

应用nested和touch down PCR技术分离 牦牛CAPN1大亚基基因EST^{*}

蔡欣¹, 吴建平², 徐明旭³, 张利平², 汪虹英⁴, 刘雅楠³

(1 西北农林科技大学 生命科学院, 陕西 杨凌 712100;

2 甘肃农业大学 动物科技学院, 甘肃 兰州 730070;

3 北京大学 人类疾病基因研究中心, 北京 100083;

4 甘肃省漳县第一中学, 甘肃 漳县 748300)

[摘要] 钙激活中性蛋白酶1(CAPN1)基因是影响肉嫩度的候选基因。根据GeneBank中已公布的CAPN1基因cDNA序列设计同源PCR引物,通过RT,nested和touch-down PCR技术从牦牛肌肉组织总RNA中分离目的序列,与pGEM-T-easy载体连接后转化DH5 α 感受态菌株,通过PCR扩增、限制性酶切和测序分析鉴定阳性克隆。分离到的基因片段为牦牛CAPN1大亚基的部分编码序列,在GeneBank中的注册号为AY197555,与奶牛、人、食蟹猴、小鼠、绵羊以及大鼠相应序列的同源性分别为98%,89%,89%,83%,96%和81%,在不同物种之间具有较强的保守性。CAPN1基因EST的分离为进一步研究牦牛CAPN1基因奠定了基础。此研究表明,在总RNA质量不理想的情况下,同时采用这2种技术可以较大幅度地获取目的序列。

[关键词] nested和touch-down PCR; EST分离; CAPN1大亚基基因; 牦牛

[中图分类号] Q343

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)02-0014-05

应用PCR扩增微量靶序列时,一次扩增往往难以获得满意效果,通过巢式PCR技术进行多次扩增可以提高扩增的特异性;同样,扩增产物的电泳带谱中往往杂带占优势,解决此问题的经验方法是调整Mg²⁺浓度或者PCR反应的退火温度,但该方法费时费事。Don等^[1]设计的touch-down PCR技术,可使PCR退火阶段阳性产物的富集效率极大提高。钙激活中性蛋白酶(calpain)有2种,即 μ -calpain(CAPN1)和m-calpain(CAPN2),均由大小2个亚基组成,其中30 ku小亚基在2种酶中相同,为单个基因产物,而80 ku大亚基是2个相关基因的产物^[2]。CAPN1参与增殖、分化和凋亡等细胞事件^[3,4],动物的大部分细胞骨架蛋白质、肌节蛋白都是CAPN1的天然底物,其降解与肉的嫩度相关^[5]。有关人、小鼠和奶牛的CAPN1基因EST序列的分离以及克隆的研究已有报道^[6,7]。影响牛肉嫩度的基因座位有2个,其中一个被定位于BTA15的中段^[8],另一个被定位于BTA29的端粒末端,而CAPN1基因处于后

一座位^[9]。牦牛作为一个种群,其CAPN1基因EST序列的分离、基因克隆等相关研究至今尚未见报道。本研究通过RT,nested和touch-down PCR技术从牦牛肌肉组织总RNA中分离CAPN1基因EST序列,测序并进行了相应的生物信息学分析,以期将获取的EST序列用于牦牛CAPN1基因的克隆与分析,为CAPN1基因的进一步研究找到突破口。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牦牛肌肉组织样采自甘肃省玛曲县。TRIzol ThermoScriptTM RT-PCR System 购自Invitrogen公司;LA Taq DNA聚合酶与限制性内切酶Sal I 购自TaKaRa公司;pGEM-T-easy载体、T4 DNA连接酶和Xgal 购自Promega公司;其他试剂均为国产分析纯。*E. coli* DH5 α 由北京大学人类疾病基因研究中心保存。

^{*} [收稿日期] 2004-03-16

[基金项目] 教育部科学技术研究重点项目(03130)

[作者简介] 蔡欣(1973-),男,甘肃漳县人,在读博士,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: caixin2323@126.com

[通讯作者] 吴建平(1960-),男,陕西西安人,教授,博士生导师,主要从事动物生物技术与遗传育种研究。

E-mail: wujp@gsau.edu.cn

1.2 方 法

1.2.1 引物设计 用ClustaW 软件将GeneBank 中公布的奶牛、猪和人的CAPN1 基因cDNA 序列进行同源性比对, 选取高保守区设计巢式PCR 引物(图1)。

Cai3(5' primer):

5'-GAA GGA TGGCCGA GGA GTTCA TCAC-3';

Cai4(3' primer):

5'-GTCTACGCAAA CA TGGTCA GCTG-3';

Cai5(5' primer):

5'-CCTGA TCCGGA TGCGGA ACCCCTG-3';

Cai6(3' primer):

5'-GTGCTCCCCCGCCGCCA GGTGC-3'.

上述引物由北京赛百盛公司合成。

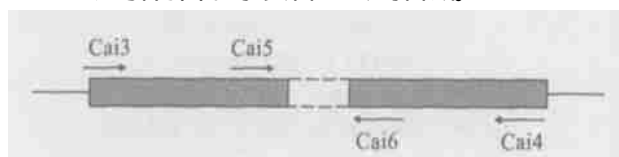


图1 巢式PCR 引物设计示意图

含有5'和3'非翻译区的CAPN1 基因

ORF (通读框): 引物对Cai3 与Cai4 之间相距2132 bp;

Cai5 与Cai6 之间相距226 bp

Fig 1 Schematic diagram of the nested PCR amplification strategy for CAPN1 EST of *Bos grunniens*

ORF of CAPN1 containing 5' and 3' untranslated regions: the sequence between Cai3 and Cai4 is 2132 bp; between Cai5 and Cai6 is 226 bp

1.2.2 总RNA 的提取 采用TRIzol 试剂提取牦牛肌肉组织总RNA。试验步骤如下: 1 mL TRIzol+ 50~100 mg 肌肉组织, 匀浆→15~30 孵育5 min→加0.2 mL 氯仿→摇匀→4 离心, 12 000 g × 15 min→取上层水相→加0.5 mL 异丙醇, 混匀, 静置20 min, 15~30 孵育10 min→4 离心, 12 000 g × 15 min→小心移去上层液体→加500 mL 体积分数70%乙醇洗涤RNA 沉淀, 震荡混匀→4 离心, 12 000 g × 5 min→干燥RNA 沉淀(不使完全干燥)→重悬于RNA 酶的双蒸水或SDS 溶液。-70 保存备用。

1.2.3 RT, nested PCR 和touch down PCR 按照ThermoScript™ RT-PCR System 试剂盒说明进行RT 反应, 合成cDNA 第一链。

nested PCR: 先用引物对Cai3 和Cai4 进行第1 次PCR 扩增, 扩增体系为25 μL, 其中10 × PCR buffer 2.5 μL, dNTPs 2.5 μL, RT 产物1 μL 作模板, 上下游引物各0.5 μL, LA Taq DNA 聚合酶0.2 μL, 反应条件采用touch down PCR 策略: 94 预变性4 min; 96 变性20 s, 58 复性1 min, 72 延伸

90 s, 3 个循环; 96 变性20 s, 56 复性1 min, 72 延伸90 s, 3 个循环; 96 变性20 s, 54 复性1 min, 72 延伸90 s, 3 个循环; 96 变性20 s, 52 复性1 min, 72 延伸90 s, 3 个循环; 96 变性20 s, 50 复性1 min, 72 延伸90 s, 28 个循环; 最后72 延伸7 min。将PCR 产物用1% 琼脂糖凝胶分离, EB 染色, 照相。取第1 次PCR 产物0.5 μL 作模板, 分别采用引物对Cai3 和Cai6, Cai5 和Cai4 进行第2 次扩增, 反应体系中其他组分和剂量与第1 次PCR 相同, 反应条件也与第1 次PCR 相同, 将PCR 产物分离, EB 染色, 照相。取第2 次PCR 产物1 μL 作模板, 用引物对Cai5 和Cai6 进行第3 次扩增, 反应体系其他组分和剂量与第1 次PCR 相同, 反应条件为: 94 预变性4 min; 96 变性20 s, 50 复性1 min, 72 延伸90 s, 30 个循环; 最后72 延伸7 min。将PCR 产物分离, EB 染色, 照相。

1.2.4 PCR 产物的克隆 PCR 产物经过 silica 回收后与pGEM-T-easy 载体连接, 转化DH5α 菌株, 在LA 培养基上培养。挑取白斑在3 mL LA 培养液中进行单菌落培养, 用碱裂解法提取质粒, 经Sal I 酶切与PCR 扩增鉴定重组克隆。

1.2.5 DNA 测序与生物信息学分析 阳性重组克隆由北京大学人类疾病基因研究中心在ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer 测序仪上完成测序。将牦牛CAPN1 EST 序列在NCBI 数据库中进行Blastn 分析, 并用ClustaW 程序进行多序列比对分析。

2 结果与分析

2.1 RT, nested PCR 和 touch down PCR 扩增与牦牛CAPN1 基因EST 的分离及测序

总RNA 的OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.56, 说明受到一定程度降解和杂蛋白质的污染, 但是可以进行后续RT-PCR 反应。RT-第1 次PCR 扩增的产物经过凝胶分离, 照相后发现, 没有特异性条带。以第1 次PCR 产物作模板, 分别用引物对Cai3 和Cai6, Cai5 和Cai4 进行第2 次扩增, 各得到6 条和1 条扩增带, 但是特异性均不强(图2)。以引物对Cai3 和Cai6 扩增的产物作模板, 采用引物对Cai5 和Cai6 进行第3 次PCR 扩增, 结果得到比较清晰的3 条扩增带, 其中最小的1 条带约为270 bp, 与预期序列大小相符; 2

条较大的扩增带约540和1 600 bp, 均为非特异性扩增(图3)。将270 bp 扩增带回收、纯化后与载体连接。重组质粒经过限制性内切酶 SaI 切割, 所释放出的片段大小与预期的相符合; 通过引物对Cai5和

Cai6进行PCR 扩增检查插入片段大小, 结果也扩增到预期大小的片段, 表明重组质粒中插入的是目的序列片段(图4), 从阳性重组克隆中提取质粒DNA

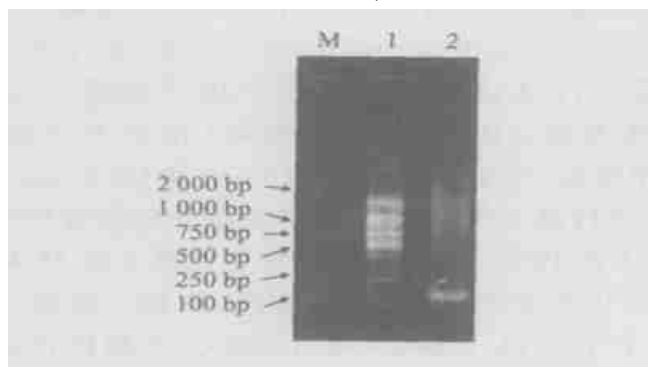


图2 第2次PCR 扩增结果

M. DNA marker (DL 2000); 1. 引物对Cai3和Cai6扩增结果; 2. 引物对Cai5和Cai4扩增结果

Fig 2 Results of the second-round PCR amplification

M. Molecular weight marker (DL 2000);

1. PCR products using primers Cai3 and Cai6;

2. PCR products using primers Cai5 and Cai4

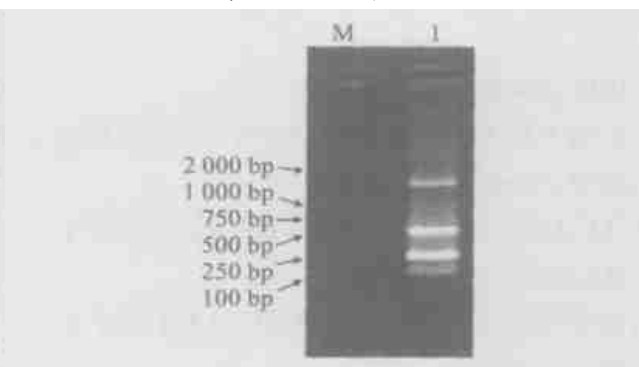


图3 第3次PCR 扩增结果

M. DNA marker (DL 2000); 1. 引物对Cai5和Cai6扩增结果

Fig 3 Results of the third-round PCR amplification

M. Molecular weight marker (DL 2000);

1. PCR products using primers Cai5 and Cai6

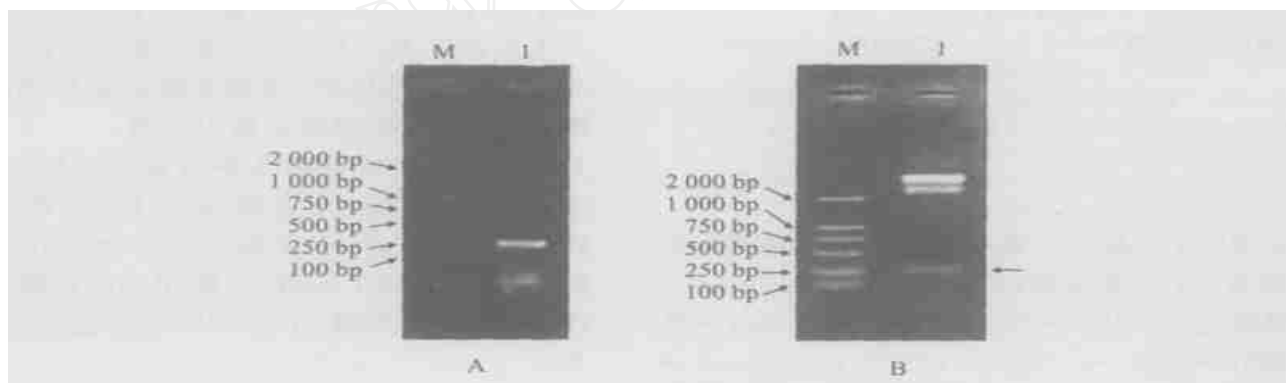


图4 牦牛pGEM-T-CA PN 1重组质粒的PCR 扩增分析与酶切鉴定

A. 重组质粒的PCR 扩增鉴定; B. 重组质粒的 SaI 酶切鉴定; M. DNA marker (DL 2000); 1. 牦牛pGEM-T-CA PN 1重组质粒

Fig 4 PCR amplification and restriction enzyme digestion of pGEM-T-CA PN 1 recombinant plasmid of *Bos grunniens*

A. PCR amplification of the recombinant plasmid; B. Restriction enzyme digestion of the recombinant plasmid using SaI ;

M. DNA marker (DL 2000); 1. pGEM-T-CA PN 1 recombinant plasmid of *Bos grunniens*

```

1: X G E V E W T G A W S D G S S E W N G V
1 NNGGGCGAGGTGGAGTGGACAGGAGCCTGGAGTGACGGCTCCTCGGAGTGGAAACGGCGTG 60
1: G P Y M R E Q L R V K M E D G E F W M S
61 GGCCCTTACATGCGGGAGCAGC TCCGGGTC AAGATGGAGGATGGGGAG TTC TGGATGTCA 120
1: F R D F M R E F T R L E I C N L T P D A
121 TTCCGAGACTTCATGCGTGAATTCACTCGCCTGGAGATCTGCAACCTGACACCCGATGCG 180
1: L K S Q R F R N W N T T L Y E
181 CTCAAGAGCCAGAGGTTCGCAACTGGAACACCACCCTGTACGAG 226
  
```

图5 牦牛CA PN 1基因EST 核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig 5 Nucleotide and deduced amino acid sequence of EST for CA PN 1 of *B. grunniens*

2 2 生物信息学分析

筛选后的阳性重组克隆被用于测序,结果表明,大小为 224 bp 的序列为牦牛CAPN1 EST 序列,在 GenBank 中的注册号为 AY197555。将此序列在 NCBI 数据库中进行 Blastn 分析,结果表明,其与奶牛、人、食蟹猴、小鼠、绵羊和大鼠的同源性分别为

98%, 89%, 89%, 83%, 96% 和 81% (表 1)。经 ClustaW 程序进行多序列比对后的结果表明,牦牛CAPN1 基因EST 序列,与各个不同种哺乳动物的相应序列的同源性均超过 88%,而且在不同物种之间具有较强的保守性。

表1 牦牛CAPN1 基因EST 序列与其他哺乳动物相应序列的同源性分析

物种 Species	Genebank 登录号 Accession No	比分 Score	期望值 Expect value	同源性/% Identities
奶牛 <i>Bos grunniens</i>	AF221129	504	e-140	98
绵羊 <i>Ovis aries</i>	AF071575	168	2e-39	96
猪 <i>Sus scrofa</i>	AF263610	400	e-109	93
人 <i>Homo sapiens</i>	BC017200	313	7e-83	89
食蟹猴 <i>Macaca fascicularis</i>	AF284440	305	2e-80	89
小鼠 <i>Mus musculus</i>	XM192846	183	3e-42	83
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	NM019152	147	9e-33	81

3 讨 论

目前,对人、食蟹猴、奶牛和猪的钙激活中性蛋白酶基因的研究比较详细,但对于牦牛钙激活中性蛋白酶基因的研究尚未见到相关的报道。号称“高原之舟”的牦牛是我国青藏高原的特色种群,我国牦牛数量占全世界牦牛总数的 90 % 以上,占我国牛数量的 1/6^[10],主要作为肉用。但牦牛肉的嫩度普遍比较低,影响了肉的品质。钙激活中性蛋白酶基因作为对肉的嫩度有影响的候选基因,对其进一步研究将对改良与提高牦牛肉的嫩度性状有重要意义。

本研究通过 3 套巢式引物,即 Cai3-Cai6, Cai5-Cai4 和 Cai5-Cai6 进行 nested PCR 扩增,使引物与靶序列特异结合的几率和扩增的特异性显著提高。因为 touch-down PCR^[1]有效利用了 PCR 指数扩增,并且在预期退火温度或之上起始反应,所以扩增过程中当退火温度以 2℃ 的梯度从 58℃ 递降到预期的 50℃ 时,适合于引物与靶序列特异退火的温度会出

现。在提取总 RNA 质量不理想的情况下,本研究从牦牛肌肉组织总 RNA 中成功地分离到了 CAPN1 的部分编码序列,扩增的特异性和产物的富集效率显著提高,说明在 EST 序列的分离过程中,同时采用 nested 和 touch-down PCR 技术可以弥补总 RNA 被部分降解的缺陷,并可从中较大限度地获取目的序列。

分离到的牦牛CAPN1 基因EST 序列与其他哺乳类对应序列具有较高的同源性,与奶牛、绵羊和猪的同源性分别为 98%, 96% 和 93%, 与人和食蟹猴的同源性均为 89%, 该序列与偶蹄目动物对应序列的同源性较灵长类动物的高,可能在进化过程中更为保守。牦牛CAPN1 部分编码序列的分离与分析为牦牛CAPN1 基因的进一步研究奠定了基础。在今后的工作中,利用已获得的 EST 序列,可以克隆牦牛CAPN1 基因全长序列,进而进行此基因与牛肉嫩度相关性方面的分子遗传标记研究。

[参考文献]

[1] Don R H, Cox P T, Wainwright B J, et al 'Touch-down' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification[J] Nucleic Acid Research, 1991, 19(14): 4008

[2] Croal D E, Demartino G N. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation[J] Physiological Reviews, 1991, 71(3): 813- 847.

[3] Suzuki K, Sornachi H. A novel aspect of calpain activation[J]. FEBS Lett, 1998, 433(1- 2): 1- 4

[4] Azam M, Adrabi S S, Sahr K E, et al Disruption of mouse mu-calpain gene reveals an essential role in platelet function[J] Mol Cell Biol, 2001, 21(6): 2213- 2220

[5] Koohmarai M, Babiker A S, Merkel R A, et al Role of Ca²⁺-dependent proteases and lysosomal enzymes in postmortem changes in bovine skeletal muscle[J] J Food Sci, 1988, 53: 1253

- [6] Aoki K, Ohno S, Emori Y, et al Molecular cloning of the cDNA for the large subunit of the high- Ca^{2+} -requiring for human Ca^{2+} -regulated neutral protease[J]. *Biochem*, 1988, 27: 8122- 8128
- [7] Poirier C, Poussard S, Faust D M, et al Mapping, cloning, cDNA sequence, and expression of the gene of the mouse micromolar calpain large subunit[J]. *Mamm Genome*, 1998, 9: 388- 389
- [8] Keele J W, Shackelford S D, Kappes M, et al A region on bovine chromosome 15 influences beef longissimus tenderness in steers[J]. *J Anim Sci*, 1999, 77: 1364- 1371
- [9] Smith T P L, Casas E, Rexroad C E, et al Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness[J]. *J Anim Sci*, 2000, 78: 2589- 2594
- [10] 冯凯. 对发展牦牛业的几点做法和建议[J]. *青海畜牧*, 1996, 26(3): 33

Isolation of EST for CAPN1 of *Bos grunniens* with nested and touch-down PCR

CAI Xin¹, WU Jian-ping², XUM Jing-xu³, ZHANG Liping²,
WANG Hong-yang⁴, LIU Ya-nan³

(1 College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

3 Human Disease Genomics Center, Peking University, Beijing 100083, China;

4 The First Middle School of Zhangxian County, Zhangxian, Gansu 748300, China)

Abstract: CAPN1 gene was investigated as candidate gene affecting meat tenderness. With the primers designed according to cDNAs encoding CAPN1 published in GeneBank, RT, nested and touch-down PCR were used to isolate EST of total RNAs from muscle of *Bos grunniens*. The PCR product was ligated to pGEM-T-easy vector, and then *E. coli* DH5 α strain was transformed. Positive clones were identified by restriction endonuclease, PCR and sequencing. The partial sequence encoding CAPN1 of *Bos grunniens* was identified, the corresponding ESTs of *Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Macaca fascicularis*, *Mus musculus*, *Ovis aries* and *Rattus norvegicus* shared 98%, 89%, 89%, 83%, 96% and 81% homology with that of *Bos grunniens* respectively. It indicated that the EST was comparatively conservative between different species. Isolation of the EST has made substantial basis for further research on CAPN1 gene of *Bos grunniens*. The result of this research suggests that the combining use of nested and touch-down PCR is an effective method in EST isolation even though total RNAs are partially degraded.

Key words: nested and touch down PCR; EST isolation; gene for large subunit of CAPN1; *Bos grunniens*