

引物作不同组合进行数十个 PCR 反应。PCR 反应所用的锚定引物与逆转录的锚定引物相同。每一反应管中依次加入下列样品: 逆转录产物 2 μl 、PCR Buffer 2.5 μl 、5 mmol/L MgCl_2 1.5 μl 、随机引物及锚定引物各 1 μl 、0.5 mmol/L dNTPs 1 μl 、Taq DNA 聚合酶 1 μl 、加水至 25 μl 。滴加 1 滴石蜡油。按下列条件进行 PCR 扩增: 4 $^{\circ}\text{C}$ 2 min、94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s、50 $^{\circ}\text{C}$ 72 s、1 min、0 个循环、2 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 结束后用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。若结果符合实验要求,即提取的 RNA 完整,未降解。在上述 PCR 反应体系加入 [^{32}P]dATP 后,同样的条件下进行 PCR 反应。通过 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,原 0 益于 X 线胶片上放射性自显影,分离差异条带。

1.2.4 差异条带的第二次 PCR 扩增 切取差异条带,加入 100 μl 去离子水,00 益水浴 10 min,取 2 μl 作为模板,用同样的引物在相同的条件下进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳,回收目的条带。

1.2.5 目的条带的克隆

1.2.5.1 制备感受态细菌 用划线法将 DH-5 α 菌株接种于不含抗生素的 LB 培养板中,7 益孵育 20 h。挑单菌落到 3 ml 不含抗生素的 LB 培养液中,7 益孵育 12 h。取 1 ml 菌液接种于 100 ml LB 培养液中,7 益振荡 4 h,OD₆₀₀ 约为 0.4。冰浴 10 min,益 4000 r/min 离心 10 min,弃上清,菌体悬浮于 10 ml 0.1 mol/L 冰预冷的 CaCl_2 溶液中,冰浴 30 min,益 4 000 r/min 离心 10 min,弃上清,再用 2 ml 冰预冷的 0.1 mol/L CaCl_2 液重悬细菌,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 15 h 后,可应用于转化。

1.2.5.2 连接 TA 载体及目的条带 将 TA 载体及目的条带按 1:1 的比例加至连接反应体系中,再加入 10 μl 缓冲液 1 μl 和 T4 DNA 连接酶 1 μl ,单位进行粘端连接,6 益连接 15 h。

1.2.5.3 转化 取 100 μl 感受态细菌与 4 μl 连接反应产物混匀,冰浴 30 min,2 益热休克 90 s 后,迅速冰浴 2 min,再加入 800 μl LB 液混匀,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 170 r/min 振荡 45 min,以复苏细菌。

1.2.5.4 DNA 重组质粒的筛选及鉴定 含氨苄青霉素抗性的 LB 培养板表面均匀涂布 40 μl 100 g/L 氨-gal 和 4 μl 100 g/L 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷溶液,室温干燥。将复苏后的菌液 100 μl 涂布到平板上,菌液吸收后,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h。于 4 益放置平板数小时,充分显色。带有 β -半乳糖苷酶活性的菌落中间为淡蓝色,外周为深蓝色。插入片段破坏了质粒上的 β -半乳糖苷酶基因,菌株不能产生 β -半乳糖苷酶,菌落为白斑。挑选白斑,接种于 5 ml 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,7 益振荡培养 15 h。取 3 ml 细菌培养液,少量提取质粒,用 TA 载体上含有的酶切位点,选用合适的

限制性内切酶切割质粒,琼脂糖凝胶电泳显示结果。

1.2.5.5 阳性重组质粒的测序及序列分析 阳性重组质粒经过纯化后,经大连宝生生物有限公司测序。将序列分析所获得的数据与 Genebank 数据库资料进行比较。NCBI 同源性的网址: www.ncbi.nlm.nih.gov。

1.2.5.6 差异序列的斑点杂交 将上述差异片段制备成地高辛标记的探针,与大肠癌及癌旁正常大肠粘膜组织所提取的 RNA 样品进行杂交。

2 结果

2.1 总 RNA 样品的制备

用硫氰酸胍一步法提取的 RNA 经甲醛变性的琼脂糖凝胶电泳图谱显示,所提取的 RNA 完整,未降解,符合实验要求。8S/18S 的比值约为 2.0。同时用紫外分光光度法对 RNA 的纯度及浓度进行了测定,其 D₂₆₀/D₂₈₀ 的值接近 2.0。

2.2 mRNA 差异条带的显示

以随机引物 AP₁~AP₆ 与锚定引物 HT11C/A/G 配合,扩增 cDNA。6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,原 0 益于 X 线胶片上放射性自显影,可见数条差异条带 (图 1)。

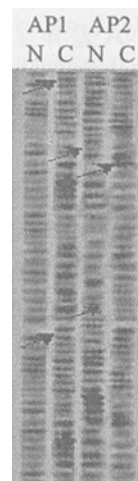


图 1 PCR 扩增产物电泳图
AP₁, AP₂: Different arbitrary primers; N: Normal colorectal mucosa; C: Colorectal carcinoma; The arrowheads indicate the differentially expressed band.

2.3 差异条带的第二次 PCR 扩增

取 2 条从图 1 中分离出来的差异条带作为模板,物均为 AP₂,且为大肠癌所特有的差异条带。再次进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳证实为一条带 (图 2)。

2.4 DNA 重组质粒的构建及鉴定

按方法 1.2.4 把第二次 PCR 扩增产物回收,同时把产物接入 TA 载体内,质粒转化 DH-5 α 细菌,通过蓝白斑初步筛选,挑选白色菌落,克隆后少量提

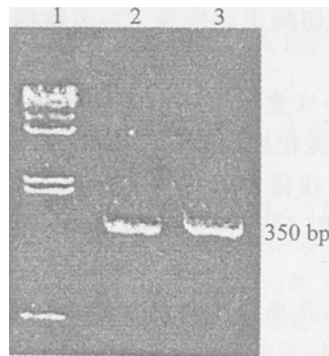


图 2 PCR 再次扩增产物电泳图
Lane1:PCRmarker; Lane2:N321; Lane3:N322

N321 序列 AGGTACCTTTGCTCAGGGTCTCAGGAATGTTGCCTTCTCACACTTCATGCACATGTTTATTTTTGTGACCTATGTTTGTAAAGATTAACAGCTAGTTTAAACAGAAACAATGGAAGCCAAGAGGTAGGAGGATAATATATTCAAAAAATGCAAA GGAAAAAAACTGTCAGCCACCAATTCCTTATCCAGCAATTAGTTTTCAAAAAATGAAGATAACACAAAGACTGACCCAGA GAAACAGAAATATTAGCTGAAGTTGTTGCTGGCAGACCTACCAAACAAAAAAGGTACCTT

N322 序列 AGGTACCTTTGCTCAGAGGGCTAAATCTTTGGCCAGGCTAGTCCAGAACTAGGCTGAGAGACCTGCAGAGAG CATGTGGGCTATTCTCCAGGGTGGGCCTACAGAGCCTAATGTGAGTACATTTCTCAAGAGAGCAAGCCACAGATGGCAC TTTATAGTGTGAATGCCACCTGTCCATGCTGACTGTTAGGCAAGGGGTCCTATCCTTCTGCAGAGTTAAATAAGATCACAAG ATTTGTTAGGTGAATAAAGAACTCCAGACACAAGATTAGTCCTCATCCTTAGGGCTGTTTCTTGTGAAAGTTGTCAGAATCA AAATGGAGTCACTAATCCAAAAAAGGTACCTT

2.6 差异序列的斑点杂交

将上述差异片段制备成地高辛标记的探针，与大肠癌及癌旁正常大肠粘膜组织所提取的 RNA 样品进行杂交。结果显示这 2 条大肠癌 cDNA 差异显示片段在大肠癌组织所提取的 RNA 中表达丰度均较高，而在正常肠粘膜组织所提取的 RNA 中的表达丰度较低。

3 讨论

分离新基因的方法较多，mRNA 差异显示方法被广泛采用并藉此发现了大量新基因。但 mRNA 差异显示方法有假阳性率较高的缺点。为克服这些缺点，研究人员往往采用无 DNA 污染的 RNA 样本和多次重复电泳的方法。本研究在逆转录前用 DNA 酶 I 对样本进行消化，对逆转录结果进行两次以上的 PCR 及电泳，严格回收在每次电泳中所显示的不同差异条带，再将回收的重扩增产物与首次 PCR 产物同时电泳并进行比较，以进一步证实扩增的特异性。

我们利用 mRNA 差异显示方法筛选出数条大肠癌差异表达产物的 cDNA 片段，并对其中的 2 条大肠癌差异 cDNA 片段进行了克隆、测序及序列分析。结果发现这 2 条大肠癌 cDNA 差异显示片段在 Genebank 中无同源序列，且它们在大肠癌组织所提取的 RNA 中表达丰度较高，而在正常肠粘膜组织所提取的 RNA 中表达的丰度较低。故初步推测该序列可能为大肠癌相关的基因。我们下一步的主要工作是

取质粒，通过限制性内切酶酶切质粒，电泳分析，鉴定了重组质粒中含有插入的目的片段。

2.5 差异显示条带的序列分析及比较

对上述 2 个差异显示片段进行了测序，并通过 BLAST 数据库进行了序列的同源性比较。结果显示这 2 个片段均为新基因片段，分别命名为 N321 与 N322。在数据库中查询未见同源序列。2 个差异显示片段的数据库查询部分结果如下：N321 与 HUAC002038 序列相比，core=291，value=5e-77；N322 与 HSAF002995 序列相比，core=72，value=9e-11。

N321 和 N322 的 cDNA 片段序列如下：

进行 Northern 杂交分析，测定全长的 mRNA 的长度。在组织切片的原位杂交分析其在结肠癌组织中的表达情况。通过 RACE 扩增的方法，获得全长的 cDNA。通过氨基酸序列推导预测它们的功能，并进行一系列的功能分析。

本研究表明，mRNA 差异显示技术可简便、快速地筛选出正常大肠粘膜与大肠癌之间的差异表达基因，是研究大肠癌分子生物学基础的较好方法。

参考文献：

Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, 257:967-71.

Zendman AJ, Cornelissen IM, Weidle UH, et al. TM7XN1, a novel human EGF-TM7-like cDNA, detected with mRNA differential display using human melanoma cell lines with different metastatic potential. *FEBS Lett*, 1999, 446(2-3):292-8.

Schroeder AA, Lawrence CE, Abrahamsen MS. Differential mRNA display cloning and characterization of a cryptosporidium parvum gene expressed during intracellular development. *J Parasitol*, 1999, 85(2):213-20.

Livesey FJ, Hunt SP. Differential display cloning of genes induced in regenerating neurons. *Methods*, 1998, 16(4):386-95.

Sompariyakul L, Jane S, Burn TC, et al. Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23:4738-9.

Wang X, Ruffolo RR Jr, Feuerstein GZ. mRNA differential display: application in the discovery of novel pharmacological targets. *Pharmacol Ther*, 1996, 71(2):179-91.

(责任编辑 段咏慧)