

用两步 PCR 法克隆全长 cDNA^{*}

苏彦辉 徐云剑 顾雪松 刘天昀 朱玉贤^{**}

(北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 采用两步 PCR 法成功地克隆了一个全长的 cDNA。首先, 用差式分析法克隆得到差别表达的 cDNA 片段, 再分别用这些片段内部的特异序列及 cDNA 两端不同接头的序列为引物进行第一步 PCR 扩增, 得到差别 cDNA 片段的上游和下游序列。然后, 根据第一步 PCR 扩增得到的上游和下游序列设计基因特异的引物进行第二步 PCR, 从而得到全长的 cDNA。

关键词 全长 cDNA, 差别表达产物, 克隆, PCR

中图分类号 Q 78

Cloning Full Length cDNA Representing Difference Products without Screening the Library^{*}

SU Yan-hui, XU Yun-jian, GU Xue-song, LIU Tian-yun, ZHU Yu-xian^{**}

(National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract Cloning of a full length cDNA representing a difference product was accomplished by the use of a two-step polymerase chain reaction (PCR). Amplification of sequences up and down stream of the difference product was achieved via both the internal primers and the different adapter sequences attached to each end of the cDNA. Amplification of a full-length cDNA was then achieved by using gene-specific primers obtained from the first-step PCR.

Key words Full length cDNA, Differential expressed product, Cloning, PCR

近年来, 世界各地的实验室相继创立和发展了多种实验技术以鉴定和分离特异表达的基因^[1-5]。从减法杂交、核 DNA (cDNA) 减法到差示显示 PCR (DD RT-PCR), 再到 cDNA 差式分析法 (RDA), 我们清楚地看到它们在简化步骤、缩短时间和降低假阳性等方面都有明显的改进。然而, 进步并不是全方位的。对于实验中所得到的每一个阳性 cDNA 片段, 一般仍须通过繁琐而费时的 cDNA 文库筛选过程才可获得全长的 cDNA 克隆^[6-9]。在此, 我们报道一个不通过文库筛选而获得全长 cDNA 克隆的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料: 豌豆 (*Pisum sativum* L.) G2 遗传系播种于加拿大 Conviron 公司生产的人工气候室, 平均光强 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 分别在长日照 (每日光照 14 h, 顶芽组织在开花后迅速衰老) 和短

日照 (每日光照 8 h, 顶芽组织持续生长而不衰老) 下生长。取长、短日照下开花前数天的豆株顶端生长区 (包括第 1 节间的茎和叶), 制备总 RNA。

1.1.2 酶和生化试剂: 各种限制性内切酶、*Tth* DNA 聚合酶、Poly (A T) tract 试剂盒购自 Promega 公司, RNA 纯化试剂盒购自 Qiagen 公司, cDNA 合成试剂盒购自 Stratagene 公司。其它化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 及 mRNA 的分离纯化: 用 Qiagen 公司的 RNA 纯化试剂盒分别提取在短日照和长日照条件下生长的 G2 豌豆的总 RNA, 用 Promega 公

* 国家自然科学基金杰出青年科学基金 (39725002) 和洛克菲勒生物技术基金的资助

** 联系人 Tel: (010) 62754096; Fax: (010) 62754427

E-mail: zhuyx@lsc.pku.edu.cn

苏彦辉, 女, 1971 年 11 月生, 硕士, 讲师

收稿日期: 2000-01-27, 修回日期: 2000-03-30

司的 Poly(A T) tract 试剂盒分离 Poly(A⁺) RNA, 直接用于合成 cDNA 第 1 链。

1.2.2 双链 cDNA 的合成: 用 Stratagene 的 cDNA 合成试剂盒分别合成第 1 链和第 2 链 cDNA。为保证 cDNA 的完整性, 在反应中同时加入 O ligo (dT) 和 6 碱基随机引物。

1.2.3 cDNA 的酶切、与接头引物的连接、及 Driver 和 Tester DNA 的制备: 具体方法参考文献[5]。所合成的双链 cDNA 用 *Dpn* II 限制酶切割以缩短每个 cDNA 代表群的平均长度。以短日照 G2 豌豆的 cDNA 为 Tester, 长日照 G2 豌豆 cDNA 为 Driver 进行代表群差式分析并获得差别表达的 cDNA 片段。

1.2.4 新 cDNA 的合成: 在合成 Tester 与 Driver 的同时, 以短日照 G2 豌豆中提取的 mRNA 为模

板, 用经修饰的 O ligo (dT) 为引物进行新的 cDNA 合成。将双链 cDNA 的末端补平后连接上一套新的接头序列, 并且 *Xho* I 单酶切切除 3 端的接头序列 (因为经修饰的 O ligo (dT) 引物中含有 *Xho* I 位点, 而 cDNA 内部的酶切位点已被甲基化), 从而使 cDNA 链两末端具有不同的接头。

1.2.5 Northern 杂交、引物设计及 PCR 扩增: Northern 杂交具体方法见文献[10]。根据设计基因内部引物 1、2、3、4、5、6。PCR 扩增为两步反应: 95 变性 1 min, 72 复性和延伸 3 min。反应开始时 95 预变性 5 min, 反应结束时 72 延伸 10 min。PCR 反应体积 50 μ l, 共进行 25 个热循环反应。取 5 μ l 走 1% 琼脂糖凝胶电泳。所有 PCR 均采用高保真性的 *Tth* DNA 聚合酶进行模板扩增。

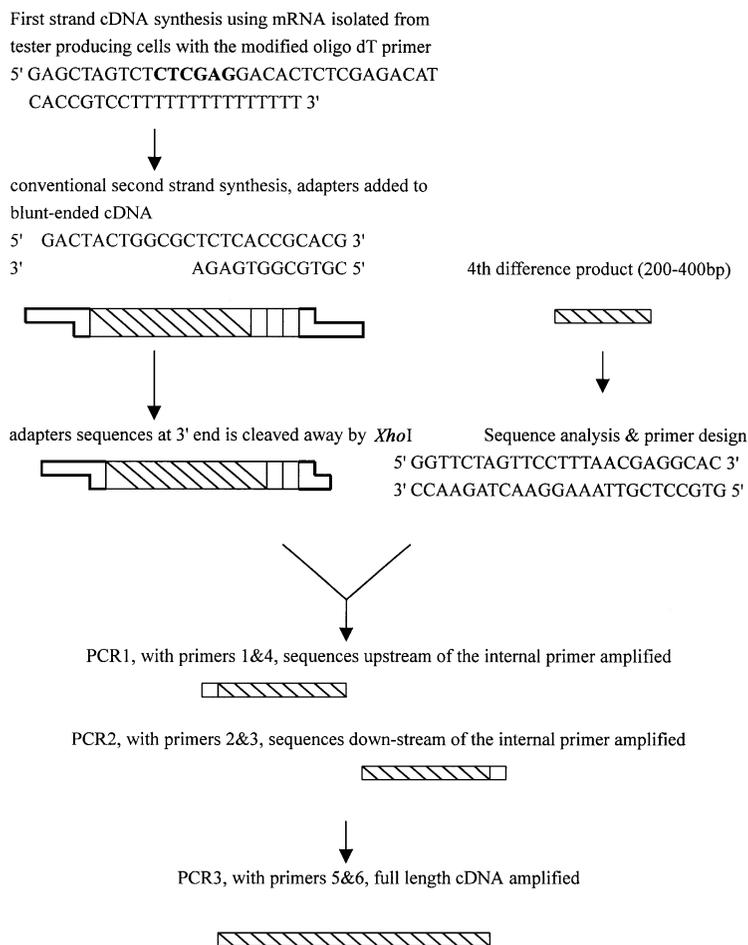


Fig 1 Schematic diagram of cDNA walking

2 结 果

用 Northern 杂交证实所克隆 cDNA 片段的短日特异性之后, 进行序列分析(数据未显示)并设计基因内部引物. 新合成 cDNA 5' 接头区序列作为引物 1, 经修饰的 Oligo (dT) 引物中多聚 poly (T) 上游 32 bp 序列将被用作引物 2. 以序列 5' GGTTC-TA GTTCCTTTAACGA GGCAC3 (即全长 cDNA 中的 448- 472 位核苷酸) 作为引物 3, 与作为反义引物的引物 2 配对进行 PCR 扩增——PCR 2 (Fig 1; Fig 2 泳道 3). 用与引物 3 互补的核苷酸序列作为引物 4, 与引物 1 配对进行 PCR 扩增——PCR 1 (Fig 1; Fig 2 泳道 2). 最后, 以序列 5' A-CAAAAATGGCGGCCGTTACTTCCTC3 (引物 5, 来自 PCR 1 产物的 5' 末端) 作为正义引物, 以序列 5' TTTGAAACGGCAACTTTCCTCA TCG3 (引物 6, 是 PCR 2 产物 3' 末端的互补序列) 作为反义引物, 进行扩增反应 (PCR 3), 获得全长 cDNA (Fig 2 泳道 4). 因为在实验过程中引物 3 和引物 4 的确切方向并不清楚, 所以在 PCR 1 和 2 的同时, 用引物 3 与引物 1, 引物 4 与引物 2 分别配对进行 PCR 扩增反应 (Fig 2 泳道 5, 6). 这组 PCR 没有产物, 说明 PCR 1 和 2 方向正确.

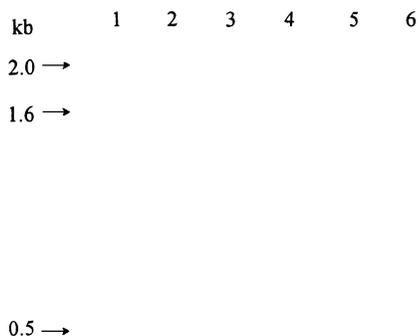


Fig 2 PCR amplifications of different parts of a cDNA with various primers

1. Molecular marker; 2. Templates were amplified using primers 1 and 4; 3. Templates were amplified using primers 2 and 3; 4. Templates were amplified using primers 5 and 6 (showing the full length cDNA); 5. Primers 1 and 3 were combined in the reaction; 6. Primers 2 and 4 were combined in the reaction. No amplification was observed in the last two lanes.

序列分析表明, PCR 1 和 PCR 2 产物与 PCR 3 的产物在相应区段有 99.8% 的同源性, 从而表明所

有的 PCR 反应都是成功的(数据未显示). 全序列分析表明 PCR 3 的 cDNA 产物全长为 2 036 bp, 内含 7~ 1 749 的开放阅读框 (EMBL 号为 Y17796). 第一个 ATG 密码子周围的核苷酸序列, AAAAA TG-GC, 与植物翻译起始所需的保守序列 AACAA TG-GC^[11] 相似. 3' 端非翻译序列包含一个推断的多聚核苷酸化信号, AA TAAA, 位于 poly (A) 尾巴上游第 7 个核苷酸处. 该 cDNA 编码一个含 581 氨基酸, 分子量约为 64 kD 的蛋白质. 肽链中含有特征性叶绿体转移信号, 它的前 59 个氨基酸富含 Ala 和 Ser, 不含有带负电荷的氨基酸残基如 Asp 和 Glu^[12]. 与基因库 DNA 序列比较发现, 该 cDNA 与拟南芥乙酰羟酸还原异构酶 (X68150) 具有 78% 的同源性.

3 讨 论

本文报道了改进的分离差别表达基因的方法. 我们的修饰保持了 cDNA RDA 方法中减法杂交的富集效应, 避免了其它方法中的错误起始问题. 应用该方法可以在较短的时间内, 用相对少量的起始材料进行基因表达特性的研究. 然而, 它不是任何一个现存方法的重复, 因为 cDNA RDA 和 DD RT-PCR 都依赖于筛库来获得全长的克隆^[4,5,9]. 我们认为, 通过 cDNA 两端的接头序列扩增 cDNA RDA 和 DD RT-PCR 差别产物的上游和下游未知序列, 可大大缩短获取全长 cDNA 克隆的时间, 是常规 cDNA RDA 法的重要进步. 象所有现存的方法一样, 此方法除了上述优点之外, 亦有一定的局限性, 既全长 cDNA 的获得取决于模板 cDNA 合成时的完整性.

参考文献 (References)

1. Wieland I, Bolger G, A souline G, Wigler M. A method for difference cloning: Gene amplification following subtractive hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 2720~ 2724
2. Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, **257**: 967~ 971
3. Bauer D, Muller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P, Strauss M. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DD RT-PCR). *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**: 4272~ 4280
4. Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science*, 1993, **259**: 946~ 951
5. Hubank M, Schatz D G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**: 5640~ 5648

- 6 Geng M, Wallrapp C, Muller P F, Frohme M, Hoheisel J D, Gress T M. Isolation of differentially expressed genes by combining representational difference analysis (RDA) and cDNA library arrays *BioTechniques*, 1998, **25**: 434~ 438
- 7 Zhu Y X, Zhang Y F, Luo J C, Davies, P J, Ho D T H. PPF-1, a post-floral-specific gene expressed in short-day grown G2 pea, may be important for its never-senescing phenotype *Genet*, 1998, **208**: 1~ 6
- 8 Li H Y, Guo Z, Zhu Y X. Molecular cloning and analysis of a pea cDNA that is expressed in darkness and very rapidly induced by gibberellic acid *Mol Gen Genet*, 1998, **259**: 393~ 397
- 9 Verkozy L K, Bernstein N L. Isolation of genes negatively or positively coexpressed with human recombination activating gene1 (RAG1) by differential display PCR (DD RT-PCR). *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**: 4497~ 4507
- 10 朱玉贤, 张翼凤, 李慧英. 用差式分析法克隆受 GA 抑制的豌豆基因. 中国科学, C 辑 (Zhu Yuxian, Zhang Yifeng and Li Huiying Molecular cloning of GA suppressed G2 pea genes by cDNA RDA. *Science in China, Series C*), 1997, **27**: 253~ 257
- 11 Lutcke H A, Chow K C, Mickel F S, Moss K A, Kern H F, Scheele G A. Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals *EMBO J*. 1987, **6**: 43~ 48
- 12 Heinje G, Steppuhn J, Hermann R. Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides *Eur J Biochem*, 1989, **180**: 535~ 545

运动员使用违禁药品 EPO 检测方法新突破

尽管国际奥委会在十年前就已宣布禁用促红细胞生成素(EPO),但由于缺乏可靠的检测手段,在运动员中服用 EPO 仍屡禁不止.1998 年环法自行车大赛上批露出最大的服用违禁药品丑闻,一批运动员被查出使用了该品.法国国家反兴奋剂实验室 Françoise Lasne 等人采用化学发光为指示剂的免疫印迹方法检测尿样中的重组 EPO,并对这批运动员的 102 份冻存尿样进行了进一步分析.分析证明,这种检测近期服用 EPO 的方法可能也适用于长期服用 EPO 运动员的竞赛现场药检,应该将其定为竞赛外药检的主要方法.

检测运动员是否服用 EPO 的策略是区别外源性重组 EPO 与内源性 EPO.基于两者结构上的微小异质性,内、外源性 EPO 以不同的异构体形式存在.异构体所带电荷不同,可被等点聚焦电泳分离. Françoise 等人的实验显示重组 EPO 的 α β 两种构象极为相似(其等电点均在 4.42~ 5.11 之间),只是 β 构象有一条附加的碱性条带;而从尿中纯化的内源性 EPO 由于翻译后的糖基化修饰等而显示较多的酸性条带,等电点在 3.92~ 4.42 之间.根据采用化学发光为指示剂的免疫印迹差异可判定尿中提取的 EPO 究竟属内源性还是外源性.在他们采用该法获得的尿 EPO 图象中,对照受试者样品大约有 10 条等电点在 3.37~ 4.70 之间的条带,这与纯化的尿中内源性 EPO 图象一致.可是,经重组 EPO 治疗的患者样品中出现更多的碱性条带.任何注入了重组 EPO 的受试者的尿样电泳模式均会出现明显变化,外源性 EPO 的存在十分明显.

陈彦 根据 *Nature* (2000, **405**: 635) 编写,贾弘提 审