

# 基于巢式 PCR 的重叠延伸 PCR 优化

彭雷<sup>1</sup>, 赵艳<sup>2</sup>, 马银花<sup>2</sup> (1. 贵州师范大学生命科学学院, 贵州贵阳 550001; 2. 武汉大学生命科学学院, 湖北武汉 430072)

**摘要** [目的]结合巢式 PCR 对重叠延伸 PCR 进行优化。[方法]以褐飞虱 *Actin 1* 基因启动子区与 EGFP 表达盒区基因融合为例, 通过巢式 PCR 对重叠延伸 PCR 进行优化。[结果]成功获得融合片段, 经过巢式 PCR 优化后大大简化试验流程, 缩短试验时间, 并增强 PCR 特异性与检出率。[结论]优化了重叠延伸 PCR, 可更快速高效融合基因片段。

**关键词** 重叠延伸 PCR; 巢式 PCR; 褐飞虱; *Actin 1* 启动子

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)20-126-02

## Optimization of Splicing by Overlap Extension PCR Using Nested PCR

PENG Lei<sup>1</sup>, ZHAO Yan<sup>2</sup>, MAYin-hua<sup>2</sup> (1. College of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550001; 2. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072)

**Abstract** [Objective] To optimize the Splicing by overlap extension PCR using nested PCR. [Method] Nested PCR was used to optimize SOE-PCR (splicing by overlap extension PCR) for combining brown planthopper (BPH) *Actin 1* promoter and EGFP expression cassette. [Result] Nested PCR could greatly optimize SOE-PCR. After optimization of nested PCR, the test process was simplified, and the detection time was shortened. The PCR specificity and detection rate were enhanced. [Conclusion] The optimized SOE-PCR can rapidly and effectively fuse the gene segment.

**Key words** SOE-PCR; Nested PCR; Brown planthopper; *Actin 1* promoter

重叠延伸 PCR (splicing by overlap extension PCR, SOE-PCR) 由 Horton 等<sup>[1-2]</sup>于 1989 年创立。重叠延伸 PCR 是一种通过基因间重叠的部分互相搭桥, 通过 PCR 延伸来扩增出融合基因, 被广泛应用于基因定点突变、基因融合等领域<sup>[3-4]</sup>。巢式 PCR (nested PCR) 是一种在普通 PCR 技术上发展而来的技术, 其原理为设计两对引物, 其中一对引物在另一对引物扩增产物的片段上, 通过二次 PCR 反应对某个基因进行检测<sup>[5]</sup>。巢式 PCR 可大大降低假阳性, 同时可使检测的下限下降几个数量级。笔者以褐飞虱 *Actin 1* 基因启动子区与增强绿色荧光蛋白 (Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP) 融合为例, 结合巢式 PCR 对重叠延伸 PCR 进行优化, 优化后重叠延伸 PCR 可更快速高效融合基因片段。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 供试褐飞虱饲养在温室, 饲养温度为 (22 ~ 28) °C, 光照时间 14 h/d。

**1.2 试剂** pEGFP-N1 载体、Top 10 感受态细胞为武汉大学杂交水稻重点实验室保存。高保真聚合酶 KOD Plus 购自 Toyobo; PMD18-T Simple Vector、DNA solution I 为 TaKaRa 产品。PCR 产物胶回收试剂盒购自 Omega。其他试剂均为国产或进口分析纯。

**1.3 褐飞虱 DNA 提取** 褐飞虱基因组 DNA 提取皆为单头虫提取, 所用方法为 CTAB 法, 参照文献<sup>[6-7]</sup>并略做改动。将采集的单头褐飞虱放入装有 400 μL 2% CTAB 的 1.5 mL 离心管中, 用匀浆小棒捣碎匀浆; 将匀浆液放入 60 °C 水浴锅中水浴 60 min 裂解; 在裂解完毕后的匀浆液中加入 200 μL 氯

仿/异戊醇 (24:1) 抽提 2 次; 加入 2 倍体积无水乙醇 -20 °C 沉淀; 最后 DNA 风干后溶于 50 μL TE, 于 -20 °C 保存备用。

**1.4 PCR 扩增** 以褐飞虱基因组为模板, 引物 A1-1 与 A1down 扩增褐飞虱 *Actin 1* 基因启动子区, A1-1 序列: 5'-CCTATAAAATGATCATCTATTG-3'; A1down 序列: 5'-CTTGCTCACCATGTTGATATCCTTTCTTGTGTTTAGTTAA-3'。A1-1 位于 *Actin 1* 距 ATG 上游 1 031 bp 的位置, A1down 为下游嵌合引物, 位于 *Actin 1* ATG 前端侧翼起始位置。以 pEGFP-N1 载体作为模板, 引物 EGFPoverlapF 与 EGFP1 扩增 EGFP ORF 框序列。EGFPoverlapF 序列: 5'-AGGATATCAACATG-GTGAGCAAGGGCGAGGAG-3'; EGFP1 序列: 5'-TTAAGATACATGATGAGTTTGG-3'。EGFPoverlapF 为上游嵌合引物, 从载体 679 位的 EGFP ATG 开始, 下游 EGFP1 引物为载体的 1 643 位开始。50 μL PCR 体系: 10 × buffer 5 μL, 2 mmol/L dNTPs 5 μL, 25 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 3 μL, 10 μmol/L 引物 1.5 μL, KOD Plus 1 μL。两次 PCR 扩增条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环。

取上 2 次 PCR 产物各 1 μL 作为模板并加入巢式引物, PCR 反应体系同上。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环。巢式引物: A1-2 5'-TTGAAAAGTGCATCAATTTATAA-3' 位于 ATG 上游 1 007 bp 位置; EGFP2 5'-TTTGGACAAACCACAACACTAGAA-3' 位于载体 1 625 bp 的位置。

**1.5 重叠片段测序鉴定** 先将扩增到的重叠片段纯化后加入 A 尾, 加 A 尾为普通 PCR 体系: 10 × PCR buffer 5 μL, 2 mmol/L dNTPs 5 μL, 10 μL 普通 *Taq* 酶, 1 μg PCR 产物, 加 dH<sub>2</sub>O 至 50 μL。反应条件: 72 °C 延伸 30 min。加尾后的重叠片段和 PMD18-T 载体按 3:1 混合, 加入等体积 DNA solution I, 16 °C 连接 5 h。将连接片段转化 Top10 感受态细胞, 涂布氨苄 LB 平板, 37 °C 培养过夜, 挑取白色菌落。以载体通用测序引物 M13-47 和 RV-M 进行菌落 PCR 扩增, 1% 琼脂

**基金项目** 国家自然科学基金项目“水稻抗褐飞虱基因多样性持续控制褐飞虱的分子机理”(31230060)。

**作者简介** 彭雷 (1980-), 男, 四川南充人, 实验师, 博士, 从事水稻与褐飞虱互作研究。

**收稿日期** 2016-07-06

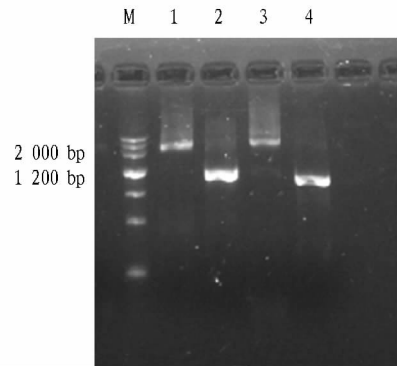
糖电泳检测插入片段大小,将阳性克隆的菌液送出测序。

## 2 结果与分析

利用褐飞虱基因组为模板扩增 *Actin 1* 启动子区序列,扩增出 1 031 bp 长片段(图 1)。以 pEGFP-N1 载体作为模板扩增 EGFP 完整表达盒序列,扩增到 964 bp 片段(图 1)。各取 2 个基因 PCR 产物 1  $\mu$ L 作为模板,加入巢式引物扩增得到 1 953 bp 片段(图 1)。连接 PMD18-T 载体,T-A 克隆测序后证实成功通过重叠延伸 PCR 将两基因融合(图 2)。

## 3 讨论

对于 2 个基因融合的重叠延伸 PCR 的一般步骤:先设计 4 条引物 A1、A2、B1、B2,其中,A2 和 B2 为嵌合引物。A1 和 A2 扩增 A 基因,B1 和 B2 扩增 B 基因,将两基因片段电泳切胶回收作为模板,加入 A1 与 A2 引物扩增,在 A、B 基因 3' 端的 A2、B2 引物嵌合序列搭桥将 A、B 融合,再用 A1 与 A2 引物以融合基因作为模板进行扩增。对于三段基因融合,同样也扩增出三段基因,其中一段基因与另两段基因搭桥<sup>[8]</sup>。重叠延伸 PCR 需要注意:重叠延伸 PCR 由于是多重 PCR,扩增易产生碱基错配,因此,重叠延伸 PCR 一般用高保真酶且控



注:M: DNA Marker III;1 和 3. 重叠延伸 PCR 产物;2. 褐飞虱 *Actin 1* 基因启动子区扩增产物;4. EGFP 表达盒扩增产物。

Note:M;DNA Marker III;Lanes 1 and 3 were SOE-PCR products; Lane 1 was amplification products of *Actin 1* promoter; Lane 4 was amplification products of EGFP expression cassette

图 1 目的基因扩增与重叠延伸 PCR 扩增产物

Fig. 1 Amplification products of SOE-PCR and target gene amplification

```
ATTGTTTTTGTGTTGTCAGGTTAACTAAAGCAAGAAAGGATATCAACATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
TTCACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCT
```

注:方框为嵌合引物 EGFPoverlapF 序列,灰色背景序列为 EGFP 序列,灰色背景前序列为 *Actin 1* 启动子区序列。

Note:Box was the EGFPoverlapF sequence of chimeric primer;sequence of gray background was EGFP sequence;antecedent? sequence of gray background was the sequence of *Actin 1* promoter.

图 2 重叠延伸 PCR 融合基因测序部分结果

Fig. 2 Sequencing results of fusion gene by SOE-PCR

制循环数来最大限度地减低错配几率<sup>[9]</sup>。该研究以褐飞虱 *Actin 1* 基因启动子区和 *EGFP* 基因融合为例,结合巢式 PCR 对重叠延伸 PCR 进行优化。只需多设计一对巢式引物,并在重叠延伸反应中用巢式引物进行扩增,这样可大大加快重叠延伸 PCR 过程,并增强特异性。传统重叠延伸 PCR 首先扩增基因后需要切胶纯化后才能进行下一步重叠,这样才能保证扩增特异性,减少杂带。且由于需纯化,对前 2 个基因扩增产物有一定要求才能保证回收效果,而引入巢式 PCR 后可省去切胶回收过程,且对前 2 次 PCR 产物要求也降低。用巢式 PCR 对重叠延伸 PCR 优化后使整个过程大大简化,同时极大提高 PCR 检出率,降低 PCR 扩增条件。

## 参考文献

[1] HO S N, HUNT H D, HORTON R M, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction[J]. *Gene*, 1989, 77(1): 51-59.

- [2] HORTON R M, HUNT H D, HO S N, et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: Gene splicing by overlap extension[J]. *Gene*, 1989, 77(1): 61-68.
- [3] 魏薇, 李凡, 陈海如. 利用重叠延伸 PCR 技术扩增长片段 DNA[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2008, 31(1): 86-88.
- [4] 徐芳, 姚泉洪, 熊爱生, 等. 重叠延伸 PCR 技术及其在基因工程上的应用[J]. 分子植物育种, 2006, 4(5): 747-750.
- [5] 黄昆仑, 罗云波. 用巢式和半巢式 PCR 检测转基因大豆 Roundup Ready 及其深加工食品[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(5): 461-466.
- [6] MAGUIRE T L, COLLINS G G, SEDGLEY M. A modified CTAB DNA extraction procedure for plants belonging to the family proteaceae[J]. *Plant molecular biology reporter*, 1994, 12(2): 106-109.
- [7] TANG M, LV L, JING S, et al. Bacterial symbionts of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae)[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2010, 76(6): 1740-1745.
- [8] THORNTON J A. Splicing by overlap extension PCR to obtain hybrid DNA products[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1373: 43-49.
- [9] 杨宇, 吴元华, 郑雅楠. 利用重叠延伸 PCR 技术进行 DNA 的人工合成[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(9): 1810-1811.