

用一个简单快速的 RT-PCR 技术筛选 白细胞介素-6 作用相关基因*

黄耀江¹⁾ 黎燕²⁾ 施明²⁾ 王建安²⁾ 胡美茹²⁾ 沈倍奋²⁾**

(¹⁾大连理工大学生化工程研究所, 大连 116017; ²⁾北京基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 为了研究白细胞介素-6 (IL-6) 作用相关基因以及一些可能受 IL-6 调控的基因, 利用一个简单快速的以 PCR 为基础的方, 检测了 IL-6 处理和未处理的 Sko007 细胞中基因表达的差异, 克隆并鉴定了差异表达基因的 cDNA 片段。首先用 6-mer 寡核苷酸引物进行反转录从而最大限度地得 mRNA 编码区序列生成 cDNA; 然后用 2 或 3 个较长的随机引物进行 PCR 扩增, 并以不同引物组合重复 PCR 扩增; 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳分离, 回收差异片段并直接用于克隆、测序及进一步分析。在此研究中, 获得了 3 个表达序列标签 (EST), 其中一个为新的基因片段, 反向 RNA 杂交有力证实了它们与 IL-6 作用的相关性。进一步的生物信息学分析表明, 新基因片段 STRF17 在多种组织中表达。

关键词 白细胞介素-6, 差异表达基因, 骨髓瘤细胞

学科分类号 Q939

细胞因子作用于受体的一个重要结果是诱导基因表达, 白细胞介素-6 (IL-6) 是一种多功能的细胞因子, 在机体免疫、造血、神经、内分泌等系统中均发挥重要作用^[1], 而其作用机理和信号传导并不完全清楚。近年来关于 IL-6 诱导基因表达的报道较多^[2,3], 但目前我们的认识仍然很有限。为了进一步研究 IL-6 作用于靶细胞时, 参与其信号转导过程的相关基因以及一些可能受 IL-6 调控的基因。我们应用一个简单快速的差异显示技术 (AP-PCR)^[4], 分离并鉴定了与 IL-6 作用相关的差异表达基因。

1 材料及方法

1.1 细胞、菌株及试剂

Sko007 细胞、JM 109 菌株由我们实验室保存。Taq 酶、DNA 连接酶、限制性内切酶购自 NEB 公司。引物由本室合成: 三条 6-mer 反转录引物 5'-NTTTAT-3'、5'-NACACT-3' 和 5'-NACCAG-3' (N 表示 GATC 四种碱基之简并); PCR 随机引物如下:

AP1 5'-AAGCTTGATTGCC-3'
AP2 5'-AAGCTTCGACTGT-3'
AP3 5'-AAGCTTTGGTCAG-3'
AP4 5'-AAGCTTCTCAACG-3'
AP5 5'-AAGCTTAGTAGGC-3'

AP6 5'-AAGCTTGCACCAT-3'
AP7 5'-AAGCTTAACGAGG-3'
AP8 5'-AAGCTTTTACCGC-3'
AP9 5'-CAAGCGAGGT-3'
AP10 5'-GTGGAAGCGT-3'
AP11 5'-GGAAGCAGCT-3'
AP12 5'-TTCACGGACG-3'
AP13 5'-GAGCTATGGC-3'
AP14 5'-AGCCTGTGTC-3'
AP15 5'-CTGGTCACAG-3'
AP16 5'-CACAGTGAGC-3'

1.2 细胞培养、IL-6 诱导及 mRNA 的制备

Sko007 细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 中培养, 一组用 100 ng/ml IL-6 处理, 另一组设为对照, 分别培养 8 h。收集细胞, 按商家说明用 Oligotex (G1AGEN) 提取 mRNA 并用 DNase I 消化。

1.3 差异分析

首先进行反转录, 40 μl 反转录体系包括 520 ng 的 mRNA、100 ng 完全变性的三个 6-mer 寡

* 国家杰出青年科学基金 (39925019) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 010-66931327, E-mail: shenbf@mx.cei.gov.cn

收稿日期: 2000-10-10, 接受日期: 2000-11-03

核苷酸引物、400 U SuperScript II 酶 (GIBCO) 及其他成分, 20℃ 15 min 后 42℃ 50 min, RNase H 消化. 然后进行 PCR 扩增, 40 µl 反应体系包括 1.2 µl 的来源于第一步的 cDNA 溶液 (约 16 ng)、2 U Taq 酶、各 80 pmol 的两个或三个引物及其他成分; 95℃ 5 min 变性, 先执行 5 个循环 (94.5℃ 1 min, 34℃ 1 min, 72℃ 1 min), 之后执行 30 个循环 (94.5℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min), 72℃ 10 min. PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 差异片段切胶并通过 Nucleotrap Kit (CLONTECH) 回收.

1.4 克隆、测序及序列分析

回收的 PCR 产物克隆到 T 载体中, 转化后通过 *EcoR* I 酶切鉴定, 阳性质粒测序. 序列使用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的 BLASTN、BLASTX 程序搜索 NR、SWISSPROT 和 DBEST 库, 进行序列分析.

1.5 反向 RNA 分析

根据文献 [5], a. 点膜: 各取 50 ng 差异表达基因的 PCR 回收产物, 变性后点样到尼龙膜上. b. 探针制备: 40 µl 体系包含 1 µg mRNA、60 ng 的随机引物、 18.8×10^5 Bq [α^{32} P] dCTP、加 400 U Superscript II 酶及其他成分, 42℃ 20 min 后, 补加 dCTP 至 0.5 µmol/L, 继续反应 40 min. c. 杂交及显影.

1.6 电子表达谱和染色体定位分析

用 Tigem 服务器的电子原位杂交服务器 (<http://gcg.tigem.it/INSITU/insitublast.html>) 分析新基因片段的组织/细胞表达谱. 用 Unigene 数据库进行新基因片段电子基因定位: 选择与待分析序列同源性最高的表达序列标签 (EST) 序列, 用其相应的 UniGene 编号搜索 UniGene Homo sapiens 得到明确的放射性杂交 (Radiation Hybrid, RH) 定位信息.

2 结 果

2.1 PCR 产物的分析

用两个或三个不同 10 或 13nt 的引物进行 PCR 扩增, 扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶上产生了 13~29 条清晰的带, 大小为 100~2 500 bp, 其产量很高且足以直接进行克隆. 从电泳图谱可见一些条带只在 IL-6 处理过的 Sko007 细胞中出现, 或者正相反 (图 1), 说明这些条带是 IL-6 诱导的特异条带, 它们是 IL-6 作用相关的基因片段. 还有一些条带在 IL-6 处理及未处理的 Sko007 细胞中的丰度明显有差别. 以不同的引物组合进行 PCR 获得了大量的清晰而离散的 DNA 条带, 同时也检测出 4 条差异条带 (STRF14~STRF17). 没有反转录酶存在时进行 RT-PCR 则没有条带产生, 说明不存在染色体 DNA 的污染.

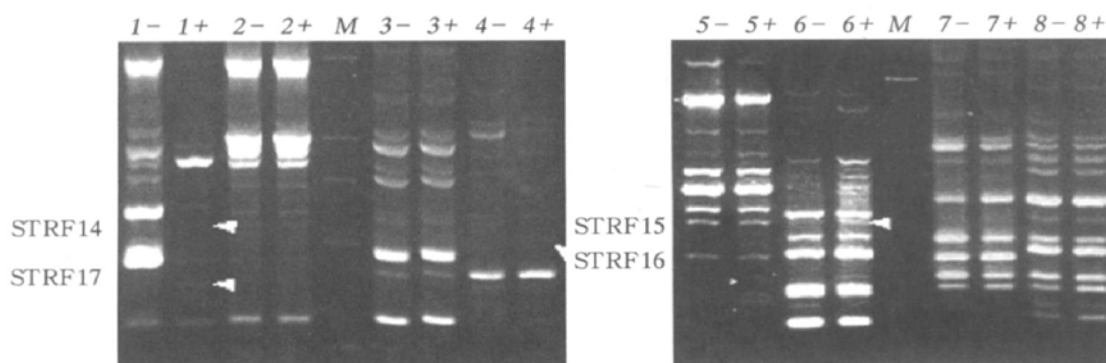


Fig. 1 2% Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products

“-”: RT-PCR products obtained from IL-6 uninduced Sko007 cells; “+”: RT-PCR products obtained from IL-6 induced Sko007 cells. 1 (±): primers AP7 and AP8; 2 (±): primers AP1 and AP4; 3 (±): primers AP2 and AP9; 4 (±): primers AP5, AP8 and AP16; 5 (±): primers AP3 and AP10; 6 (±): primers AP6 and AP11; 7 (±): primers AP12 and AP15; 8 (±): primers AP5, AP13 and AP14; M: DL2000 DNA marker. Arrows indicate differential expressed fragment.

2.2 克隆、测序及序列同源性分析

分别切下 4 条差异条带并回收、克隆和转化, 阳性克隆进行 *EcoR* I 酶切鉴定 (图 2), 结果显示阳性克隆已成功插入了 4 条差异片段.

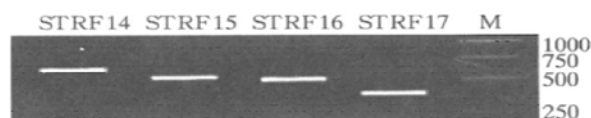


Fig. 2 *EcoR* I digestion of 4 plasmids recovered after cloning of IL-6 related cDNA fragments

阳性质粒以 T7 引物进行测序, 序列提交 GenBank 进行相似性分析. 其中 STRF14、STRF15 和 STRF16 个序列与已知基因或 EST 有

高度的同源性, STRF17 与公共数据库中的已知序列同源性很低, 表明它是新的基因片段 (表 1), 其 GenBank 登录号为: BE644248.

Table 1 Result of the cloning, sequencing and bioinformatics analysis

Seq No.	Length/ bp	Homology analysis	Primers
STRF14	586	Human Hypothetical protein	AP7, 8
STRF15	536	Human puromycin sensitive aminopeptidase	AP5, 13, 14
STRF16	417	Human NADH-Ubiquinone oxidoreductase	AP5, 8, 16
STRF17	403	22~ 249 bp: 26% homology with Yeast Factor induced gene 2; 174~ 314 bp: 37% homology with human Endoglin precursor (CD105 antigen)	AP7, 8

2.3 特异 mRNA 的反向 RNA 印迹鉴定

我们利用反向 RNA 印迹去证实差异表达基因与 IL-6 作用的相关性. 比较杂交图谱可以发现 STRF14、STRF15 和 STRF17 出现在 IL-6 诱导的细胞中而不存在于 IL-6 未诱导的细胞中 (图 3). 杂交结果有力地说明 3 个 EST 是 IL-6 相关的差异表达基因, 这一结果与 2% 琼脂糖凝胶结果完全一致. 另一个候选差异表达基因片段 STRF16 未检测到任何杂交信号.

2.4 STRF17 的组织表达谱和染色体定位分析

生物信息学分析显示: STRF17 在多种组织中有表达, 新基因片段定位于 9 号染色体 (表 2).

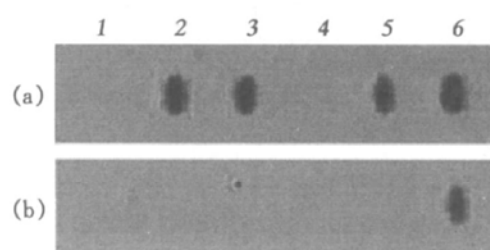


Fig. 3 Reverse Northern blot hybridization using IL-6 related fragments from different expressed mRNA in IL-6 present and absent Sko007 cells as templates (a) total RNA of Sko007 cells induced by IL-6 as probes; (b) total RNA of Sko007 cells uninduced by IL-6 as probes; 1: negative control; 2~5: STRF14, STRF15, STRF16, STRF17; 6: GAPDH control.

Table 2 Expression information and RH mapping results

Expression information	RH Mapping Results
STRF17 cDNA sources: blood, brain, colon, esophagus, foreskin, Germ cell, heart, kidney, ovary, pancreas, parathyroid, prostate, spleen, stomach, testis, tonsil, Whole embryo, breast, breast_ normal, head_ neck, ovary, placenta, thymus, pooled, uterus	GB4 Map: Chr. 9 Top of interval: D9S287 (103.3 cm) Bottom of interval: D9S176 (104.9 cm)

3 讨论

Liang 等^[6]设计的 mRNA 差异显示技术, 从理论上讲可以系统地分离样品之间所有差异表达的基因, 被广泛应用于发育基因和疾病相关基因的克隆^[7,8]. 但该技术存在一定缺陷^[9,10]: a. 操作步骤多, 假阳性率高; b. 所得的 cDNA 太短 (100~500 bp), 绝大部分是 mRNA 3' 末端非翻译区 (对于预言功能及进一步分析大多为无用信息); c. 用同位素标记, 使得实验周期长、成本高、存在放射性污染, 且不好回收差异片段; d. 只能显示高丰度 mRNA 之间的差异. 基于上述原因, Sokolov 等^[4]建立了更加简单快速的 AP-PCR (arbitrarily

primed PCR) 方法, 克服了传统差异显示的缺陷. 它有几个明显的优点: a. 使用仅 6nt 的引物进行反转录, 从而所合成的 cDNA 绝大多数来源于 mRNA 的编码区, 而不象其他方案那样多来源于 3' 末端非编码区. 保证了所得产物的多样性和代表性. b. PCR 扩增中用 10~13 nt 随机引物进行 PCR 扩增, 生成 15~29 条 DNA 带; 很容易用琼脂糖凝胶检测和分离, 不存在放射性污染. c. 差异条带的产量高, 足以用于进一步的分析, 而不必重扩增 (减少了假阳性). 同时, 所得 DNA 片段可长达 2500 bp, 而非象其他方案那样小于 500 bp. d. 简单快速, 从开始到获得差异的 cDNA 仅需要 6 h. 此法也适用于不含 Poly (A) 尾的原核生物

差异表达显示.

我们对 Sokolov 的方法进行了改进, a. 以 DNase I 消化过的 mRNA 进行 RT-PCR, 防止内源性的 DNA 污染; 尽量无菌操作以防止外源 DNA 污染. b. PCR 过程先在低严谨条件下 (退火温度为 34℃) 执行 5 个循环保证多态性, 之后在高严谨条件下 (退火温度为 50℃) 执行 30 个循环以提高特异性和产量.

我们使用这个改进的 AP-PCR 技术, 在 Sko007 细胞中鉴定和分离了 4 个与 IL-6 作用相关的差异表达基因片段. 随后的反向 RNA 印迹证实了 STRF14、STRF15 和 STRF17 这三个 EST 与 IL-6 诱导的相关性, 说明它们所代表的基因可能编码与 IL-6 作用相关的蛋白质因子; STRF16 (CoI) 没有任何杂交信号产生, 可能是由于其表达丰度太低, 也可能是无关的假阳性的序列. 生物信息学分析表明, STRF15 是已知基因 (氨基肽酶) 的片段, 它在维持细胞正常功能方面有重要的作用, 提示 IL-6 对骨髓瘤细胞有重要的调控作用; STRF17 是新的 EST 序列, 它与酵母的 FACTOR INDUCED GENE 2 和人的 CD105 有部分的同源性, 两者在细胞间和细胞内信号传导中有重要作用, 提示 STRF17 可能在信号传导过程中发挥作用, 是与 IL-6 信号传导相关的新基因序列. 电子原位杂交表明 STRF17 在血液、生殖器官、免疫器官等多种组织和细胞中表达, 说明其在多种组织和细胞中发挥作用. 这些 IL-6 相关基因的分离将有助于进一步阐明 IL-6 的信号转导机制及其与某些

免疫疾病的相关性.

参 考 文 献

- 1 Kishimoto T, Akira S, Taga T. Interleukin 6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science*, 1992, **258** (5082): 593~ 597
- 2 Zhong Z, Wen Z, Darnell J E, *et al.* Stat3: A STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*, 1994, **264** (5155): 95~ 98
- 3 Matsuda T, Fukada T, Takahashi T, Tezuka M, *et al.* Activation of Fes tyrosine kinase by gp130, an interleukin-6 family cytokine signal transducer, and their association. *J Biol Chem*, 1995, **270** (19): 11037~ 11039
- 4 Sokolov B P, Prockop D J. A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22** (9): 4009~ 4015
- 5 Zhang H, Zhang R, Liang P. Differential screening of gene expression difference enriched by differential display. *Nucleic Acids Res*, 1996, **219** (3): 824~ 828
- 6 Liang P, Pardee A B. Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, **257** (5072): 967~ 971
- 7 Rosenblum N D, Yager T D. Changing patterns of gene expression in developing mouse kidney, as probed by differential mRNA display combined with cDNA library screening. *Kidney Int*, 1997, **51** (3): 920~ 925
- 8 Gong T W, Hegeman A D, Shin J J, *et al.* Novel genes expressed in the chick otocyst during development: identification using differential display of RNA. *Int J Dev Neurosci*, 1997, **15** (4~ 5): 585~ 594
- 9 Jurecic R, Nachtman R G, Colicos S M, *et al.* Identification and cloning of differentially expressed genes by long-distance differential display. *Anal Biochem*, 1998, **259** (2): 235~ 244
- 10 苟德明, 李文鑫, 蒋达和, 等. 用改进的 DDRT-PCR 技术进行人胚差异基因筛选. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27** (2): 205~ 209
- Gou D M, Li W X, Jiang D H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27** (2): 205~ 209

Isolation of Genes Related with IL-6 Effect by a Rapid and Simple RT-PCR Method*

HUANG Yao-Jiang¹⁾, LI Yan²⁾, SHI Ming²⁾,
WANG Jian-An²⁾, Hu Mei-Ru²⁾, SHEN Bei-Fen²⁾**

(¹⁾ Institute of Biochemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116017, China;

²⁾ Beijing Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract The significant results are gene expression when cytokine acts on receptors. To study genes related with IL-6 effect, here a simple and rapid PCR-based protocol is utilized to detect and isolate cDNA fragments of the differential expressed genes between the IL-6 treated and untreated Sko007 cells. To generate cDNAs from most internal regions of mRNAs by the reverse transcription using three fully degenerated 6 mer oligonucleotide as primers. And then PCR amplification of the cDNAs with two or three longer primers that are arbitrary but defined sequences is carried on, The PCR amplification was repeated on the same cDNA templates (first step)

with different sets of primers. PCR products were electrophoresed in the 2% agarose gel and then the recovered different fragments were used directly in cloning and sequencing. 3 different ESTs were obtained, one of which is a novel gene fragment, and its were proved to be IL-6 related genes by reverse Northern blot analysis. Further bioinformatics analysis indicated that new STRF17 fragments are expressed in many tissues and cells.

Key words IL-6, differential expressed gene, Sko007 cell

* This work was supported by a grant from National Excellent Young Science Foundation of China (39925019).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66931327, E-mail: shenbf@mx.cei.gov.cn

Received: October 10, 2000 Accepted: November 3, 2000

适应性突变中的 DNA 重组事件

张汉波

(云南大学生物系, 昆明 650091)

适应性突变 (adaptive mutation) 或定向突变 (directed mutation) 最先是指大肠杆菌 (*Escherichia coli*) lac^- 突变细胞在以乳糖为唯一碳源的培养基上, 随选择时间延长 lac^+ 回复子数量不断增加的现象. 由于当时认为 lac^+ 回复子仅在乳糖存在的情况下才发生, 且没有发现其他同选择无关的突变, 因此猜测细菌具有针对选择环境定向地发生有利突变的能力. 后来的研究表明, 在乳糖选择条件下, 回复突变细胞除产生 lac^+ 突变外, 还产生与乳糖利用无关的突变, 因此, 突变并不是定向的, 现又叫静止期突变.

这种突变产生的机制同细胞在分离过程中产生自发突变的机制有本质的区别, 就目前采用的研究体系所得出的结果表明, 主要为前者的产生必须依赖于 RecBCD 重组途径的基因产物, 所需的重组蛋白酶和重组机制如下: 在饥饿胁迫下, 细胞内通过多种机制产生 DNA 双链断裂 (DNA double-strand breaks, DSBs). 由 RecBCD 酶识别

DSBs, 解旋和消化 DNA, 产生单链 DNA 尾. RecA 使用 ssDNA 尾, 通过链入侵, 形成 D-loop, 并以此单链为引物, 由 DNA 聚合酶 III 复制 DNA. 由于细胞的 MMR 系统 (methyl-directed mismatch repair system) 蛋白质活性暂时不足, 在单碱基重复处的碱基配对错误导致了 DNA 突变.

研究适应性突变的 DNA 重组机制对理解生物的适应、进化具有非常重要的意义, 因为通过这种 DNA 重组来产生突变的机制在生物界可能相当普遍, 而不是一个特别的例子. 主要表现在: a. 很多生物都具有 RecBCD 酶的同源物; b. DSBs 的产生是相当普遍的, 特别在细胞营养缺乏时; c. 在自然状态下, 生物往往处于长期的非分裂或非生长状态, 如土壤中的微生物, 高等动植物的某些组织细胞等. 更重要的是, 适应性突变的产生机制表明了 DNA 重组也可能是癌细胞突变的原因, 因为癌细胞往往是非分裂或非生长的细胞去抑制生长, 即癌变的原因很可能同适应性突变产生的原因相同.