



应用70 mer Oligo基因芯片从限制性cDNA片段中钓取目的基因

构建cDNA文库，并从中钓取基因是目前常规获得目的基因的方法之一，但构建文库的工作量大，重复机会多，常常造成人力、物力上的浪费。随着核酸合成技术的进步，长链寡核苷酸(oligo)的人工合成成为可能。统计分析表明，一条长度为70 bp的特异性oligo片段足以代表一个基因[1]。在本研究中，我们利用固化到玻片上的70 mer oligo作为探针，直接从本室创建的限制性显示技术[2][3](restriction display PCR, RD-PCR)所制备的cDNA片段集合中钓取目的基因，报告如下。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)及JM109大肠杆菌菌种来自广州军区广州总医院医学实验科，RNA抽提AE缓冲液(1.67 ml 3 mol/L NaAc、2 ml 0.5 mol/L EDTA、DEPC处理水定至100 ml)自备；QuickPrep mRNA纯化试剂盒、cDNA合成试剂盒购自Amersham Pharmacia公司。限制性内切酶Sau3AI、Taq聚合酶、T4 DNA连接酶、PMT-18 T 载体等购自Takara公司。

Oligo d(T)16-18、通用引物(5' GTTTGGCTGGT GTGGATCU 3')、Cy5 标记的通用引物(5' GTTTGGC TGGTGTGGATCU-Cy5 3')、接头(SIP: 5' pGATCmCA CACCAGCCAAACCA3'; SIR: 5' GGTTTGGCTGGT GTG3')由BIOASIA公司合成。QIAquick PCR 产物纯化试剂盒(QIAGEN公司)、poly-L-lysine(Sigma公司)、硅烷化玻片片基(DAKO公司)、DMSO及formamide(Amresco公司)、70mer 酵母oligo 样品板(QIAGEN Operon公司)。

1.1.2 仪器 PixSys 5500基因芯片打印仪(Cartesians公司)、ScanArray Lite扫描仪(GSI Lumoncis 公司)、紫外交联仪(BIO-RAD公司)、杂交盒(Corning公司)、DU530紫外分光光度仪(Beckman公司)、真空干燥仪购自(Savant公司)、310 DNA 测序仪(ABI公司)。

1.2 方法

1.2.1 酵母总RNA的提取 参照文献[4]用热酚-冷冻法抽提酵母总RNA，将酵母在30 °C摇床上以220 r/min培养至生长到对数期，取5 ml菌液收集细胞，然后加入400 μl AE缓冲液、40 μl 10%SDS、450 μl水饱和酸性酚，剧烈振荡5 min，65 °C孵育10 min，振荡使细胞破裂，迅速置于冰上3 min冷却，10 000×g 4 °C离心15 min，收集上清，加入等体积的酚：氯仿：异戊醇抽提，重复一次后在上清中加入1/10体积的NaAc和2.5倍体积的无水乙醇，-80 °C沉淀1 h，10 000×g 4 °C离心30 min，弃上清，加75%乙醇清洗，真空干燥后溶于20 μL DEPC水中，用DU530测浓度，-80 °C保存。

1.2.2 mRNA的纯化及cDNA合成 mRNA的纯化及cDNA合成分别按照Pharmacia公司QuickPrep mRNA纯化试剂盒说明书进行。将获得的mRNA在DU530中测定浓度，然后取5 μg 65 °C水浴中变性10 min，迅速放入冰浴中冷却，加入第一链反应混合液，混匀后42 °C保持1 h。然后加入第二链反应混合液，16 °C保持2 h。将所得的cDNA在65 °C变性10 min后冰浴冷却，上述酚：氯仿：异戊醇抽提一次，纯化柱纯化后用DU530测定

浓度。

1.2.3 限制性cDNA片段的制备及荧光标记

1.2.3.1 cDNA的限制性酶切 取逆转录得到的cDNA 2 μg ，加入1.6 μl Sau3A I，2.4 μl 10 \times H 酶切缓冲液，用ddH₂O将体积调定至24 μl ，37 $^{\circ}\text{C}$ 下酶切4 h，100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴2 min灭活，酶切后所有cDNA片段均具有GATC的粘性末端。

1.2.3.2 酶切片段加接头制备限制性cDNA片段 酶切片段两端加上的通用接头由两条单链寡核苷酸 SIP(500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)、SIR(600 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)逐渐降温退火而成，含有可与Sau3A I酶切位点互补的粘性末端。在EP管中加入5 μl cDNA酶切反应液、3 μl 通用接头、2 μl T4 DNA连接酶、3 μl 10 \times buffer、17 μl ddH₂O、16 $^{\circ}\text{C}$ 保持2 h，最后以Pharmacia S-400离心柱除去接头二聚体和小于100 bp的小片段，收集洗脱液作为限制性荧光标记的模板。

1.2.3.2 引物的设计和限制性cDNA片段的荧光标记 根据接头序列和内切酶粘端序列设计荧光标记的通用引物U，于PE公司9700型PCR仪进行扩增并荧光标记[5]，反应体系为3 μl 通用引物、1 μl 加接头的cDNA反应液、25 μl 2 \times PCR预混液、21 μl ddH₂O，反应参数为95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 min(95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s)共38个循环，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。然后用QIAquick PCR 产物纯化试剂盒对其进行纯化，用30 μl ddH₂O洗脱后，-20 $^{\circ}\text{C}$ 储存。

1.2.4 Oligo基因芯片的制备 参照Pat Brown[6]实验室方案，用poly-L-lysine包被DAKO硅烷化玻片，室温放置2周备用。以3 \times SSC溶解70mer 酵母oligo 样品板中的样品，将其终浓度调整至1 mg/ml，并至于振荡器上4 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜，然后用Cartesian Pixsys5500基因芯片打印仪取其中一个代表酵母SSA1基因(GeneBank索取号：YAL005C)的样品片段打印成18 \times 18的阵列，将芯片正面朝下至于3 \times SSC盐水湿盒上方再水合化，然后迅速的置入100 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中干燥，用紫外交联仪以65 mJ的总能量进行交联固定，以使探针共价交联结合在玻片表面，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.5 杂交与检测 芯片先在预热到42 $^{\circ}\text{C}$ 的预杂交液(25% Formamide、5 \times SSC、0.1% SDS，0.1 mg/ml BSA)中温育45 min，以封闭空白位点，然后在ddH₂O中洗5次，去除未结合探针，最后在异丙醇中浸一下，室温干燥。取5 μl 荧光标记好的限制性cDNA片段加入等体积的2 \times 杂交液(50% formamide、10 \times SSC、0.2% SDS)，95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 min，最大速度离心2 min冷却，滴加到阵列上，盖上盖玻片封闭，42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交16 h。然后依次在2 \times SSC/0.1%SDS，0.1 \times SSC/0.1%SDS，0.1 \times SSC溶液中清洗玻片，灭菌水漂洗后，无水乙醇脱水，室温下干燥。用的Scanarray Lite基因芯片扫描仪进行扫描。

1.2.6 限制性cDNA片段的剥除回收 在玻片阵列位置上滴加30 μl 0.01mol/L NaOH，42 $^{\circ}\text{C}$ 温育10 min，用微量加样器反复吹打抽洗，将样品片段从探针上剥除下来，扫描检测剥除效果后，再重复该步骤一次。将两次收集的剥除液合并，加入60 μl 0.01 mol/L HCl中和，然后在真空干燥仪中抽干，加入10 μl ddH₂O溶解，取1 μl 做模板，加入3 μl 无荧光标记的通用引物，25 μl 2 \times PCR预混液，21 μl ddH₂O，进行PCR扩增，反应参数为95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 min(95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s)共38个循环，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min，琼脂糖电泳检测。

1.2.7 回收片段的保存、测序以及BLAST同源性比较 用QIAquick PCR 产物纯化试剂盒对其进行纯化后，取1 μl 目的片段，加入1 μl pMD 18-T载体、5 μl 溶液I、3 μl ddH₂O，16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜，全量转化100 μl JM109感受态细胞，在含有X-Gal、IPTG、Amp的L-琼脂平板培养基上培养，挑取白斑菌落，扩大培养后，取100 μl 煮沸，10 000 \times g离心后取上清2 μl 做模板，用针对载体的引物S0100/S0101进行PCR，琼脂糖电泳鉴定，选取相对应的克隆抽提质粒，在310基因序列分析仪中用S0100做引物测序，将测序结果用BLAST进行同源性比较，确定成功转化的克隆后保种。

2 结果

2.1 oligo阵列杂交结果及剥除后结果

用代表酵母SSA1基因的oligo片段打印的基因芯片与荧光标记的限制性cDNA片段杂交结果见图1，第一次

剥除后结果见图2，第二次剥除后结果见图3。从图中可以看出，经过0.01 mol/L NaOH在42 °C下分两次各10 min处理，芯片上所有的已杂交片段都被洗脱下来，经扫描已经检测不到荧光信号。

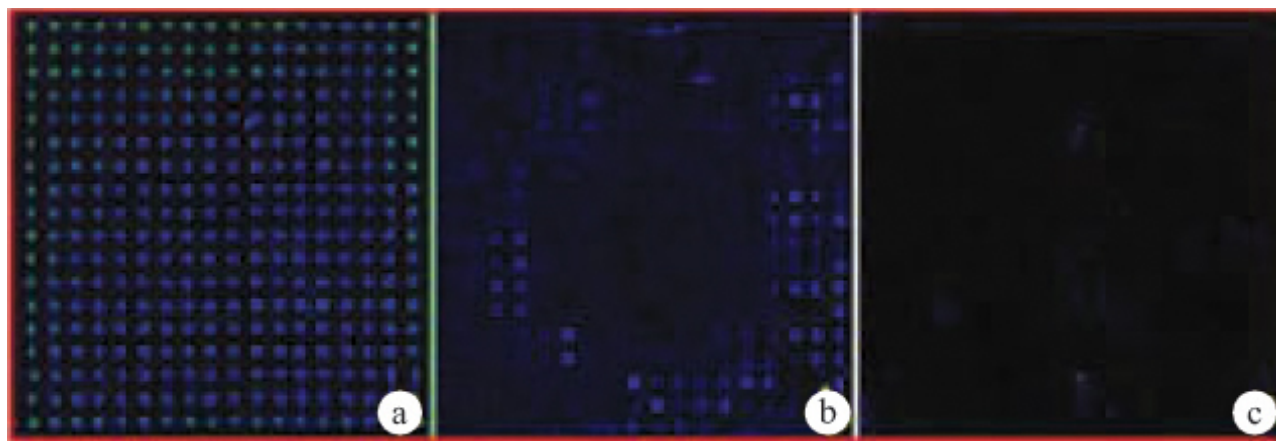


图1 芯片杂交与剥除后扫描图

Fig.1 Result of hybridization before and after the stripping processes
a: Image obtained immediately after the completion of hybridization with the yeast cDNA fragments;
b: Image of scanning after the first round of stripping; c: Image of the scanning after the second stripping.

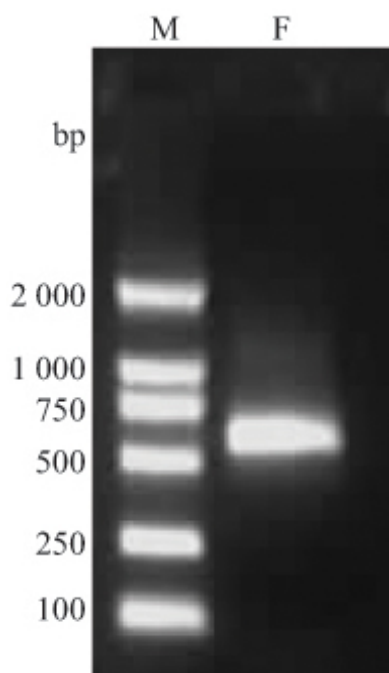


图2 回收片段扩增后电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of the retrieved fragment
M: DL2000 standard DNA ladder;
F: Retrieved fragment

2.2 回收片段PCR扩增后白色菌落PCR鉴定电泳结果

由回收片段PCR扩增后电泳结果(图2)可见，片段比较单一，长度约为600~650 bp；挑取30个白色菌落进行PCR鉴定，电泳结果(图3)示大部分片段长度均处于600~650 bp之间，与回收片段比较一致。

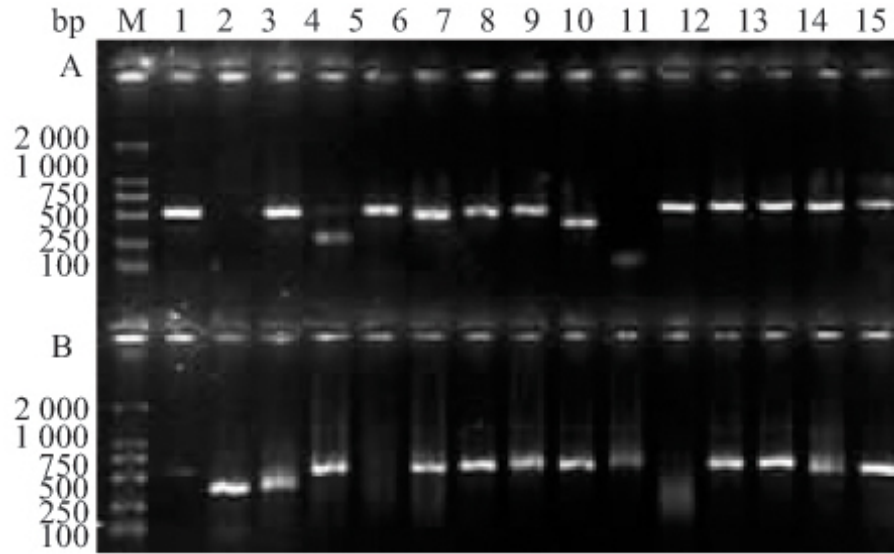


图3 阳性克隆PCR鉴定电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of the PCR products of the positive clones
M:DL2000 standard DNA ladder; LaneA1-A15, B1-B15: PCR products of the positive clones

2.3 测序后进行BLAST同源性比较的结果

根据图3的电泳结果，选取A1、A7、A9、A11、A13、B2、B3、B4、B6、B7、B13、B15共12个片段进行序列测定，经BLAST比较，证实A1、A11、A13、B4、B7、B13均为成功转化的目的片段。其它6个克隆经BLAST比较分别为：A7为大肠杆菌序列，A9、B2、B15为PUC18 T载体序列，B3、B7测序结果不佳，其中A13的序列BLAST比较如下：

3 讨论

随着近年来合成技术进步，应用长链寡核苷酸点样制备基因芯片成为可能，其中70 mer oligo被证明在灵敏度和特异性两方面表现最佳[7]，与传统的短链oligo(15~25 bp)需用20个左右片段组合来代表一个基因相比，70mer oligo一个片段即可代表一个基因；而相对于长短、碱基构成不同的cDNA芯片而言，人工设计的70mer oligo芯片具有更好的特异性和均一的Tm值，可提高芯片杂交的稳定性和可重复性。在本研究中，我们利用一个代表酵母SSA1基因的70 mer oligo点样成微阵列，作为特异性探针从限制性显示方法制备的cDNA片段库中钓取目的基因，并进行克隆鉴定。

限制性显示技术是本室创建的一种基因分离显示技术，通过对cDNA片段进行酶切后加上通用接头，可以应用通用引物对所有片段进行扩增。另外尚可以将荧光物质标记在通用引物上，从而经PCR扩增对cDNA片段库进行限制性荧光标记，与芯片杂交后，所有的结合片段由于一端存在有荧光标记的通用引物序列而能够检测到信号。在本研究中，我们将经荧光标记的cDNA片段与芯片杂交后，洗脱除去未结合片段及非特异性片段，从而将目的片段钓取到oligo芯片上，然后利用目的片段两端具有通用接头的特点，用NaOH将其剥除下来后，取通用引物再次进行PCR扩增，从而将目的片段回收。通过将目的片段克隆到PUC 18 T载体中，并进行测序鉴定，测序结果进行BLAST同源性比较表明，所获得的片段为SSA1基因片段，酶切位点在2058~2498范围。限制性内切酶Sau3 AI在参考序列该范围上的切点位置分别为1836、2057和2541，可能的酶切片段长度分别为221、484、705 bp，而本试验中所克隆的片段其酶切位点位于2494，故认为是本试验中所应用的菌种在此位点发生了A→G突变(在测序结果中以箭头标出)，从而经酶切产生了436 bp(2058~2494)的片段。

>gi|312351|emb|X12926.1|SCSSA1 Yeast DNA for SSA1 protein and tRNA-Pro
gene (member of 70 kD heat shock protein family)

Length = 3335

Score = 563 bits (284), Expect = e-157

Identities = 404/443 (91%), Gaps = 11/443 (2%)

Strand = Plus / Minus

Query: 41 gcttgatcaacttcttcgacagttggaccttcagcttctggagctggaggagcaccacct 100

|||||
|||||

Sbjct: 2498 gcttaatcaacttctcaacggttggaccttcagcctctggagctggaggagcaccacct 2439

Query: 101 gggnaaaccacctgga-----gctgagccttctggagcaccaccagcttngtaciaa 151

|||||
|||

Sbjct: 2438 ggg-aaaccgcctggagcaccacctgcagcgcaccctggagcaccaccagcttngtaciaa 2380

Query: 152 ttagacatgattgggtggcaacctcttgaattcctcaattggtcategaattcttc 211

|||||
|||||

Sbjct: 2379 ctagacatgattgggtggcaatgtcttgaactcctcaacttgcategaattcttc 2320

Query: 212 cttggtagcagtggtgtgcgatgctaaccaagcaatagttcttcagccttcttagtga 271

|||||
|||||

Sbjct: 2319 cttgctggcagtggtgtgc-tgtctaaccaagaaatagctcttcagccttcttggga 2261

Query: 272 cagcgtcctgtcagcttgcctagctgtcaccagcttcagaaatgggttcttcaaag 331

|||
|||||

Sbjct: 2260 cgggtcctgtcagcttgtccaattgtcaccagcttcagaaatgggttcttcaaag 2201

Query: 332 agtaagcaatggattccaattgggtcttgggagcaattcttgagattcctttcatctt 391

|||||
|||||

Sbjct: 2200 agtaagcaatggattccaattgggtcttgggagcaattcttgagattcctttcatctt 2141

Query: 392 ctctctgaattttcggcttcagcaaccatctttcgatatcttcttggacaatctac 451

|||||
|||||

Sbjct: 2140 ctctctgaattttcggcttcagcaaccatctttcgatatcttcttggacaatctac 2081

Query: 452 cctgtcgttggaatagtgatc 474

|||||
|||||

Sbjct: 2080 cctgtcgttggaatagtgatc 2058

对于oligo基因芯片而言，由于片段短，因此固定效率是影响杂交结果的重要因素。目前对其进行固定的措施包括提高点样的浓度、改进玻片的包被方法[8] (如应用树脂包被)、对oligo片段末端氨基化以使其和醛基化玻片结合等。然而，由于用poly-L-lysine包被玻片进行点样，固定效率随样品浓度的升高而降低的程

度最小,故目前poly-L-lysine包被玻片仍为制备oligo阵列的主要片基,但由于poly-L-lysine不能耐受NaOH的清洗,故在本实验中,实际上剥除下来的不仅是荧光标记的目的片段,poly-L-lysine涂层以及其固定的oligo片段也同时被剥除下来。从本文图1~3的变化中我们可以看出这种效应,即随着剥除力度的加强,背景荧光也消失了,整个包被层都被剥除下来。因此用poly-L-lysine包被玻片制备的oligo基因芯片是不能重复利用的。而如采用其它芯片,如尼龙膜、有机玻璃或塑料片基,进行剥除后的阵列是可以重复利用的,此时决定剥除效果的主要是NaOH的浓度,过高的浓度会在剥除样品片段的同时将探针剥除下来,而过低的浓度则不能达到完全剥除杂交样品的效果。

此外,应用oligo基因芯片做表达谱研究,由于事先没有构建探针文库,在杂交后如要对有表达差异的基因进行研究,需要重新设计实验获取目的基因,且一次反应一般只能获取一个目的基因。利用本方法,如取几种代表表达差异基因的oligo探针进行再次点样,则可以同时钓取多个目的基因,可较好的节约时间,提高效率,这也为oligo芯片杂交后研究提供了一条途径。

参考文献:

- [1] Li F, Stormo GD. Selection of optimal DNA oligos for gene expression arrays[J]. *Bioinformatics*, 2001, 17(11):1067-76.
- [2] 祝 骥, 马文丽, 李 凌, 等. 一种限制性cDNA文库的构建[J]. *遗传*, 2002, 24(2): 174-6.
Zhu J, Ma WL, Li L, et al. A method for construction of restriction cDNA library[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2002, 24(2): 174-6
- [3] Bao Z, Wenli M, Qinghua W, et al. Construction of a cDNA fragment library from SH-SY5Y cells using restriction display PCR[J]. *Br J Biomed Sci*, 2002, 59(1): 35-7.
- [4] Schmitt ME, Brown TA, Trumpower BL. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Nucl Acids Res*, 1990, 18(10): 3091-2.
- [5] 石 嵘, 马文丽, 刘翠华, 等. 两种限制性标记方法提高基因芯片杂交结果的信噪比[J]. *第一军医大学学报*, 2003, 23(2): 124-6.
Shi R, Ma WL, Liu CH, et al. Two restriction fluorescence labeling methods for enhancing the signal-to-noise ratio of cDNA microarray hybridization[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2003, 23(2): 124-6.
- [6] http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/1_slides.html.
- [7] http://www.qiagen.com/literature/Posters/PDF/Array_Detection/arra-yposter.pdf.
- [8] Consolandi C, Castiglioni B, Bordoni R, et al. Two efficient poly-meric chemical platforms for oligonucleotide microarray preparation[J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2002, 21(8-9): 561-80.

参考文献:

- [1] Li F, Stormo GD. Selection of optimal DNA oligos for gene expression arrays[J]. *Bioinformatics*, 2001, 17(11):1067-76.
- [2] 祝 骥, 马文丽, 李 凌, 等. 一种限制性cDNA文库的构建[J]. *遗传*, 2002, 24(2): 174-6.
Zhu J, Ma WL, Li L, et al. A method for construction of restriction cDNA library[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2002, 24(2): 174-6
- [3] Bao Z, Wenli M, Qinghua W, et al. Construction of a cDNA fragment library from SH-SY5Y cells using restriction display PCR[J]. *Br J Biomed Sci*, 2002, 59(1): 35-7.
- [4] Schmitt ME, Brown TA, Trumpower BL. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Nucl Acids Res*, 1990, 18(10): 3091-2.
- [5] 石 嵘, 马文丽, 刘翠华, 等. 两种限制性标记方法提高基因芯片杂交结果的信噪比[J]. *第一军医大学学报*, 2003, 23(2): 124-6.

Shi R, Ma WL, Liu CH, et al. Two restriction fluorescence labeling methods for enhancing the signal-to-noise ratio of cDNA microarray hybridization[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(2): 124-6.

[6] http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/1_slides.html.

[7] http://www.qiagen.com/literature/Posters/PDF/Array_Detection/arra-yposter.pdf.

[8] Consolandi C, Castiglioni B, Bordoni R, et al. Two efficient poly-meric chemical platforms for oligonucleotide microarray preparation[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2002, 21(8-9): 561-80.

[回结果列表](#)