Sp6 启动子引物和根据微卫星核心重复序列设计的 STR 引物: STR1: 5' - ATATATATATATAT - 3'; STR2: 5' - TCTCTCTCTCTCTC - 3'。直接使用含有重组克隆的菌液, 在 PCR 反应前增加一段裂解细菌的高温。筛选出来的含有微卫星序列的重组阳性克隆经 DNA 测序验证。结果证明, 采用 PCR 方法用菌液快速筛选含有微卫星序列的重组阳性克隆完全可行, 而且具有简便、快速、高效、不涉及同位素操作等优点。

关键词:中国对虾; 微卫星; 聚合酶链式反应

中图分类号: S917

文献标识码: A

Rapid screening recombinant positive clones containing microsatellites of *Penaeus chinensis* with PCR

XU Peng, ZHOU Ling-hua, XIANG Jian-hai

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Recombinant positive clones containing microsatellite sequences of Chinese shrimp, *Penaeus chinensis* were obtained through rapid screening small - size fractionated genomic libraries with PCR technique. The primers used in PCR were T₇/Sp6 promoter primers located at both sides of multiple clone site of pGEM - 3zf (+) and STR primers: STR1: 5' - ATATATATATATAT - 3' and STR2: 5' - TCTCTCTCTCTCTC - 3' designed according to core repeats motifs of microsatellites. The bacterial suspensions were directly used in PCR, before which a short time period of high temperature (95 °C) was kept to break bacteria. The recombinant positive clones containing microsatellite sequences were obtained by screening and were verified after sequencing. The results show that PCR technique combined with bacterial suspension for rapid screening recombinant positive clones containing microsatellite sequences is feasible and this method also has advantages of convenience, quickness, high efficiency and reliable outcome.

Key words: *Penaeus chinensis*; microsatellite; Polymerase Chain Reaction (PCR)

近十年来,我国对虾养殖业在迅速发展的同时,随之出现了种质退化,病害严重,抗病力下降等问

收稿日期: 2000-08-29

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目资助(G1999012007); 国家自然科学基金项目资助(39970113)

第一作者: 徐 鹏: (1977 -), 男, 硕士研究生; 从事海洋动物分子遗传学研究; Tel: 0532-2879062-5306, E-mail: biotech @ms. qdio. ac

cn

题,因此,保护野生和养殖种群的遗传多样性,筛选和改良以获得优质、高产、抗病力强的品种就显得非常重要。微卫星标记是一类简单的短序列核苷酸串联重复,以双核苷酸重复最为常见,如 $(CA)_n(GT)_n$ 等,又称为短序列串联重复序列(Short Tandem Repeats, STR),简单序列重复(Simple Sequence Repeats, SSR),广泛分布于基因组中,具有高度的多态性,符合孟德尔遗传模式,呈共显性表达,非常适用于连锁分析,疾病基因定位以及优良品种的选育和群体遗传学研究,因此,发展中国对虾微卫星标记技术是十分必要的。

从基因组文库中筛选含有微卫星序列的阳性克隆,目前大多数研究者^[1-3]所用的方法基本上是Southern杂交,即首先构建某一物种的小片段基因组文库,利用同位素标记或荧光标记的简单重复核苷酸探针与文库进行杂交,筛选含有特定微卫星序列的阳性克隆,进而对阳性克隆进行测序,得到微卫星序列。由于聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)法具有快速、简便、准确,不需要提取质粒DNA,不需要使用放射性同位素等优点,我们在中国对虾(*P. chinensis*)微卫星序列的筛选中使用了PCR法,直接使用含有重组阳性克隆的细菌培养物,而不需要提取质粒。

1 材料与方 法

1.1 中国对虾基因组 DNA 的提取

取中国对虾尾部肌肉,使用常规方法提取基因组DNA,用RNase消化后备用。中国对虾取自中国科学院海洋研究所培育楼。

1.2 质粒、菌株

质粒为pGEM-3zf(+)(购自Promega公司),在其多克隆位点两侧含有T₇和Sp₆启动子;菌株为*E. coli* DH5(购自Promega公司)。

1.3 引物

T₇ Promotor Primer: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', Sp₆ Promotor Primer: 5'-AATTTAGGTGACACTATAG-3',分别位于pGEM-3zf(+)的多克隆位点的两侧(购自上海生工公司)。

微卫星核心序列STR引物:STR1:5'-ATATATATATATAT-3';STR2:5'-TCTCTCTCTCTCTC-3'(上海生工公司合成)。

1.4 中国对虾小片段基因组文库的构建

将中国对虾基因组DNA用内切酶Sau3AI消化,酶切产物琼脂糖凝胶电泳,切下含300~1000bp的DNA片段的凝胶,使用透析袋电洗脱法进行回收。对质粒pGEM-3zf(+)DNA用BamHI完全酶切,纯化回收线性质粒DNA,用小牛碱性磷酸酶(CIAP)去磷酸化。将载体和小片段基因DNA按1:3比例(摩尔比)在T₄DNA连接酶反应体系中于16℃温育10h,用连接反应液转化大肠杆菌DH5感受态细胞,涂布在均匀涂布了X-gal的氨苄青霉素LB平板上,37℃培养过夜,4℃放置至兰色菌斑充分显色。取无菌的96孔板,每孔加入100μL氨苄青霉素LB培养基和20μL甘油,用无菌的Tip挑取平板上的白色菌斑,接入96孔板,37℃摇菌过夜。-70℃低温保藏备用。

1.5 PCR法快速筛选含有微卫星序列的阳性克隆

PCR体系15μL,含1XPCR Buffer, 2.5μM MgCl₂, 0.2mM dNTP, Sp6 Promotor Primer和STR1(或STR2)引物各15pmol μL⁻¹, Taq DNA聚合酶1U。用无菌Tip从96孔板的每个孔中吸取1.5μL菌液加到PCR反应液中,振荡,离心,加1滴石蜡油。95℃裂解菌液及变性5min,然后94℃1min,40℃1min,72℃1min,共进行30个循环,最后72℃延伸10min(PE公司PE9600 PCR仪)。取PCR反应体系8μL用1%的琼脂糖凝胶电泳分析,在VDS凝胶呈像分析仪(安发玛西亚公司)下观察结果,照相。

1.6 DNA序列测定

确定含有微卫星序列的阳性克隆以后,将这些阳性克隆从96孔板接至5mL氨苄青霉素LB培养基

中,37 摇菌过夜,使用碱裂解法提取质粒 DNA, RNase 消化后纯化作为序列测定的模板。测序引物采用 T₇/Sp₆ Promotor Primers。根据筛选结果,依据距离远近确定使用 T₇ 还是 Sp₆ 测序引物(原则是在测序时能够测出微卫星两端保守的旁侧序列)。采用 PE Sequencing Kit, 在 ABI310 型自动测序仪(美国 PE 公司)上测序。

2 结果

2.1 PCR 法筛选含微卫星序列的阳性克隆

图 1 为用 PCR 法筛选含中国对虾微卫星序列的阳性克隆的电泳照片,其中 1、2、3、4 号为引物 Sp₆/STR1 的扩增结果,5、6、7 号为引物 Sp₆/STR2 的扩增结果。1、3、5 号分别扩增出一条带,说明在这三个克隆中均含有微卫星序列。

2.2 DNA 测序获得中国对虾微卫星

根据电泳结果,选用 pGEM-3zf(+) 上距微卫星序列比较近的启动子引物(T₇ 或 Sp₆)用于 DNA 测序。结果证实在 PCR 法筛选得到的 3 个克隆中,分别含有(TA)₉、(TA)₂₂、(GA)₄₄等微卫星核心序列。

3 讨论

微卫星序列的获得是微卫星分析的第一步,也是最为关键的一步。主要有以下两种途径:

(1) 寻找已经存在的微卫星序列(包括寻找相近物种的引物序列)

主要通过检索 GenBank、EMBL 和 DDBJ 等 DNA 序列数据库。随着公布的 DNA 序列越来越多,Internet 的广泛应用,可以使人们轻而易举地从互联网上获得含有微卫星的序列。但是,由于海产动物的分子遗传学发展远不及陆生动物,从此途径获得对虾微卫星序列比较困难,不象陆生饲养动物和人类那样已经可以大量地从上述数据库获取微卫星序列。

(2) 使用实验方法获得含有微卫星的阳性克隆

目前了解到的主要有列方法:第一,从小片段基因组文库中通过探针筛选获得含有微卫星的阳性克隆。首先,构建目的生物的小片段基因组文库,用同位素标记的含有特定微卫星序列的探针去筛选含有微卫星序列的阳性克隆,随后对这些克隆进行序列测定。第二,从 RAPD 标记中获得微卫星 DNA,用 RAPD 方法对目的生物的基因组 DNA 进行 PCR 反应,扩增产物经电泳后转移到硝酸纤维素膜上,用同位素标记的含有特定微卫星序列的探针进行 Southern blotting,确定微卫星序列在电泳胶上的位置,进行相应的分离、纯化、测序,即可获得相应的微卫星序列。第三就是 PCR 法。

通过实验方法获得含有微卫星序列,目前大多数研究者主要采用同位素标记的简单重复核苷酸探针杂交筛选小片段基因组文库,即第一种方法,这种方法涉及到同位素操作,危险,同时操作过程也比较繁琐,要经过探针的合成与同位素标记、转膜、放射自显影等步骤。虽然目前可以应用没有放射性危险的荧光染料代替同位素,但灵敏度稍差,可能会丢失一些信号。用 PCR 法就没有这些问题,Sathe 等^[4]将含重组质粒的细菌经过 94 1 分钟,显微镜观察发现大部分细胞裂解,DNA 释放出来,可用于 PCR 的模板,而不必在抽提质粒 DNA。T₇/Sp₆ 启动子引物和微卫星核心重复序列引物进行的是特异性的 PCR 反应,通过调节退火温度可以达到最佳条件,产物带型清晰。

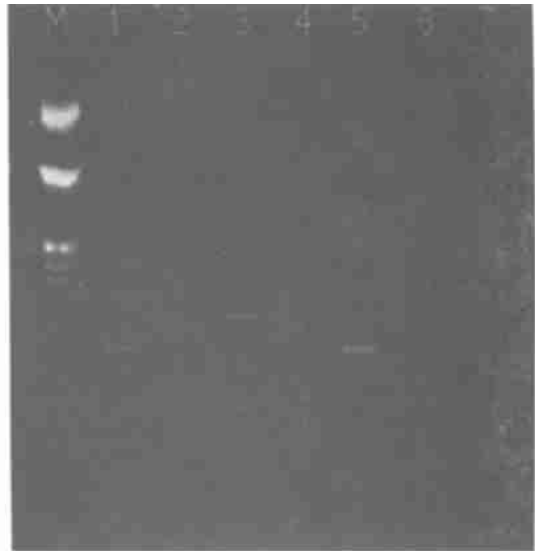


图 1 PCR 法筛选中国对虾微卫星序列电泳结果

Fig. 1 Analysis of PCR product by electrophoresis for screening clones containing microsatellites in *P. chinensis*

M : lambda DNA/ Hind + EcoR Markers

总之,用 PCR 法筛选含微卫星序列的阳性克隆,直接、快速、方法简单,易于掌握,结果可靠,尤其适用于一些没有使用同位素条件的实验室进行微卫星的筛选,也可以用于其他重组阳性克隆的快速筛选工作^[1]。

参考文献

- [1] 胡 维,向 华,周 艳,等. 用 PCR 法直接快速筛查重组阳性克隆[J]. 生物技术通报,1999,15(6):39 - 40.
- [2] 徐 磊,夏家辉,潘 乾,等. 一个新的染色体 8q24.1 带特异性微小卫星的筛选和分析[J]. 遗传学报,1997,24(1): 1 - 6.
- [3] 张亚平,王 文,宿 兵,等. 大熊猫微卫星 DNA 的筛选及其应用[J]. 动物学研究,1995,16(4):301 - 306.
- [4] 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[J]. Nucleic Acid Res., 1991, 19: 4775.

www.cnki.net