

菌落 PCR 在大规模基因组测序中的应用

唐晔盛¹⁾* 李英²⁾ 朱静洁²⁾ 胡欣²⁾ 林志新¹⁾ 韩斌²⁾ 洪国藩²⁾

(¹⁾上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240; (²⁾中国科学院国家基因研究中心, 上海 200233)

摘要 一种利用菌落直接 PCR 扩增 DNA 并用于测序的实验方法. 通过对引物的设计和菌液浓度控制, 使 PCR 反应后的内容物对测序干扰减到最小. 与传统的测序过程比较, 它省去了抽提模板 DNA 一步, 节省了大量时间和实验成本. 另外此方法可对 BAC 亚克隆库构建时由连接转化过程中导致的假阳性起筛选和鉴定作用. 采用该法成功测定了籼稻 (*Oryza sativa indica*) 广陆矮 4 号的 L3173 号 BAC DNA 全长序列 (约 100 kb), GenBank 登录号: AL512542.

关键词 菌落 PCR, 水稻基因组, 测序

学科分类号 Q87

PCR 技术^[1,2] 目前已成功应用于 cDNA 扩增, 基因组测序^[3,4], 医疗诊断和突变检测^[5] 等领域, 是当今分子生物学领域一项不可缺少的实验技术手段. 当前基因组大规模测序大体遵循以下步骤: 建库-抽提 DNA-PCR 扩增并荧光标记 (cycling)-测序仪自动测序-组装分析.

传统的测序前 PCR 扩增是以碱裂解等方法抽提的 DNA 为模板, 成功率高, 然而显得较为繁琐, 尤其在用 96 孔板抽提 DNA 时, 由于当前离心机的最大离心力限制, 4 块 96 孔板 DNA 的抽提约需近一个小时. 采用菌落 PCR 方法, 将样品跳过 DNA 抽提这一步, 而直接以菌体热解后暴露的 DNA 为模板进行 PCR 扩增和荧光标记 (cycling), 不仅节约了时间, 增加了设备利用率, 同时也降低了实验成本. 该法使建库到测序前各步骤的总成本减少了约三分之一 (引物干扰造成的损耗和建库数增加使总成本上升已考虑在内).

在大规模基因组测序中, 菌落 PCR 与传统 PCR 相比更为简单快捷. 此法已成功应用于籼稻 (*Oryza sativa indica*) 广陆矮 4 号品种第四号染色体测序, 希望该方法对于国内日益兴起的基因组大规模测序有所帮助.

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

测序用样品取自中国科学院国家基因研究中心水稻 (*Oryza sativa indica*) 广陆矮 4 号 L3173 号 BAC 的亚克隆库 (2~3kb DNA 片段).

PCR 反应体系的 Taq 酶系购自宝生物工程有 限 公 司 (TaKaRa Biotech). PCR 引物: R1:

GCCGCTCTAGAAGTGTG, R2: TAATACGACTACTATAGGG. Cycling 引物 R2: TAATACGACTACTATAGGG 引物合成自生工生物有限公司. 测序试剂盒购自 PE 公司. 仪器: PTC-200 PCR 仪 (MJ Research), ABI377 DNA 自动测序仪 (PE Applied Biosystems)

1.2 方法

1.2.1 菌液培养: 200 μ l 96 孔板, LB 37 静置培养约 10 h. 接种菌一般可直接在固体培养基上挑选.

1.2.2 PCR 扩增

100 μ l 体系 PCR 反应液组成: TaKaRa Ex Taq (5 U/ μ l), 0.5 μ l; 10 \times Ex Taq 缓冲液, 10 μ l (Mg^{2+} 终浓度为 2.0 mmol/L); dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), 8 μ l; 引物 R1, 20 pmol; 引物 R2, 20 pmol; 加灭菌蒸馏水至反应体积 100 μ l. 将反应液按比例放在冰上混合, 20 μ l 每孔分装至 96 孔 PCR 反应板. 用枪头沾一下菌液, 在反应液中搅拌片刻以完成“模板接种”, 直接将 96 孔板置于 PCR 仪上进行反应. 反应条件: 96 (30 s), 94 (30 s), 55 (30 s) -72 (1 min), 30 个循环后 4 保存.

1.2.3 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 结果.

1.2.4 测序前扩增 (Cycling, 10 μ l 体系) DT Premix, 2 μ l; 单向引物 R2 (5 μ mol/L), 1 μ l; PCR 反应后原始产物, 6 μ l; 加灭菌蒸馏水至反应体积 10 μ l. PCR 反应条件: 96 (10 s), 50 (5 s), 60 (4 min), 30 个循环后 4 放置.

*通讯联系人.

Tel: 021-64700892-522, E-mail: tysabc@online.sh.cn

收稿日期: 2001-07-19, 接受日期: 2001-09-12

1.2.5 样品沉淀后溶解, PE 公司 ABI377 自动测序仪测序.

2 结果与讨论

2.1 实验结果

我们用不同菌液浓度 (通过培养时间控制) 及不同 PCR 反应体积做了比较实验 (图 1). 发现菌

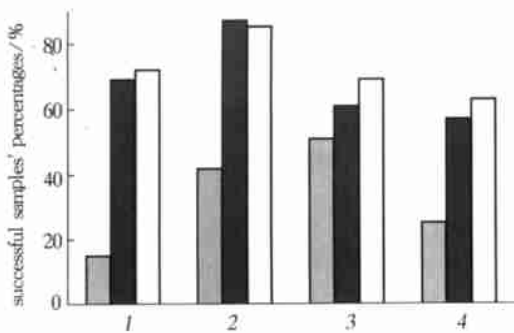


Fig. 1 Successful rate related to different culture volume and time

1: Culture volume is 200 µl total, 37°C, 5 h; 2: 1.2 ml total, shake speed: 300 r/min, 37°C, 10 h; 3: 200 µl total, no shake, 37°C, 10 h; 4: Directly dot from plate colony. available sequence reading above 300 bp is considered a successful sample. Every column contains 98 samples. ■: 10 µl PCR volume; ■: 20 µl; □: 100 µl.

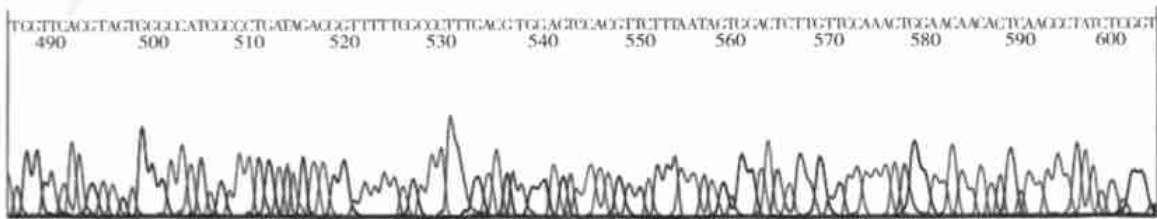


Fig. 3 sequence sample

2.2 注意事项

采用此法要控制好 1.2.2 中菌落 PCR 的两引物浓度, 在本法中并未有去除引物的步骤, 所以若该两引物浓度过高, 会严重影响到接下来的测序 cycling 反应 (只需单向引物), 菌落 PCR 去引物与未去引物样品的对照实验表明, 在一定范围内的引物浓度不会对测序造成太大影响 (图 4), 但不是完全没有影响. 实验结果表明, 无论是否去除引物, 采用菌落 PCR 方法的总成功率 (约 70%) 均未达到传统方法的 90%, 我们分析可能在去引物组是由于多了一步 DNA 沉淀过程, 而未去引物组是引物在一定程度的干扰. 目前正在研究两引物可否在载体位置上的重叠或错开更大距离, 并试图通过调整 PCR 反应的温度和时间控制来减少这一干扰, 以增加成功率.

液含菌量不能高, 一般用 LB 培养液静置培养 10 h, 在加到 PCR 反应液前, 可事先用排枪吸打几次以混匀菌液. 考虑到成本, PCR 反应体积不宜过大, 一般 20 µl 体系足够, 其中 4 µl 用作测序反应, 6 µl 电泳鉴定 (图 2), 约 10 µl 备用.



Fig. 2 Electrophoresis of Colony PCR DNA products

M: /Hind marker. 1~11: randomly selected colonies, (3 is no PCR result). 12, 13: PCR after DNA extraction.

通过大量实验比较, 采用菌落 PCR 后的测序结果与原来方法的测序结果并无显著差别, 平均每个样品可读到 500 bp 以上 (图 3). 并且我们已经用此法初步测完水稻 (*Oryza sativa indica*) 第四号染色体上的一个 BAC 的全长序列 (约 100 kb), GenBank 登录号为: AL512542.

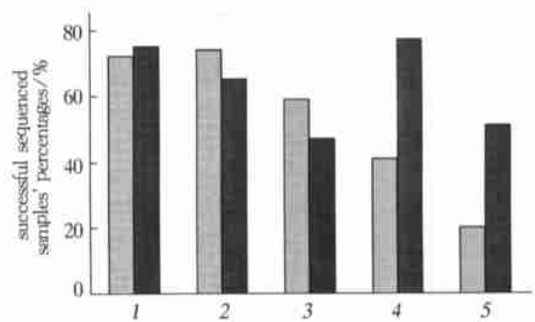


Fig. 4 Influence to sequence result by primer density

The final primers' density to PCR is 1: 50 nmol/L; 2: 0.2 µmol/L; 3: 0.5 µmol/L; 4: 1 µmol/L; 5: 5 µmol/L. Every column contains 98 samples. ■: directly sequence after colony PCR; ■: primer purification after colony PCR.

我们还发现在未扩增出的样品中, 部分原因是亚克隆中插入片段过大, 该 PCR 反应条件无法拉出全长 DNA, 所以保证 PCR 反应成功率高的另一关键在于构建亚克隆库的过程, 应尽量保证待测随机插入 DNA 片段大小维持在一定范围.

此外, PCR 反应液应尽量在冰中调制, 这种冷启动方式可增强 PCR 扩增的特异性, 表现为琼脂糖凝胶电泳的单一清晰条带。

2.3 该法特点

不用抽提 DNA 是此法的最重要特点。另外值得一提的是, 由于 PCR 反应的特异性, 对于阳性克隆的筛选结果也可起鉴定作用, 如果在构建亚克隆库过程中的连接转化实验中出现大量假阳性菌落 (IPTG-Xgal 板无法检测出来), 可事先通过菌落 PCR 结果后的琼脂糖凝胶电泳检查出来 (表现为大量样品无法 PCR 扩增或扩增出的条带大小不符), 从而避免了测序后才发现问题所带来的时间和成本的浪费。

外扩增 DNA. 金冬雁, 等译. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 672 ~ 690

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 14. 1 ~ 14. 34

- 2 Espelund M, Jakobsen J. Cloning and direct sequencing of plant promoters using primer-adaptor mediated PCR on DNA coupled to a magnetic solid phase. *Biotechniques*, 1992, **13**: 74 ~ 81
- 3 Luo G, Ivicsa Z, Izsv K Z, *et al.* Chromosomal transposition of a Tc1/mariner-like element in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (18): 10769 ~ 10773
- 4 Barsalou L, Glushko R, Tenenbaum J, *et al.* Rapid isolation of genes from an indexed genomic library of *C. cinereus* in a novel pabl + cosmid. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, **35** (2): 129 ~ 141
- 5 Schmit, Jean-Claude, Lidia R, *et al.* Comparison of the LiPA HIV-1 RT test-selective PCR and direct solid phase sequencing for the detection of HIV-1 drug resistance mutations. *Journal of Virological Method*, 1998, **73** (1): 77 ~ 82

参 考 文 献

- 1 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 聚合酶链式反应体

Colony PCR Apply to The Rice Genome Sequencing

TANG Ye-Sheng¹*, LI Ying², ZHU Jing-Jie², HU Xin², LIN Zhi-Xin¹, HAN Bin², HONG Guo-Fan²

¹ College of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China;

² National Center for Gene Research of The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China)

Abstract A method of using colony PCR products to sequence directly by controlling primer design. Less time and cost than the normal way (without DNA extraction and sequencing prior purification). It can also detect the false insert fragments by electrophoreses of the PCR products. One BAC DNA of the *Oryza sativa indica* 4th chromosome has been sequenced by this method, the GenBank Accession number: AL512542.

Key words colony PCR, rice genome, sequencing

* Corresponding author. Tel: 86-21-64700892-522, E-mail: tysabc@online.sh.cn

Received: July 19, 2001 Accepted: September 12, 2001