

# 皖南花猪 ESR 基因 PCR 扩增影响因素初探

陈艳荣,舒咏明,王德青

(黄山学院 生命与环境科学学院,安徽 黄山 245021)

**摘要:**采用 PCR 扩增皖南花猪 ESR 基因 140bp 的特异片段,对 ESR 基因 PCR 扩增的相关因素进行研究,以提高扩增的效率,通过多次实验确定皖南花猪 ESR 基因的 PCR 反应条件。

**关键词:**皖南花猪;ESR 基因;PCR

**中图分类号:** Q959.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-447X(2009)03-0066-04

## 1 前言

近年来,对动物经济性状(数量性状)多基因构成的遗传分割的研究成为遗传学研究的热点之一,而猪的高繁殖性更是众多研究中的热点。猪的产仔性能的高低直接影响猪的生产效率,而猪的产仔数性状的遗传力只有 0.1 左右,又是限性表达性状,因此常规的育种技术对繁殖性状的遗传改良十分有限。分子生物学和分子遗传学的发展使得寻找多仔基因的遗传标记、开展标记辅助选择成为可能。在猪的高繁殖力特性研究中,与产仔数有显著关联的候选基因主要以雌激素受体基因(Estrogen)为主。多聚酶链式反应(Polymerase chain reaction)简称 PCR 技术,是一种体外扩增特异 DNA 片段的技术,此法操作简便,可在短时间内获得数百万个特异性 DNA 序列的拷贝。影响 PCR 反应结果的因素较多,其中如何获得高质量的基因组 DNA 模板以及 PCR 反应体系中各种成分分子的优化组合,是获得清晰可重复的扩增产物的前提,也是扩增反应能否成功的关键。<sup>[1]</sup>为保证反应结果的稳定性和可靠性,同时降低反应成本,必须系统地探讨基因组中 DNA 的 PCR 反应体系中各种因素对扩增结果的影响,对 PCR 进

行优化,以期为目的基因 PCR 反应成功提供稳定可靠的方法。

## 2 材料与方法

### 2.1 试验材料

本实验用产仔母猪共计 12 头,其中皖南金川 8 头,皖南歙县 4 头。除采集毛样外还搜集了本实验所需的繁殖性状的记录包括产仔总数(total number born,TNB)。

### 2.2 试验方法

#### 2.2.1 引物的设计与筛选

参照已经发表的人、鸡、鼠 ESR 基因序列,按照引物设计的一般原则进行引物设计。<sup>[2,3]</sup>通过设置引物长度、GC 含量、扩增片断大小、解链温度  $T_m$  值和模板片断的起止碱基序号等参数,找出一定数量的引物对,从中再进行人工选择 GC 含量相近、扩增片断长度和范围适宜的对子,最后进一步检验筛选出不存在发夹结构的二聚体的引物对。

通过查阅相关的文献资料和网上公布的有关引物对序列,根据所要扩增的猪 ESR 基因特异片断,最后筛选出一对引物:<sup>[4,5]</sup>

ESRF:5'-CCTGTTTTTACAGTGACTTTTTACAGAG-3,

收稿日期:2008-11-16

基金项目:安徽省高等学校青年教师基金资助(2005JQL140)

作者简介:陈艳荣(1978-),山西侯马人,黄山学院生命与环境科学学院讲师,硕士,主要从事遗传学研究

ESRR:5'-CACTTCGAGGGTCACTCCAATTAG-3。

### 2.2.3 PCR 反应

在保持其它因素一致的情况下,通过变化单一因子来筛选某个最优参数。在对 PCR 反应参数进行筛选时,其它的参数设定均按随机引物的生产厂家上海生物工程公司所建立的扩增条件说明,以确定该参数对扩增结果的影响。在 25 $\mu$ l 体系中,10 $\times$  buffer (Mg<sup>2+</sup>-Free)2.5 $\mu$ l, Mg<sup>2+</sup>2.5 $\mu$ l, dNTP2 $\mu$ l, 引物 1.4 $\mu$ l(10pmol/ $\mu$ l), Taq DNA 聚合酶 0.2 $\mu$ (5u/ $\mu$ l), 加入制备的 DNA 模板 25ng, 最后用无菌去离子水补至 25 $\mu$ l。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 240 秒, 55 $^{\circ}$ C 复性 45 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 秒, 共 34 个循环, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 480 秒, 对一些重要参数包括模板, Mg<sup>2+</sup>, 退火温度进行梯度设置, 并严格控制其他参数和反应条件, 确保实验的准确性和可靠性。

### 2.2.4 检测

#### 1. DNA 纯度和浓度的检测

采用紫外光检测和琼脂糖电泳检测。测定 DNA 样品在 260nm 和 280nm 处的紫外光吸收, A<sub>260</sub> 与 A<sub>280</sub> 之比应大于 1.75, 低于此值则表明制备物中存留有显著量的蛋白质。并计算 DNA 浓度, OD 值为 1 的溶液大约含 50 $\mu$ g/ml DNA。或用 0.5-1% 的琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)检测: DNA 上清液 4 $\mu$ l, 6 $\times$  载样 buffer 共 6 $\mu$ l 用点样枪将样品点入凝胶点样孔中, 60-80 伏电泳 40 分钟左右(溴酚兰指示剂电泳到凝胶板的一半), 即可取下凝胶板在紫外灯下检察, 距离点样孔不远的一条带, 条带越明亮说明 DNA 含量越高。

#### 2. PCR 产物检测

3-3.5% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)检测 PCR 扩增产物: PCR 产物 4 $\mu$ l, 溴酚兰 2 $\mu$ l 共 6 $\mu$ l, 用点样枪将样品点入凝胶点样孔中, 60-80 伏电泳大约 40 分钟(溴酚兰指示剂电泳到凝胶板的 2/3), 即可取下凝胶板在紫外灯下检察, 同时点有 Marker, 若 120bp 附近可见一条明亮的条带, 则是扩增产物, 若未出现扩增条带的样品, 则要再次进行扩增(调整 Mg<sup>2+</sup> 的浓度)。

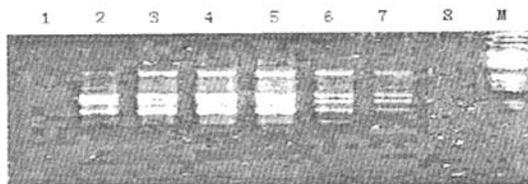
## 3 结果分析

### 3.1 PCR 条件的确定

#### 3.1.1 不同模板深度的结果

用相同的引物对 6 种不同模板量进行 PCR

扩增, 发现在模板量 < 25ng 的条件下, 扩增产物强度相应减弱, 大约到 2ng 左右时无扩增产物。当模板量在 25ng-200ng 之间时, 扩增产物基本稳定, 条带清晰、稳定, 分辨率高。当模板量 > 200ng 时, 会出现大片扩增产物的缺失或无扩增产物, 且点样孔至泳道会出现相应增强的弥散背景, 结果见图 1。实验所用 Marker 均为 100bp Ladder, 100-600bp)。

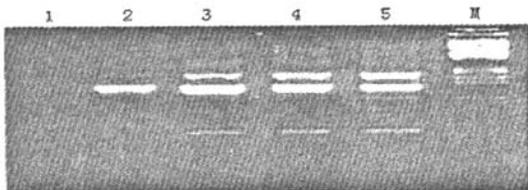


注: 1-8 分别代表模板为 2ng, 5ng, 25ng, 50ng, 100ng, 200ng, 300ng, 400ng

图 1 不同模板浓度对扩增结果的影响

#### 3.1.2 不同 Mg<sup>2+</sup> 浓度的结果

设置不同 Mg<sup>2+</sup> 浓度, 当 Mg<sup>2+</sup> 浓度为 1.0mM 时, 无 PCR 扩增产物; Mg<sup>2+</sup> 浓度为 1.5-2.5mM 时, 随着 Mg<sup>2+</sup> 浓度的增加, PCR 扩增产物带型基本一致, 但以 1.2-1.5mM 的扩增效果较好; 当 Mg<sup>2+</sup> 浓度增至 3.5mM 时, 扩增强度减弱, 并出现扩增片段的缺失, 产生弥散背景, 结果见图 2。

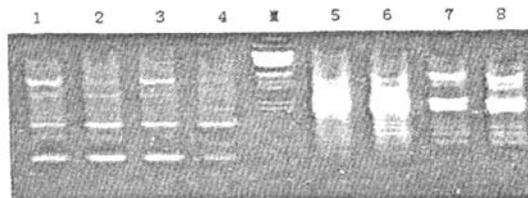


注: Mg<sup>2+</sup> 浓度从左至右分别为: 1.0mM, 1.5mM, 2.0mM, 2.5mM, 3.0mM

图 2 不同 Mg<sup>2+</sup> 浓度下的扩增效果

#### 3.2.3 不同退火温度的结果

按照优化的 PCR 反应体系将退火温度设置以 45 $^{\circ}$ C 为界, 用 2 $^{\circ}$ C 依次增加。结果表明随着退火温度降低, 非特异性产物增加, 有弥散背景; 退火温度升高, 特异性相对增加。本实验以 55 $^{\circ}$ C 退火温度下的扩增产物清晰、丰富、均匀。结果见图 3。



注: 1-8 分别为 45 $^{\circ}$ C, 47 $^{\circ}$ C, 49 $^{\circ}$ C, 51 $^{\circ}$ C, 53 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ C, 57 $^{\circ}$ C, 59 $^{\circ}$ C

图 3 不同退火温度对扩增结果的影响

### 3.2.4 最终 PCR 反应体系

#### 1. PCR 反应体系

10×PCR buffer(含 MgCl <sub>2</sub> 15mmol)	2.5μl
4×dNTPs(2.5mM)	2.0μl
Primers(10pmol/μl each)	1.4μl
Template DNA (25ng/μl)	4μl
Tag DNA polymerase(5U/μl)	0.2μl
加水至 25μl	

#### 2. PCR 反应条件

94℃预变性 4 分钟, 55℃退火 45 秒, 72℃延伸 1 分钟, 然后进入如下循环 (共 34 个): 94℃变性 1 分钟, 55℃退火 45 秒, 72℃延伸 1 分钟。循环结束后, 72℃延伸 8 分钟, 最后 4℃保存。

## 4 讨论

### 4.1 关于猪 ESR 基因 PCR 反应条件的确定

本实验中, PCR 扩增成功与否直接关系到实验的进展, 也是整个实验的难点, 必须不断地对 PCR 反应的条件进行摸索, 最后确定一套行之有效的办法, 这样才能达到 PCR 反应的特异性、有效性和真实性三个指标。Tag DNA 聚合酶的活性和保真性、DNA 模板的浓度、Mg<sup>2+</sup>的浓度、反应体系的 PH 值, 引物的量和纯度, 退火温度及时间, 循环次数等的选择等都将影响到产物的质量和产量。PCR 反应混合物成分的比例和 PCR 反应条件是 PCR 反应成功的关键, 为了保证高质量的 PCR 扩增产物应注意以下几点。

1. DNA 模板的要求。因为只有高完整性的 DNA 才能提供较高浓度的可供 PCR 的完整模板, 所以必须要求高质量的模板。在 DNA 样品中不能存在抑制物, 如 DNA 中存在 0.01% SDS 即可抑制反应进行。因此, 在 DNA 抽提过程中, 尽量除去杂质 (酚、SDS 等), 在 DNA 浓度方面, 它直接影响扩增产物的再现性、特异性和产量, 过量的模板会增加错配的机会, 从而增加非特异性的程度。如果起始模板用量太少, 扩增高分子量、低拷贝数的靶序列时再现性不好, 常检测不到产物, 为此需要优化起始模板浓度, 以达到要获得的期望大小的 PCR 产物的特异性和产量之间的平衡。本实验根据抽提 DNA 浓度的不同, 在实验过程中设置了浓度梯度, 最后确定在 25μl 反应体系中加入 4μl DNA (25μg/μl) 溶液较合适。

2. 引物与模板之间的比例, 对 PCR 的特异性也是非常重要的。若引物模板比太高时, 则得不到特异产物, 若该比例太低 (小于基因组 DNA 标准反应条件的 0.1%), PCR 效率会大大降低, 以至达不到检测要求。通常 DNA 的量较多或高等的复杂 DNA (如人基因组 DNA) 作模板时, 引物浓度应低些, 反之, 引物浓度应高些。<sup>[24]</sup> 本实验参考此方法在 25μl 反应体系中分别加入引物 1 和引物 2 各 1.25μl (10pmol/μl) 获得了较好的扩增效果。引物的浓度不应过高或过低, 过高时可能出现非特异性扩增条带, 且易形成二聚体, 过低时产率低, 效果不好。

3. dNTP 浓度过高可加快反应速度, 但同时增加碱基的错误掺入率即错配率和实验成本, 而低浓度的 dNTP 会降低反应速度以及产物量, 但可以提高实验的精确度。为使 PCR 效率达到最高, 必须保证反应混合物中有足够量的 dNTP。一般情况下使用 dNTP 的浓度通常为 20–200mmol/L。另外, 反复多次冻融会使 dNTP 产生降解, 从而降低 dNTP 的扩增效率, 因此, 在使用 dNTP 之前应先分装。

4. PCR 反应的缓冲液。较高的 Mg<sup>2+</sup>能得到较高的产量, 但同时也增加了非特异性扩增产物。对于大多数的 PCR 引物来说, MgCl<sub>2</sub> 的浓度为 1.5mmol/L 是最适宜的。如果扩增效果不好即在进行扩增检测时, 条带的亮度不高, 则应调整 Mg<sup>2+</sup>的浓度可能会有所帮助。dNTP 能螯合 Mg<sup>2+</sup>, 所以 dNTP 浓度的改变会影响有效 Mg<sup>2+</sup>浓度, 因此 Mg<sup>2+</sup>浓度应随 dNTP 浓度的变化而变化。Mg<sup>2+</sup>不仅可以为 PCR 反应提供适当的反应环境, 而且与扩增条带的亮度有关, 若扩增条带亮度不够, 则提高 Mg<sup>2+</sup>的浓度效果会更好, 若过量会增加非特异性扩增, 并影响产率。本实验中采用 1.2–2.5mM Mg<sup>2+</sup>先进行条件摸索, 选择最佳的 Mg<sup>2+</sup>浓度。一般在确定最佳 Mg<sup>2+</sup>浓度时, 要设置从 1–3mM (每次增加 0.5mM) 的浓度梯度进行筛选。本实验通过这种方法找到了最佳 Mg<sup>2+</sup>浓度为 1.2mM 和 1.5mM。

5. 在本实验的扩增反应体系中, 对于 25μl 的反应体积而言, 酶的用量 1.0U 能够得到很好的扩增结果。如果酶的用量过大不仅会增加实验成本, 而且还会出现非特异性条带, 如果酶的用量过低则会降低产物的量。值得注意的是不同生产厂家、不同批次的酶, 扩增效果截然不同, 所以要对 Tag DNA 聚合酶的选择以及摸索不同的反应条件, 从而达到酶的最佳使用量。此外, Tag 酶的作用环境应维持在

PH8.0 左右,过酸或过碱都难以得到产物。

6.退火温度是影响扩增反应效果的一个非常重要的因素,因此应进行退火温度的优化。引物的退火温度比其  $T_m$  值低大约 5-10℃。<sup>[6]</sup>合适的温度通常在 45-68℃之间(预备实验可以用 2℃间隔进行摸索)。在  $T_m$  允许的范围内,选择较高的退火温度可大大减少引物和模板之间的非特异结合,然而过高的退火温度有时会得不到扩增产物。若退火温度过低,扩增效率提高,但非特异性扩增产物增加,如果退火温度过高,特异性增加,但扩增效率大大降低甚至无结果。理想的办法是设置一系列温度梯度,以确定反应的最适退火温度。本实验只有在适当的退火温度条件下才能得到理想的扩增效果,在用琼脂糖检测时才能检测到理想的结果。因此,在这个温度范围内设温度梯度,结合电泳图谱确定最适的反应条件。本实验通过设置温度梯度得到的最佳退火温度是 55℃。

7.延伸时间的确定。如果延伸时间太短,或得不到扩增产物后有一些短的非特异性产物优先生成,而延伸时间太长,会出现拖影现象。

8.循环次数一般 30-35 次既可满足要求。若循环次数过多,不但会出现非特异性条带,而且由于时间过长,反复多次经历高温变性与低温退火使得 Tag DNA 聚合酶的催化效率降低,循环次数过少,产物太少,不易检测。通过设置一系列对照实验,确定循环次数为 34 次。

#### 4.1.2 引物

所选的引物序列将决定 PCR 产物的大小、位置,扩增区域的  $T_m$  值。好的引物设计可以避免背景和非特异产物的产生,极大地影响扩增产量,可得到达到产量接近于反应指数期的产量理论值。引物设计的目的是在两个目标间取得平衡,即扩增特异性和扩增效率。特异性是指发生错配的频率。特异性不好或劣等的引物会产生额外的非特异性 PCR 产物,特异性一般通过引物长度和退火温度控制。引物效率是指在每一次 PCR 循环中一对引物扩增的产物与理论上成倍增长量的接近程度。<sup>[7]</sup>一般设

计 PCR 引物应遵循以下原则。

1.PCR 引物应该保持合理的 GC 含量,并且两个引物(G+C)%含量近似,大致是 50%-60%。

2.一般来说,引物长度在 18-24bp 之间的寡核苷酸链具有很好的序列特异性。引物中碱基的分布是随机的。

3.四种碱基中任何一种在引物中的含量在 10%-40%之间时,应避免一连串单个碱基(不出现 5 个以上同一碱基的寡聚体)或其它不常见结构。并且,引物的末端应避免发夹结构,两个引物间(尤其是 3,端)应避免互补配对(指大于 4 个以上的碱基配对),两个引物间应避免有同源性。

## 5 结论

采用文献及基因组数据库中公布的序列资料,通过对实验条件进行摸索,确定最佳的 PCR 反应体系和反应条件,排除人为因素(如加样错误),据此反应体系和条件均能较好地扩增目标片段。

#### 参考文献:

- [1]C.W.迪芬巴赫,G.S.德维克斯勒.PCR 技术实验指南[M].北京:科学出版社,1998.
- [2]J.萨姆布鲁克,E.F.费里奇,T.曼尼阿蒂斯.分子克隆指南[M].北京:科学出版社,1993.
- [3]明道绪.高级生物统计与实验设计[M].北京:高等教育出版社,2000.
- [4]熊远著.猪生化及分子遗传实验导论[M].北京:中国农业出版社,1997.
- [5]徐子清,梅书棋,樊俊华.猪 ESR 基因一个外显子片段的克隆与序列分析[J].畜牧兽医学报,2001,32(2):101-107.
- [6]Benita S et al.Estrogen receptor:bioactivities and interactions with cell signaling pathway[J].biology of Reproduction,1996,54:287-293.
- [7]Cassady j p,Johnson R K,Pomp D,et al. Identification of quantitative trait loci affecting reproduction in pigs[J].Animal Science,2001,79(3):623-633.

责任编辑:胡德明

## A Preliminary Study on the Influencing Factors in increasing ESR Gene of Southern Anhui Spotted Swine by PCR

Chen Yanrong, Shu Yongming, Wang Deqing

(Life and Environmental Science College, Huangshan University, Huangshan 245021, China)

**Abstract:** In this paper, the specific fragment 140bp of ESR gene of southern Anhui spotted swine is increased by PCR and the relevant factors influencing the increase in ESR gene is also discussed to enhance the efficiency of increase and confirm the PCR response conditions of ESR gene of the southern Anhui spotted swine through many tests.

**Key words:** Southern Anhui flower pig; ESR gene; PCR

# 皖南花猪ESR基因PCR扩增影响因素初探

作者: [陈艳荣](#), [舒咏明](#), [王德青](#), [Chen Yanrong](#), [Shu Yongming](#), [Wang Deqing](#)  
作者单位: [黄山学院生命与环境科学学院, 安徽, 黄山, 245021](#)  
刊名: [黄山学院学报](#)  
英文刊名: [JOURNAL OF HUANGSHAN UNIVERSITY](#)  
年, 卷(期): 2009, 11(3)  
引用次数: 0次

## 相似文献(1条)

1. 期刊论文 [陈艳荣](#). [王德青](#). [舒咏明](#). [赵志刚](#). [CHENG Yan-rong](#). [WANG De-qing](#). [SHU Yong-ming](#). [ZHAO Zhi-gang](#) 皖南花猪ESR基因与产仔数的遗传相关性研究 - 畜禽业2008(1)

用PCR-RFLPs法, 研究皖南花猪ESR基因与产仔数之间的关系, 实验通过对ESR基因型多态性检测, 并以皖南花猪这一特有品种猪进行遗传分析, 为今后该猪的选育工作提供理论依据和现实指导意义.

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_hsxxyb200903017.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_hsxxyb200903017.aspx)

下载时间: 2009年10月23日