

应用 70 mer Oligo 基因芯片从限制性 cDNA 片段中钓取目的基因

石 嵘¹, 马文丽¹, 刘翠华¹, 宋艳斌¹, 吴清华¹, 郭秋野¹, 郑文岭² (第一军医大学分子生物学研究所, 广东 广州 510515; ² 广州军区广州总医院医学实验科, 广东 广州 510010)

摘要:目的 探讨采用单一探针寡核苷酸阵列从经限制性显示方法制备的 cDNA 片段中钓取目的基因片段的方法。方法 酵母经常规培养, 抽提 mRNA 逆转录成 cDNA 后, 经限制性显示技术制备成限制性 cDNA 片段, 根据目的基因 SSA1 设计 70 mer 特异性 oligo 片段并打印成为寡核苷酸阵列。采用荧光标记的通用引物对上述经限制性显示技术获得的限制性 cDNA 片段进行标记, 与 oligo 阵列杂交, 洗脱, 扫描。然后进行杂交后剥离, 收集剥离液, 采用限制性通用引物扩增, 产物克隆于 PUC18 T 载体中, 并转化至 JM109 大肠杆菌中培养, 抽提质粒, 进行测序鉴定。结果 测序结果 BLAST 同源性比较表明, 用该方法成功的克隆出了目的基因片段。结论 采用 70 mer 寡核苷酸芯片可以直接从限制性显示方法处理的 cDNA 片段中钓取目的基因, 而无需构建 cDNA 文库。另外, 本方法也可用于 oligo 芯片的杂交后对有表达差异的基因的获取及研究中。

关键词: 基因芯片; RD-PCR; 荧光标记; 芯片剥离

中图分类号: Q754 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)07-0738-04

Isolation of the target gene from cDNA restriction fragments using 70-mer oligo microarray

SHI Rong¹, MA Wen-li¹, LIU Cui-hua¹, SONG Yan-bin¹, WU Qing-hua¹, GUO Qiu-ye¹, ZHENG Wen-ling²

¹Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Department of Medical Experiment, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: **Objective** To study the method for using a 70-mer oligo microarray as the probe to isolate target genes from the cDNA restriction fragments. **Method** Samples of *Saccharomyces cerevisiae* mRNA was extracted after heat shock culture and reversely transcribed into the double-stranded cDNAs, which were prepared into restriction cDNA fragments using restriction display (RD) method. The microarray was printed using a single 70-mer specific oligo designed to according to the SSA1 gene of yeast. The cDNA restriction fragments were labeled by PCR method with the Cy5 universal primer before hybridization with the microarray. The microarray was stripped after washing and scanning, and the strip solution was collected for another round of PCR amplification using the universal primer without fluorescence. The PCR product was then cloned into PUC18 T vector and transformed into to *E.coli* JM109 cells for amplification, and the plasmids were extracted and sequenced for identification. **Results** BLAST results showed that the target gene was cloned successfully. **Conclusion** The target gene can be isolated directly using the 70-mer oligo microarray as the probe from the cDNA fragments prepared by RD method, without the necessity of building a cDNA library. This method can also be used in further research to acquire the differentially expressed genes after the oligo microarray hybridization.

Key words: microarray; restriction display-polymerase chain reaction; fluorescent labeling; microarray stripping

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。

收稿日期: 2004-02-19

基金项目: 国家自然科学基金 (39880032); 广州市重点科技攻关项目 (99202201)

Supported by National Natural Science Foundation of China (39880032) and by Key Sci-Tech Research Project of Guangzhou (99202201)

作者简介: 石 嵘 (1977-), 男, 第一军医大学在读博士研究生, 研究方向为 DNA 芯片技术。

通讯作者: 马文丽, 教授, 博士生导师, Email: wenli@fimmu.edu.cn

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 CACCAGCCAAACCCA3'; 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 Lumonics 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 μ l AE 缓冲液、40 μ l 10% SDS、450 μ l 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 \times 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 \times g 4 °C 离心 30 min, 弃上清, 加 75% 乙醇清洗, 真空干燥后溶于 20 μ l 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 μ g 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 μ g, 加入 1.6 μ l *Sau*3A I, 2.4 μ l 10 \times H 酶切缓冲液, 用 ddH₂O 将体积调定至 24 μ l, 37 °C 下酶切 4 h, 100 °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 μ g/ μ l)、SIR (600 μ g/ μ l) 逐渐降温退火而成, 含有可与 *Sau*3A I 酶切位点互补的粘性末端。在 EP 管中加入 5 μ l cDNA 酶切反应液、3 μ l 通用接头、2 μ l T4 DNA 连接酶、3 μ l 10 \times buffer、17 μ l ddH₂O、16 °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 μ l 通用引物、1 μ l 加接头的 cDNA 反应液、25 μ l 2 \times PCR 预混液、21 μ l ddH₂O, 反应参数为 95 °C 变性 5 min 95 °C 30 s、60 °C 30 s、72 °C 60 s 共 38 个循环, 72 °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 μ l ddH₂O 洗脱后, -20 °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 °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 °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 °C 保存。

1.2.5 杂交与检测 芯片先在预热到 42 °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 μ l 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 °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 °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 μ l 0.01 mol/L NaOH, 42 °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 μ l 0.01 mol/L HCl 中和, 然后在真空干燥仪中抽干, 加入 10 μ l ddH₂O 溶解, 取 1 μ l 做模板, 加入 3 μ l 无荧光标记的通用引物, 25 μ l 2 \times PCR 预混液, 21 μ l ddH₂O, 进行 PCR 扩增, 反应参数为 95 °C 变性 5 min 95 °C 30 s、60 °C 30 s、72 °C 60 s 共 38 个循环, 72 °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 μ l 目的片段, 加入 1 μ l pMD 18-T 载体、5 μ l

溶液 I, 3 μ l ddH₂O, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 全量转化 100 μ l 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 μ l 煮沸, 10 000 \times g 离心后取上清 2 μ l 做模板, 用针对载体的引物 SO100/SO101 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 SO100 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 $^{\circ}$ 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。

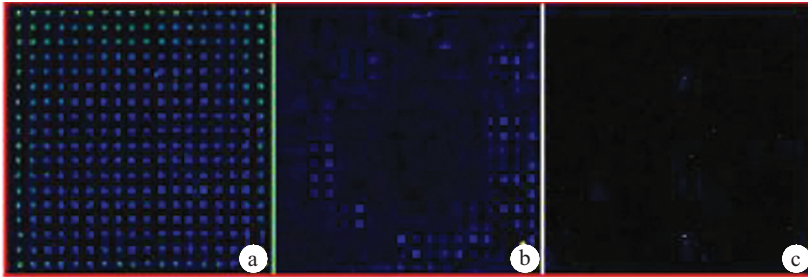


图 1 芯片杂交与剥除后扫描图
Fig.1 Result of hybridization before and after the stripping processes

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.

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。

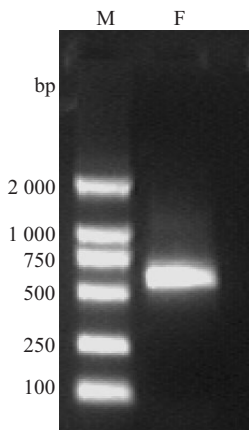


图 2 回收片段扩增后电泳图
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of the retrieved fragment
M: DL2000 standard DNA ladder;
F: Retrieved fragment

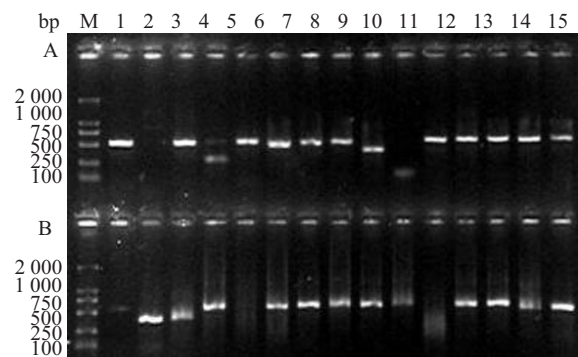


图 3 阳性克隆 PCR 鉴定电泳图
Fig.3 Agarose gel electrophoresis of the PCR products of the positive clones
M:DL2000 standard DNA ladder; LaneA1-A15, B1-B15: PCR products of the positive clones

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

>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 gcttgatcaactcttcgacagcttgacctcagctctggagctggaggagaccaccct 100
||||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct: 2498 gcttaatacaactcttcacagcttgacctcagctctggagctggaggagaccaccct 2439

Query: 101 gggnaaaccacctgga-----gctgacctctggagcaccaccagcttngtaca 151
||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct: 2438 ggg-aaaccgctggagcaccactgcagcggcaccctggagcaccaccagcttngtaca 2380

Query: 152 tttagacatgattgggtgcaacctctgcaattcctcaattggtcatgcaattcttc 211
||||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct: 2379 cttagacatgattgggtgcaacctctgcaattcctcaattggtcatgcaattcttc 2320

Query: 212 cttgtagcagtggtgctgcatgtctaaccaagcaatgcttctcagcctttagtga 271
||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct: 2319 cttgtagcagtggtgctgcatgtctaaccaagcaatgcttctcagcctttagtga 2261

Query: 272 cagcgtcctgtcagcttctctagctgtcaccagctcagaatggtgttctcaaag 331
||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct: 2260 cggtgtcctgtcagcttctctagctgtcaccagctcagaatggtgttctcaaag 2201

Query: 332 agtaagcaatggattccaattggttctggagcaattcttgagattcctttcatct 391
||||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct: 2200 agtaagcaatggattccaattggttctggagcaattcttgagattcctttcatct 2141

Query: 392 cttccttgaattttcggctcagcaaccatctttcgatatcttctggacaatctac 451
||||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct: 2140 cttccttgaattttcggctcagcaaccatctttcgatatcttctggacaatctac 2081

Query: 452 ccttgctgtgtaataatgtagc 474
||||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct: 2080 ccttgctgtgtaataatgtagc 2058

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。

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