

微量 RNA 的 cDNA PCR 文库的构建

李晶泉, 袁晓东, 汤敏谦

(宝生物工程(大连)有限公司, 大连 116600)

摘要 使用 PCR (polymerase chain reaction) 技术, 调制了 mRNA 的 cDNA PCR 文库。实验证明, cDNA PCR 文库能使原 cDNA 的量放大数百倍。同时, 使用人体 K562 培养细胞的总 RNA 对 cDNA PCR 文库法和反转录中的 β -Actin 的 cDNA 量进行了比较。cDNA PCR 文库法中的 β -Actin 的 cDNA 量大大高于反转录中的 β -Actin 的 cDNA 量。使用 75pg 的人体 K562 培养细胞的总 RNA, 调制成 50 μ l 的 cDNA PCR 文库, 使用 1 μ l 的 cDNA PCR 文库进行 PCR 反应时, 可对文库中的 β -Actin 的 cDNA 进行 PCR 检测。因此, cDNA PCR 文库显示了良好的信息放大性能。

关键词 PCR; cDNA PCR 文库; 反转录反应

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0253-977X(2001)02-0147-04

The Construction of cDNA PCR Library from a Small Amount of RNA

LI Jing-quan, YUAN Xiao-dong, TANG Min-qian

(TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd., Dalian 116600, China)

Abstract By the method of PCR (Polymerase Chain Reaction), we have constructed the cDNA PCR library from mRNA. The cDNA PCR library can amplify the original cDNA up to hundreds of times. With the total RNA of human K562 cultured cell, the cDNA of β -Actin has been obtained by the methods of cDNA PCR library and reverse transcription respectively. As contrast, the amount of β -Actin's cDNA from the cDNA PCR library is much higher than from reverse transcription. 75pg total RNA of human K562 Cultured cell is employed to construct 50 μ l cDNA PCR library, and the cDNA of β -Actin can even be detected by using 1 μ l of the library as template to perform the PCR. Therefore cDNA PCR library can greatly enlarge the amount of information.

Key words PCR; cDNA PCR library; reverse transcription

近年来, DNA 的研究十分广泛, 而遗传基因的表达又主要是通过 mRNA 来实现的。在对具体基因进行研究时, 反转录 PCR (RT-PCR) 法^[1~4]是常用的实验方法, 特别对检测低丰度的 mRNA 时比较有效。但是, 由于生物体内有很多活性物质的 mRNA 含量极少, 采用常规的手法不可能对其进行检测、分离等, 给我们的科研工作带来了极大的麻烦。

本研究使用 PCR 技术^[5~7], 可在实验室条件下扩增生物体中 mRNA 的 cDNA 量, 其 PCR 检测的灵敏度远远大于反转录 PCR (RT-PCR) 法。微量 RNA 的 cDNA PCR 文库的构建可为有关微量活性物质遗传基因的研究提供方便。

1 实验材料

1.1 工具酶及分子生物学试剂

cDNA Synthesis Kit, TaKaRa Ex Taq, cDNA PCR Library Kit, TaKaRa RNA PCR Ki (AMV) Ver. 2.1 均为 TaKaRa 公司生产、销售的产品。

1.2 本实验中使用的引物 (Primer) 弹夹衔接子 (Cassette Adaptor) 的 DNA 序列 (图 1)

2 实验方法

2.1 原理

本实验的原理如图 2 所示。首先, 使用寡聚 dT-RA 引物进行反转录反应, 然后再合成具有平端的双链 cDNA。把 CA Cassette Adaptor 与双链 cDNA 连接。此时的 CA Cassette Adaptor 的短链 3' 末端被氨基标记, 不能向下延伸。而 CA 引物的序列设计成为 CA Cassette Adaptor 长链上的单链部分的

收稿日期: 2000-06-03; 修回日期: 2000-10-18

作者简介: 李晶泉 (1964-), 女, 辽宁省大连市人, 学士学位, 专业方向: 生物学。电话: 0411-7619944。

一部分,在对和 CA Cassette Adaptor 连接以后的 cDNA 进行 PCR 扩增时,只用 CA 引物是不能进行扩增反应的,必须先由 RA 引物开始进行延伸反应,此时的 CA 引物能和由 RA 引物的延伸产物相结合,所以使用 CA 引物和 RA 引物可以进行 PCR 扩增反应。结果扩增了全长的 poly(A) RNA,从而制作成了 cDNA PCR 文库。

2.2 cDNA 第一条链的合成

本操作使用了 cDNA Synthesis Kit 按标准实验程序进行了操作。在微量离心管中 加入 1 ~ 4μl 总 RNA 溶液,然后加入 2μl 的 5 × 第一链合成缓冲液、1μl 的 dNTP 混合物、1μl 的 RNase 抑制剂、1μl 的 Oligo dT-RA Primer(cDNA PCR Library Kit 中的组份)以及 1μl 的 RAV-2 Reverse Transcriptase 后,用 DEPC 处理 H₂O 定容至 10μl,轻微混匀后,以 30℃ 10 分钟,42℃ 1 小时,80℃ 5 分钟的条件进行反应,反应完毕后把反应管置于冰中 2 分钟。

2.3 cDNA 第二条链的合成以及 DNA 末端的平滑化

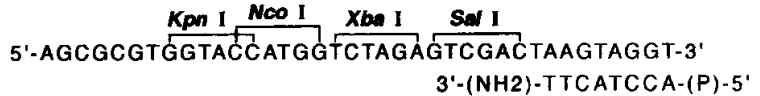
本操作同样使用了 cDNA Synthesis Kit。在上述的 1st Strand cDNA 合成的反应管中,加入 10μl 的 5 × 2nd Strand Synthesis Buffer 后,用 DEPC 处理 H₂O 定容至 40.5μl,然后再在上述溶液中加入 6.5μl 的 *E. coli* RNase H/*E. coli* DNA Ligase Mixture 后,以 12℃ 1 小时,22℃ 1 小时,70℃ 10 分钟的条件进行反应,反应完毕后再加入 2μl 的 T4 DNA Polymerase I 轻微混匀后在 37℃ 的条件下保温 10 分钟,然后加入 4μl 的 Stop Solution (cDNA PCR Library Kit 中的组份) 停止反应。

为了纯化合成的 2nd Strand cDNA,对反应停止后的反应液用苯酚/氯仿处理一次,然后再用氯仿处理一次后进行异丙醇沉淀,最后用 5μl 灭菌水溶解保存。

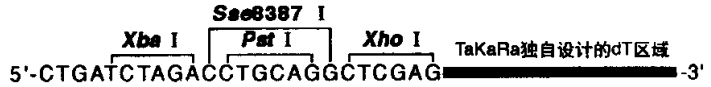
2.4 Cassette Adaptor 的连接

本操作使用了 cDNA PCR Library Kit。在上述纯化好的末端平滑的 2nd Strand cDNA 溶液(5μl)中加入 2μl 的 CA Cassette

CA Cassette Adaptor



Oligo dT-RA Primer



RA Primer



CA Primer



图 1 本实验使用的引物、弹夹衔接子的 DNA 序列

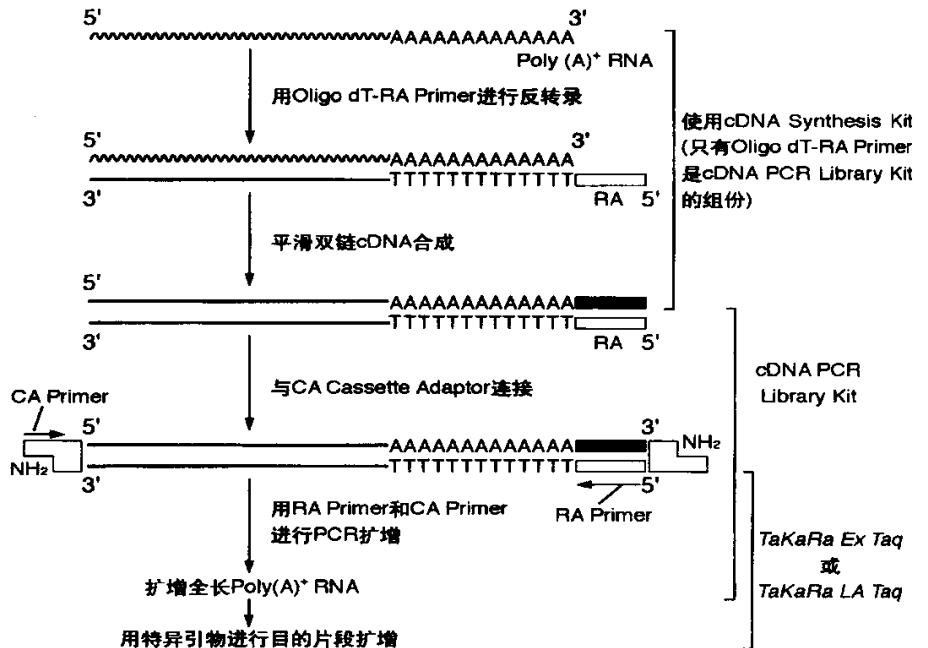


图 2 cDNA PCR 文库构建原理图

Adaptor 以及 6μl 的 Ligation Solution II 后均匀混和,然后加入 12μl 的 Ligation Solution I,在 16℃ 的条件下反应 30 分钟,反应完毕后将反应液进行异丙醇沉淀,沉淀干燥后用 30μl 的灭菌水溶解保存。

2.5 PCR 扩增

PCR 扩增使用了 TaKaRa Ex Taq 酶。在 PCR 扩增时,为了尽量减少 PCR 扩增过程中的错配,应尽量使用高保真(错配率低)且扩增效率高的 PCR 用 DNA 聚合酶,我们一般推荐使用 TaKaRa Ex Taq 酶或 TaKaRa LA Taq 酶。在上述 30μl 的 cDNA 和 Adaptor 的连接液中,加入 5μl 的 10 × Ex Taq Buffer, 4μl 的 dNTP Mixture, 0.5μl 的 RA Primer, 0.5μl 的 CA

Primer 以及 $0.25\mu\text{l}$ 的 TaKaRa Ex Taq 酶后,用灭菌水定容至 $50\mu\text{l}$ 进行 PCR 反应。PCR 反应条件为 (1) 94°C 预变性 1 分钟 (2) 94°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C 3 分钟进行 35 个循环扩增 (3) 72°C 延长 5 分钟。上述 PCR 反应液即为 cDNA PCR Library 溶液,放置于 -20°C 保存(尽量减少冻、融操作过程),供实验使用。

3 结果

3.1 cDNA PCR Library 量的检测

为了测定 cDNA PCR Library 的 cDNA 的放大量,以人体 K562 培养细胞的总 RNA $2\mu\text{g}$ 为起始材料,按照前述的实验方法,调制了 cDNA PCR Library。经测定 cDNA PCR Library 的 $\text{OD}_{260\text{nm}}$ 的量,确认最后的 cDNA PCR Library 的量为 $10\mu\text{g}$,其一部分进行 Agarose 电泳的结果见图 3。结果显示分布良好的电泳条带。

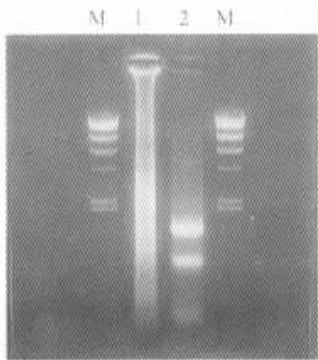


图 3 cDNA PCR Library 的电泳图

M λ -Hind III DNA Marker; 1 $8\mu\text{g}$ 的 cDNA PCR Library; 2 $2\mu\text{g}$ 的全 RNA。

3.2 cDNA PCR Library 法和反转录反应法的效率比较

为了比较 cDNA PCR Library 和反转录反应之间的效率,以人体 K562 培养细胞的总 RNA (5 种量: 1000ng 、 187.5ng 、 37.5ng 、 7.5ng 、 1.5ng) 为起始材料,按照前述的实验方法,各调制了 $50\mu\text{l}$ 的 cDNA PCR Library。同时使用与调制 cDNA PCR Library 等量的总 RNA,进行反转录反应,方法如下。在进行反转录反应时,使用了 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1。在微量离心管中,加入 $5\mu\text{l}$ 的 $10\times$ RNA PCR Buffer、 $10\mu\text{l}$ 的 Mg-Cl_2 、 $5\mu\text{l}$ 的 dNTP Mixture、 $2.5\mu\text{l}$ 的 AMV Reverse Transcriptase、 $1.25\mu\text{l}$ 的 RNase Inhibitor、 $2.5\mu\text{l}$ 的 Oligo dT-Adaptor Primer 和 $21.25\mu\text{l}$ 的 RNase Free H_2O ,均匀混合后加入 $2.5\mu\text{l}$ 的总 RNA (反应体系为 $50\mu\text{l}$) 然后按以下条件进行反应: 55°C 30 分钟, 99°C 5 分钟, 5°C 5 分钟。对上述二种反应液各取 $1\mu\text{l}$ 进行 PCR 反应,扩增 cDNA PCR Library 和反转录反应液中的 β -Actin 基因,方法如下。

在 PCR 反应管中加入 $5\mu\text{l}$ 的 $10\times$ TaKaRa Ex Taq Buffer、 $4\mu\text{l}$ 的 dNTP Mixture、 $1\mu\text{l}$ 的 β -Actin Primer (上游引物和下游引物的混合物)、 $0.25\mu\text{l}$ 的 TaKaRa Ex Taq 酶、 $38.75\mu\text{l}$ 的灭菌水以及 $1\mu\text{l}$ 的 cDNA PCR Library (或 $1\mu\text{l}$ 的反转录反应液),按以下条件进行 PCR 反应: 94°C 30 秒钟, 55°C 30 秒钟, 72°C 30 秒钟,进行 35 个循环反应。然后各取 $8\mu\text{l}$ 进行 Agarose 电泳,结果见图 4。

用 cDNA PCR Library 进行 PCR 扩增时,都显示出了 β -Actin 基因的清晰条带,而用反转录反应液进行 PCR 扩增时,起始材料的总 RNA 为 1000ng 、 187.5ng 、 37.5ng 时能显示 β -Actin 基因的清晰条带,而起始材料为 7.5ng 、 1.5ng 时,无 β -Actin 基因的 PCR 扩增带。因此, cDNA PCR Library 法与反转录反应法相比效果较好。

3.3 cDNA PCR Library 的效率研讨

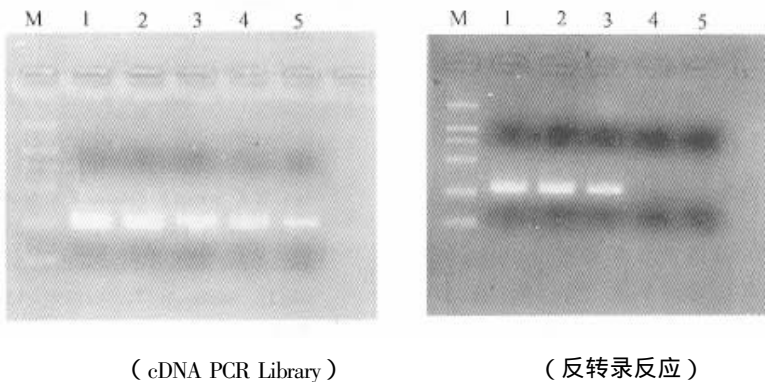


图 4 cDNA PCR Library 法和反转录反应法的效率比较图

M: DL2000 DNA Marker; 1: K562 总 RNA 1000ng ; 2: K562 总 RNA 187.5ng ; 3: K562 总 RNA 37.5ng ; 4: K562 总 RNA 7.5ng ; 5: K562 总 RNA 1.5ng 。

注: 上述的总 RNA 量为起始的总 RNA 量。

为了进一步论证 cDNA PCR Library 的效率,以人体 K562 培养细胞的总 RNA (6 种量: 7.5ng、1.5ng、300pg、75pg、15pg、3pg) 为起始材料,按照前述的实验方法,各调制了 50 μ l 的 cDNA PCR Library。然后根据 3.2 的 PCR 反应条件,扩增 cDNA PCR Library 中的 β -Actin 基因、 β 2 Micro-globulin (β 2 m) 基因、Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) 基因的一

部分。各取 8 μ l 的 PCR 反应液进行 Agarose 电泳。结果见图 5。

图 5 所示,对以 75pg 以上的总 RNA 为起始材料调制成的 cDNA PCR Library,用前述的方法进行 PCR 扩增,可以扩增 β -Actin、 β 2m、HPRT 等三种基因的 DNA 片段。而 β 2m 基因在起始的总 RNA 为 15pg、3pg 时,也能扩增出 DNA 片段。可以说,用前述方法调制成的 cDNA PCR Library 有极高的效率。

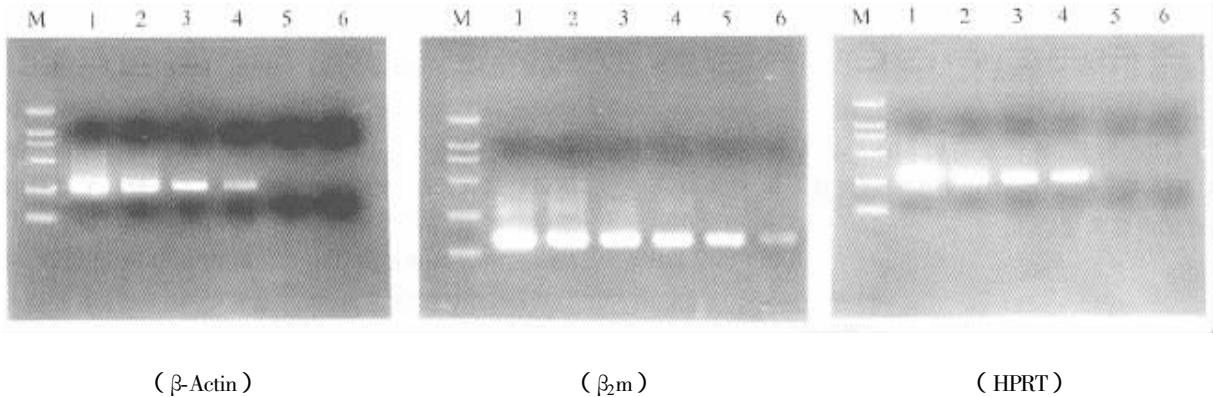


图 5 cDNA PCR Library 的扩增效率图

M: DL2000 DNA Marker; 1: K562 总 RNA 7.5ng; 2: K562 总 RNA 1.5ng; 3: K562 总 RNA 300pg;
4: K562 总 RNA 75pg; 5: K562 总 RNA 15pg; 6: K562 总 RNA 3pg。

注: 上述的总 RNA 量为起始的总 RNA 量。

4 讨 论

本研究的目的是利用 PCR 技术,放大生物体内的遗传基因信息。实验结果 3.1 显示,用 2 μ g 的总 RNA 可以调制 10 μ g 的 cDNA PCR Library。通常,全 RNA 中的 mRNA 的含量为 1% ~ 5%^[8]。也就是说,用 0.02 ~ 0.1 μ g 的 mRNA 可以调制 10 μ g 的 cDNA PCR Library,把遗传信息放大了 100 倍以上。

反转录 PCR (RT-PCR) 法是常用的调制目的基因 DNA 的方法。本研究论述了 RT-PCR 法和 cDNA PCR Library 法的 PCR 扩增灵敏度 (见实验结果 3.2)。实验结果显示,使用反转录 PCR 反应时,以 7.5ng 的总 RNA 为起始材料扩增 β -Actin 时,电泳结果没有显示 PCR 的扩增产物,使用 37.5ng 的总 RNA 时才有明显的 PCR 扩增产物;而在使用 cDNA PCR Library 进行 β -Actin 基因 PCR 扩增时,以 75pg 的总 RNA 为起始材料时仍可扩增出 PCR 产物 (见实验结果 3.3)。因此,使用 cDNA PCR Library 的扩增效果是 RT-PCR 的扩增效果的 100 倍以上。实验结果 3.3 同时显示,以 3pg 的总 RNA 为起始材料,扩增 β 2m 基因时仍能显示良好的 PCR 扩增效果。

所有的实验结果都表明,cDNA PCR Library 显示了极高的灵敏度,对调制微量 mRNA 的 cDNA 显示极佳效果,同时为科研人员克隆微量物质的遗传基因提供了新的途径。

参考文献 (References):

- [1] Frohman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 3998 ~ 9002.
- [2] Noonan K E, Romison I B. mRNA phenotyping by enzymatic amplification of randomly primed cDNA [J]. Nucl Acids Res, 1988, 16: 10366.
- [3] Desmetre P. Diagnosis and prevention of equine infectious disease: present status, potential and challenges for the future [J]. Adv Vet Med, 1999, 41: 359 ~ 377.
- [4] Dombovari Z, Molnar B, Boesi J, et al. Biologic detection methods in the comparison of circulating tumor cells and micrometastases [J]. Orv Heti, 1998, 139(30): 1793 ~ 1797.
- [5] Saiki R K, Scharf S, Faloona F A, Mullis K B, Horn G T, Erlich H A, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia [J]. Science, 1985, 230: 1350 ~ 1354.
- [6] Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al. Specific enzymatic amplification of CAN in vitro: the polymerase chain reaction [J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986, 51: 263 ~ 273.
- [7] Mullis K B, Faloona F A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction [J]. Methods Enzymol, 1987, 155: 335 ~ 350.
- [8] Alberts B, et al. (3rd ed). Molecular Biology of the Cell [M]. New York: Garland Publishing, Inc., 1994.