

利用 PCR 技术构建体外高效转录系统*

黄仪秀 张 磊 朱圣庚

(北京大学生物学系, 北京 100871)

提 要

设计并合成了一对 PCR 反应引物, 其 5' 端引物除含有目的基因 5' 端序列外, 还外加 T7 RNA 聚合酶启动子的 17 个核苷酸. 3' 端引物则按常规设计. 以染色体 DNA 为模板, 通过 PCR, 可扩增出带有 T7 RNA 聚合酶启动子的目的基因 DNA 片段. 以此 PCR 产物为模板, 在体外成功实现了高效转录. 这是一种快速、简便构建体外高效转录系统的好方法.

关键词 PCR 技术, 体外转录, 高效转录系统

为了研究 RNA 的结构和功能, 需要进行体外转录以获得特定 RNA 的纯制品. 80 年代初, 由于先后发现了噬菌体 SP6, T7 及 T3 RNA 聚合酶的强启动子, 才使体外高效转录成为可能. 人们将目的基因插入到已带有 SP6 或 T7 RNA 聚合酶启动子的质粒中, 然后将此重组质粒导入到大肠杆菌细胞, 经筛选和鉴定等分子克隆操作, 最后才提取此重组质粒, 以进行体外转录^[1]. 本研究对构建体外高效转录系统的方法作了重要改进, 不经分子克隆, 直接利用 PCR 技术扩增出体外高效转录系统, 用以制备 4.5S 前体 RNA (pre-4.5S RNA) 和高比活 RNA 探针, 均获得理想结果. 所用 PCR 5' 端引物除含目的基因 5' 端序列外, 外加 T7 RNA 聚合酶启动子的 17 个核苷酸, 3' 端引物按常规设计, 即与 RNA 3' 端序列反向互补. 以染色体 DNA 为模板, 通过 PCR 可扩增出携带 T7 RNA 聚合酶启动子的目的基因. 当以此 PCR 产物为模板, 用 T7 RNA 聚合酶可在体外成功实现高效转录. 从而免除基因重组和分子克隆等一系列繁琐操作.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 *E. coli* JM101, 本实验室保藏菌.

1.1.2 仪器 DNA 合成仪 (381A 型) 购自美国 Applied Biosystems 公司. PCR 仪购自华美生物工程公司.

1.1.3 主要生化试剂 耐热 Taq DNA 聚合酶购自华美生物工程公司. T7 RNA 聚合酶及体外转录试剂盒购自美国 Promega 公司.

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 *E. coli* JM101 在 LB 培养基中 37℃ 培养 18—24h.

1.2.2 细菌 DNA 的提取和制备 按 kavenoff 等的方法^[2].

1.2.3 DNA 聚合酶链式反应 (PCR)
PCR 所用引物为:

5' 端引物 T7-GCGTTGGTTCTCAACGC-TCTC

3' 端引物 GGGTGGGGGCCCTGCCAGCT
前缀 T7 表示 T7 RNA 聚合酶启动子 TAAT-ACGACTCACTATA. PCR 反应总体积为 100μl, 其中包括 10μl 10 × PCR 缓冲液 (500mmol/L KCl, 100mmol/L Tris-HCl pH9, 15mmol/L MgCl₂, 0.1% 明胶, 1% Triton X-100), 2μl dNTP (各 10mmol/L), 4μl 细菌染色体 DNA (2—3μg), 3' 端和 5' 端引物各 4μl

*国家自然科学基金资助课题.

收稿日期: 1992-09-22 修回日期: 1992-11-09

(60pmol), 76 μ l 重蒸无离子水. 95 $^{\circ}$ C 加热 10min, 再加 0.5 μ l Taq DNA 聚合酶 (5U/ μ l) 及 100 μ l 无菌石蜡油, 然后将样品管置于 PCR 仪中进行反应. 变性 93 $^{\circ}$ C 45s, 退火 50 $^{\circ}$ C 1min, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1min, 共进行 35 个循环, 最后一次延伸 72 $^{\circ}$ C 10min. 反应结束后, 用等体积氯仿抽提以除去石蜡油, 然后加入 1/10 体积 3mol/L 醋酸钠和 2 倍体积冷乙醇沉淀 DNA. 为了除去 PCR 反应物中可能污染的 RNA 酶, 可在 DNA 沉淀中加入 2 μ l 10 $\times$ 蛋白酶 K 缓冲液 (500mmol/L NaCl, 50mmol/L EDTA pH8.0, 100mmol/L Tris pH8.0), 1 μ l 蛋白酶 K (20 mg/ml), 2 μ l 5% SDS, 15 μ l 无离子水. 37 $^{\circ}$ C 保温 1h. 反应结束后, 用等体积酚/氯仿 (1:1) 和氯仿/异戊醇 (24:1) 各抽提一次. 然后加入 1/10 体积 3mol/L 醋酸钠及 2 倍体积冷乙醇, 再次沉淀 DNA. 经此处理的 DNA 样品即可作为体外转录的 DNA 模板.

1.2.4 体外转录反应^[1,3] 在一个 Eppendorf 管中分别加入 4 μ l 5 $\times$ 转录缓冲液 (200mmol/L Tris·Cl pH7.5, 30mmol/L Mg-Cl₂, 10mmol/L 亚精胺, 25mmol/L NaCl), 2 μ l 100mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT), 4 μ l 各 2.5mmol/L NTP 混合物, 0.5 μ l RNasin (40U/ μ l), 2 μ l 牛血清清蛋白 (BSA) (1 μ g/ml), 2 μ l 模板 DNA (约 0.5 μ g), 2 μ l T7 RNA 聚合酶 (15U/ μ l), 3.5 μ l 用焦碳酸二乙酯处理过的无离子水, 总反应体积为 20 μ l. 37 $^{\circ}$ C 保温 2h. 为了除去反应后转录系统中的模板 DNA, 可加入 2 μ l 无 RNA 酶的 DNA 酶 (1U/ μ l), 37 $^{\circ}$ C 保温 15min. 然后用等体积酚/氯仿 (1:1), 氯仿/异戊醇 (24:1) 各提取一次, 加入 1/10 体积 3mol/L 醋酸钠及 2 倍半体积冷乙醇沉淀 RNA. 用 10 μ l 焦碳酸二乙酯处理过的无离子水溶解 RNA. 进行 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 用溴乙锭 (EB) 染色, 并在紫外灯检测仪下观察并照相.

2 结 果

2.1 PCR 扩增产物的鉴定

取 10 μ l *E. coli* JM101 DNA 的 PCR 产物, 进行 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 经 EB 染色后, 在紫外灯下可以看到一条明显的条带. *E. coli* 4.5S 前体 RNA 的基因长 138bp^[4], 加上 T7 RNA 聚合酶启动子 17bp 共长 155bp. 根据 PCR 产物与 DNA 分子量标准参照物 (pGEM7Zf(+)/Hae III) 的电泳迁移率相比较, 计算其分子大小与预期大小一致 (见图 1). 实验结果证明, 用我们设计的引物经 PCR 可扩增出含有 T7 RNA 聚合酶启动子的 4.5S 前体 RNA 基因. 用此 PCR 扩增产物即可作为 *E. coli* 4.5S 前体 RNA 体外转录的模板.

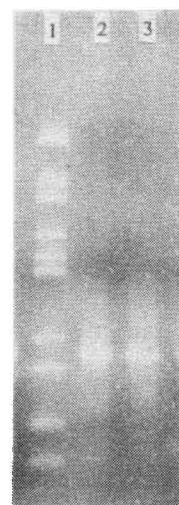


图 1 *E. coli* 4.5S 前体 RNA 基因 PCR 扩增产物的 PAGE 图

1. DNA 分子量标准参照物 (pGEM 7Zf (+) / HaeIII)
- 2, 3. *E. coli* 4.5S 前体 RNA 基因 PCR 扩增产物 (155bp)

2.2 体外转录

按方法部分所述操作进行体外转录. 然后进行 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 从图 2 可清楚看到, 通过体外转录反应, 我们成功获得 *E. coli* 4.5S 前体 RNA, 每 μ g 模板 DNA 约可产生 6—10 μ g RNA.

3 讨 论

通常按分子克隆的方法构建体外高效转录

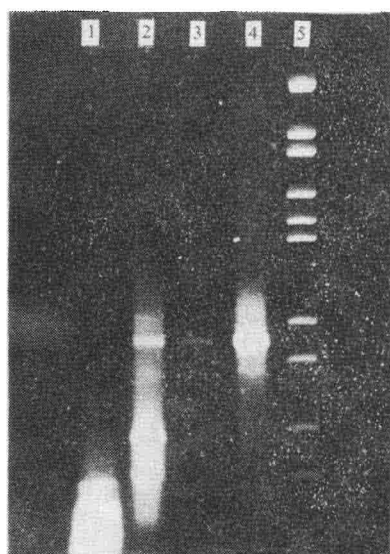


图2 *E. coli* 4.5S 前体 RNA 基因体外转录产物的 PAGE 图

1. RNA 分子量参照物 tRNA 和 5S rRNA (共 50 μ g)
2. *E. coli* 4.5S 前体 RNA 基因转录产物
3. 对照 (在转录系统中不加 NTP 混合物)
4. 转录反应的模板 DNA (上述 PCR 扩增产物)
5. DNA 分子量参照物 pGEM7Zf (+) /HaeIII

系统,需将目的基因插入到带有高效转录启动子的载体中,由于限制性内切酶往往不能恰好切割目的基因的两端,其转录产物的 5'端和 3'端会带上附加额外序列.而采用本法则可以消除这一弊端,对研究 RNA 结构与功能尤为重要.此外,在操作过程中避免了重组载体的酶切等步骤,在转录产物的产量和质量上也得到了改进.从我们的实验结果来看,转录产物的凝胶电泳显示两条明显的条带,主要的一条其长度相当于 4.5S 前体 RNA,分子量略小的一条可能是不完全转录产物或自身加工的产物.

利用 PCR 技术,使目的基因外加 17 个核苷酸的 T7 RNA 聚合酶启动子 TAATAC-GACTCACTATA 可在体外被 T7 RNA 聚合酶高效转录.据文献报导^[5,6],T7 启动子在转录起点后需要有 6 个核苷酸 GGGAGA 或至少保持前 4 个核苷酸 GGGGA,该序列对转录效率有

一定的影响.但是,按此设计的转录模板将使产生的 RNA 5'端带有额外的核苷酸.我们设计的 5'端引物使 4.5S 前体 RNA 基因 5'端序列直接与 T7 启动子的 TATA 序列连接,结果体外转录的效率仍然十分高.看来转录起点后的 GGGGA 序列并非绝对必须.4.5S 前体 RNA 的 5'端 6 个核苷酸序列为 GCGTTG,是否该序列正好符合 T7 启动子的需要,或是 T7 启动子转录起点后的核苷酸实际上并无严格的限制,这些还需经过更多的实验加以判明.

本方法对各类 RNA 均适用.原则上,只要通过 PCR 使目的基因外加 SP6, T7 或 T3 启动子,即可构建成体外高效转录系统.该方法快速、简便、而且转录产物的数量和质量都令人满意,比传统分子克隆构建的转录系统有较多的优越性. PCR 技术在我国也已广泛应用.用 PCR 方法构建体外高效转录系统是一个新的发展,它将为 RNA 研究提供方便的手段.

参 考 文 献

- 1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989;10.27—10.37
- 2 Kavenoff R, Zimm B H. Chromosome-sized DNA molecules from *Drosophila*. *Chromosoma* (Berlin), 1973;41:1—27
- 3 Titus D E. *Promega protocols and applications guide*. 2nd ed, Madison: Promega Corporation, 1991;58—59
- 4 Hsu L M, Zagorski J, Fournier M J. Cloning and sequence analysis of the *Escherichia coli* 4.5S RNA gene. *J Mol Biol*, 1984;178:509—531
- 5 Danenberg P V, Horikoshi T, Volkenandt M *et al*. Detection of Point mutations in human DNA by analysis of RNA conformation polymorphism (s). *Nucl Acids Res*, 1992;20:573—579
- 6 Sarkar G, Yoon H-S, Sommer S S. Screening for mutations by RNA single strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucl Acids Res*, 1992;20:871—878