

一种限制性 cDNA 文库的构建

祝 骥^{1,2}, 马文丽², 李 凌², 姚汝华¹, 郑文岭³

(1. 华南理工大学生物工程系, 广州 510641; 2. 第一军医大学分子生物学研究所, 广州 510515;

3. 广州军区广州总医院分子肿瘤研究所, 广州 510010)

摘要:利用本室创建的限制性显示技术 RD-PCR, 建立的 cDNA 文库, 我们称之为限制性 cDNA 文库。该方法构建的文库因经过了限制性分組扩增, 每組均含有特定的 cDNA, 因而大大加快了随后克隆的分离和鉴定的速度。

关键词:限制性 cDNA 文库; K562 细胞; RD-PCR

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2002)02-0174-03

A Method for Construction of Restriction cDNA Library

ZHU Ji^{1,2}, MA Wen-li², LI Ling², YAO Ru-hua¹, ZHENG Wen-ling³

(1. Department of Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;

2. Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China;

3. Liu Hua Qiao Hospital, Medical Center, Guangzhou 510010, China)

Abstract: A kind of cDNA library constructed according to Restriction Display PCR(RD-PCR) technology setup in our lab, which was called restriction cDNA library, was introduced in this paper. In the construction of cDNA library, cDNA was digested with restriction endonuclease, linked with special adaptor, amplified with PCR in groups. Each group of the restriction cDNA library contained special cDNAs. The method greatly reduced the repetitive frequency and accelerated the speed of identification.

Key words: Restriction cDNA library; K562 cell; RD-PCR

构建 cDNA 文库已成为获得目的基因的最基本方法之一。常规的 cDNA 文库对于克隆已知序列的基因是很方便的, 但基因组学的研究中常常要对大量的已知或未知基因进行分析, 如基因表达研究中的基因芯片技术^[1,2], 分离 cDNA 片段成为研究工作中工作量最大的环节之一。一般 cDNA 文库限于菌落密度, 常常要处理多个平板, 这样重复的机会就大大增加, 造成人力、物力上的浪费。

限制性显示 PCR 也称 RD-PCR, 是为了克服 DD-PCR^[3] 假阳性而提出的一种新的基因差异显示技术。根据本室马文丽^[4] 创建的 RD-PCR 技术, 而建立的限制性 cDNA 文库, 称之为限制性 cDNA 文库。该方法由于对 cDNA 进行限制性分組扩增, 每组的 cDNA 片段均不相同, 因而既保证了平板上菌落适当的密度, 又能提供足够数量的菌落可供分析, 其重复的机会大大减少, 从而提高了分离 cDNA 片

段的速率。作者用此法构建了人红白血病 K562 细胞的限制性 cDNA 文库。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人红白血病 K562 细胞株由广州军区总医院分子肿瘤研究所提供。

1.2 所用试剂

小牛血清、RPMI-1640 培养基、全 RNA 纯化试剂 (Trizol) 来自 GIBCO/BRL; mRNA 纯化试剂盒、cDNA 合成试剂盒购自 Pharmacia; oligo(dT)₁₈、PCR 引物及衔接头由上海生工生物工程公司合成; 限制性内切核酸酶 *Sau* 3A I、T4 DNA 连接酶、pMD 18-T 载体、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP 混合物以及其他 PCR 相关的试剂等购自宝生物工程(大连)有限公司。

收稿日期: 2001-04-24; 修回日期: 2001-11-12

基金项目: 国家自然科学基金(398800320)资助

作者简介: 祝 骥(1967-), 男, 华南理工大学博士研究生, 专业方向: 生化与分子生物学. Tel: 020-85148210

1.3 细胞培养

人红白血病 K562 细胞培养于含 10% 小牛血清、100 μg/ml 链霉素、100 U/ml 青霉素的 RPMI-1640 培养基上,于 37℃、5% 二氧化碳条件下培养。

1.4 K562 细胞总 RNA 的提取

用 GIBCO-BRL 的总 RNA 提取试剂 Trizol 提取细胞总 RNA。将培养的 K562 细胞计数,收集细胞,800 r/min 离心 10 min,弃上清,每 1×10^7 个细胞加 1 ml Trizol,15℃ 温育 5 min 使细胞破裂。加 200 μl 氯仿,剧烈震荡 15 s 混匀,12000 r/min,4℃,离心 30 min。取上清到新管并加 500 μl 异丙醇混匀,15℃ 温育 10 min,12000 r/min,4℃,离心 30 min。弃上清,加 75% 的乙醇清洗,真空干燥 2~3 min,溶于 20 μl DEPC-H₂O 中,用 DU530 (BECKMAN) 紫外分光光度计进行定量后,-70℃ 保存备用。

1.5 mRNA 纯化及 cDNA 合成

mRNA 纯化及 cDNA 的合成分别按 Pharmacia mRNA Purification Kit 和 cDNA Synthesis Kit 说明书进行。将获得的 mRNA 用 DU530 紫外分光光度计进行定量。取 2~5 μg mRNA 65℃ 热变性 10 min 后置冰浴中冷却。在第一链反应混合液中加入 mRNA,混匀后于 37℃ 反应 1 h。加入第二链反应混合液中,16℃ 保温 2 h。反应结束后 65℃ 变性 10 min,酚-氯仿抽提 1 次,离心柱纯化。

1.6 K562 细胞限制性 cDNA 文库的构建

参照限制性显示 PCR 方法,构建 cDNA 文库(见图 1)。(1)用限制性内切酶对 cDNA 进行酶解。取 cDNA 2 μg 于 20 μl 去离子水中,加入 2.4 μl 10× 限制酶缓冲液,1.6 μl *Sau3A I*,37℃、反应 1~2 h,取 1~2 μl 反应液进行琼脂糖电泳,以检测酶解反应的进度。(2)在 cDNA 酶切片段两端连接通用接头。接头是经特别设计的,一端为含有 *Sau3A I* 酶切位点的黏性末端,组成接头的两个单链寡聚核糖核酸(DNA)片段序列分别为:SIP:5' pGATC CAC ACC AGC CAA ACC CA 及 SIR:5' GGT TTG GCT GGT GTG。将 100 μl 的 SIP(500 μg/ml)与 SIR(600 μg/ml)溶于 PBS 缓冲液中,加热至 90℃,5 min。之后,在 30 min 内,使其温度逐渐降低至室温,形成的接头经分装后,贮藏于-20℃ 备用。在内切酶反应管中加入形成的接头(SIP/SIR),5 μl 10× 连接酶缓冲液,30 μl 去离子水,1 μl 连接酶(5 单位),37℃ 反应 1 h。以 Pharmacia S-400 离心柱,除去小于 100 bp 的片段及接头二聚物后,作为 RD-PCR 反应的底物。(3)引物的设计与 PCR 反应。选择性引物的序列为:5' GTT TGG CTG GTG TGG ATC N,是根据接头及内切酶的序列设计的,在其 3' 端引入 1 个碱基 N(其中 N 为 A、T、C 或 G),分为 10 对引物,参考常规方法,于 Perkin-Elmer 2400 型 PCR 仪进行。反应参数为 95℃ 变性 5 min,(95℃ 30 s,65℃ 30 s,72℃ 1.5 min),36 个循环后,72℃ 延伸 5 min,最后 4℃ 保温。(4)重组 cDNA 的构建。将各分组 PCR 产物用 Qiagen PCR 产物纯化试剂盒进行纯化后,溶于 10 μl 去离子无菌水

中。用 DU530 紫外分光光度计定量,然后取 0.2 pmol cDNA 同 pMD 18-T vector 连接,16℃ 保温 2 h。转化大肠杆菌 JM109,涂平板,37℃ 培养过夜,形成分布均匀的菌落,即成为限制性 cDNA 分组文库。

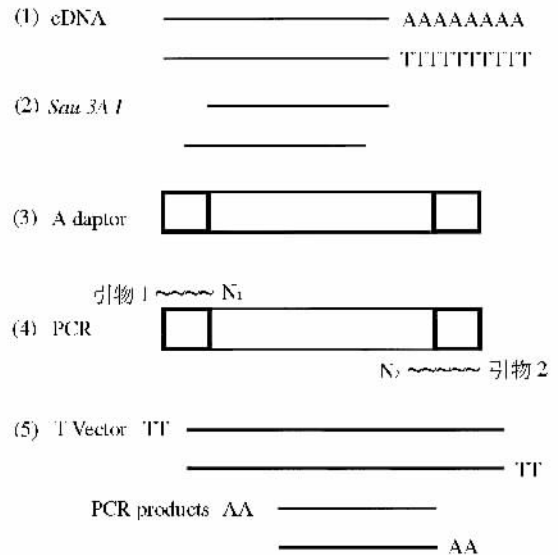


图 1 限制性 cDNA 文库构建图解

Fig. 1 Diagram of restriction cDNA library construction

1.7 cDNA 文库的初步鉴定

用牙签从不同分组的平板上各随机挑选 14 个 cDNA 阳性克隆,接种于含 0.5 ml LB 液体培养基及 100 mg/L 氨苄青霉素的 1.5 ml 离心管中,37℃ 培养过夜。过夜培养的菌液取 200 μl 作长期保存,余下的 300 μl 即可用于鉴定。具体鉴定方法如下:将离心管中剩余的 300 μl 菌液 10000 r/min 离心 1 min,除去上清液,根据菌体量加入 30~50 μl 的去离子水。用振荡器重新悬浮菌体,将离心管置于 72 孔离心管盒中,在沸水中裂解 10 min。之后,10000 r/min 离心 2 min,沉淀菌体。其上清液即可用作 PCR 鉴定的模板,一般 20 μl PCR 反应体积加裂解上清液 1 μl 即可。用通用引物进行 PCR 扩增,反应条件为 95℃ 变性 5 min,(95℃,30 s,65℃,30 s,72℃,1 min),38 个循环后,72℃ 延伸 5 min,最后,4℃ 保温。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测,有单一扩增条带的即为阳性克隆。对 PCR 鉴定为阳性的克隆,则用 ABI 310 测序仪(PE 公司)进行核酸序列测定。

2 结果与讨论

2.1 RNA 的提取

文库构建中的第一步 RNA 的提取非常关键,质量不好,则建库的质量不高。导致 RNA 质量不高的原因主要有两个:一是总 RNA 有降解,其甲醛变性电泳中 28S 与 18S 条带模糊,有弥散状,5S 条带呈现高浓度,二是低丰度 RNA

的丢失,则使其代表性显著降低。

在 mRNA 分离纯化时,oligo(dT)纤维素有一定的饱和度,当加入总 RNA 量或前期处理细胞数太大,则 mRNA 量会超出纤维素的结合能力。由于结合为竞争性的,这样高丰度的 mRNA 将结合大部分 oligo(dT)纤维素,导致低丰度 mRNA 的丢失。因此,操作过程中,要注意总 RNA 的量,应先估算一下;若用试剂盒从细胞开始提取,则要控制细胞数量。

本研究中,K562 细胞是悬浮培养细胞,使用 Trizol 试剂一步法,可得到高质量总 RNA, 1×10^7 个细胞大约可得 $100 \mu\text{g}$ 左右的总 RNA, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.998$, 取 $2 \sim 5 \mu\text{g}$ 总 RNA 进行琼脂糖甲醛变性胶电泳,可以清楚显示 28S 和 18S 的 RNA,表明无明显降解。取约 $60 \mu\text{g}$ 的总 RNA 经 oligo(dT)纤维素柱纯化得 mRNA。将 mRNA 反转录后的 cDNA 经碱性琼脂糖凝胶电泳,可见 200bp 以上弥散的 cDNA 带,且多数处于 $1 \sim 2\text{kb}$ 之间,表明双链 cDNA 合成正常。

2.2 限制性分组 cDNA 片段文库的构建与鉴定

在本方法的 cDNA 文库构建中,对合成的 cDNA 使用识别四碱基的限制性内切核酸酶处理,获得大量的约 $200 \sim 700\text{bp}$ (极少数例外)的 cDNA 片段,然后在 cDNA 片段两端加上通用接头,根据限制性显示方法(类似差异显示中的分组方法),通过通用引物延伸若干碱基,进行分组归类扩增,扩增产物经纯化同载体连接,转化,即为 cDNA 限制性片段文库,由于分组后,每组 PCR 产物中只有相应的克隆,分别涂布不同的平板,这样平板间克隆的重复率是相当低的(取

决于 PCR 分组引物的严谨性),这为后面克隆的鉴定、分离提供了方便,减少单一平板菌落量大,重复概率高,操作不便等缺点。

从平板上随机挑选的克隆进行 PCR 鉴定,部分 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳鉴定结果见图 2。进一步的测序结果表明该方法构建 cDNA 文库的质量是很高,各组间极少重复,低丰度的 cDNA 也能得到有效克隆,还克隆到一些新的 EST,已在 Genebank 登录。本研究主要是为制作 cDNA 表达谱芯片而制作的,相对一般的全长 cDNA 文库而言,由于前者采用了四碱基限制酶处理,使得分离回收的片段大多集中在 $200 \sim 700\text{bp}$ 之间(见图 2),其杂交动力学条件趋于一致,因而较易控制;而在后者,cDNA 的大小相差悬殊,从 100bp 左右到几个 kb 均有,增加芯片杂交检测的难度。

由于分组归类的原因,对于某些已知基因,可根据通用引物延伸后的归类碱基,来确定该基因所在的分组,这既可能加快克隆的速度,还可以验证分组反应的可靠性。从目前已分离的一些已知或未知基因,经测序结果分析,认为该研究进行的分组方法是可行的。

加了接头的 cDNA 片段经分组 PCR 后勿须酶切即可直接与 T 载体连接,简单快捷,阳性克隆高达 95% 以上。该方法根据通用接头设计的通用引物为克隆的鉴定、制作芯片所需的 cDNA 片段的大量扩增提供了方便。目前已用该方法分离到几千条 cDNA 片段,并制做了人红白血病 K562 细胞的基因表达谱芯片(另文报道)。

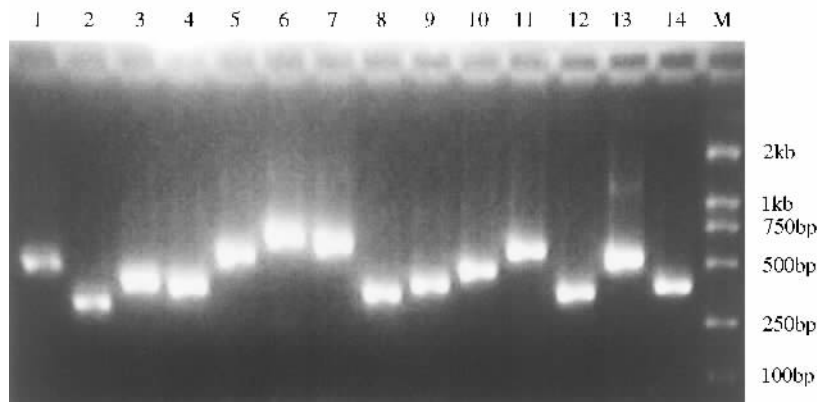


图 2 cDNA 阳性克隆 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of cDNA positive clone by PCR

M: molecular weight marker; 1~14: PCR products

参考文献(References)

[1] 祝 骥,马文丽,姚汝华. DNA 芯片技术与基因表达研究[J]. 生命科学研究,2000,4(2):106~111.
[2] Schena M, Schalon D, Davis R W, *et al.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. Science, 1995, 270(20): 467~470.

[3] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. Science, 1992, 257(5072): 967~971.
[4] 马文丽,郑文岭, JAMES F B, 等. 限制性显示(RD-PCR): 一种新的差异显示技术[A]. 见: 全军生物化学与分子生物学研究进展[C]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998, 113~114.