

技术与方法

快速制备 RNA 小分子质量标记的新方法*

邓文生 杨希才 康良仪

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

张奉学¹⁾ 符林春

(广州中医药大学热带医学研究所, 广州 510407)

摘要 在锤头型核酶下游增加一段核酶作用的靶序列, 使之成为自切割的核酶. 将自切割核酶基因合成, 扩增并克隆在质粒 pBluescript SK 上, 经连续 4 次克隆获得含 10 个拷贝的自切割核酶基因的载体. 5% 聚丙烯酰胺变性凝胶电泳结果显示: 体外转录过程中多体酶发生了自切割, 核酶转录物切割成从 70 nt 到 706 nt 的 RNA 等梯度带, 因此, 可以作为 RNA 分子质量标记之用.

关键词 锤头型核酶, 自切割, 体外转录, RNA 分子质量标记

学科分类号 Q52

在现代分子生物学实验中, RNA 的大小需要用分子质量标记是基因操作者常遇到的问题. 尽管单链 DNA 与单链 RNA 很相似, 但其迁移速度仍有明显差异. 研究表明, 其误差可达到 5%. 很显然, 单链 DNA 不能作为 RNA 的分子质量标记. 目前, 市场上虽有一些 RNA 分子质量标记出售, 但均属 RNA 的大分子质量标记, 而且价格十分昂贵, 因此, 很难满足实验研究的需求. 鉴于这一现状, 我们根据 cis 核酶的切割特点, 采用巧妙的克隆策略, 设计、合成、构建了自切割 10 体核酶基因, 由此, 成功制备了 RNA 小分子质量标记. 现将方法和结果报道如下.

1 材料与方法

1.1 菌种和载体

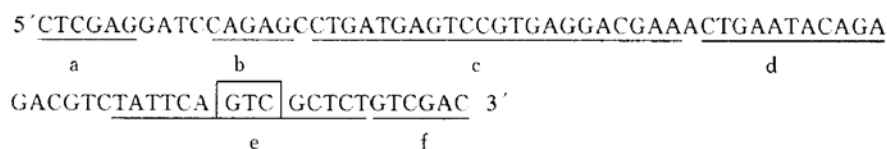
大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , pBluescript SK 为本研究室保存菌种和载体. 质粒 pSP71 购自华美公司.

1.2 试剂

限制性内切酶 *Xba* I, *Xho* I, *Sal* I, *Hind* III 及转录试剂盒购自 Promega 公司. T4DNA 连接酶, Klenow 酶及 PCR 试剂盒购自 TaKaRa BIOTECH 公司, 常规试剂为国产分析纯. 寡聚脱氧核糖核苷酸片段由中国科学院微生物研究所生物技术中心用 Beckman oligo 1000m/1000 合成仪合成.

1.3 自切割锤头型核酶设计

根据 Haseloff 提出的锤头型核酶结构特点及对底物切割的要求. 我们在锤头型核酶序列下游增加一段核酶作用的靶序列构成自切割核酶, 全长为 76 个核苷酸 (nt), 其 DNA 序列如下:



上述序列中, a 和 f 分别为 *Xho* I 和 *Sal* I 的限制性酶切位点, b 和 d 分别为锤头核酶的两翼配对区 Helix I 和 Helix III, c 为锤头核酶的核心催化序列, e 为锤头型核酶自切割的靶序列, 其中, GTC 是核酶作用的靶位点.

1.4 核酶基因的合成、克隆和鉴定

自切割核酶 cDNA 序列分 A、B 两链合成. A 链为正链, 45 个碱基; B 链为负链, 45 个碱基. A

链 3' 端与 B 链 3' 端有 14 个碱基互补. 为获得全长基因, 将等摩尔数 A 链与 B 链混合, 95℃ 变性 2 min, 温室下退火, 加适量 dNTP 和 Klenow 酶补平, 得到双链 cDNA. 再加入适量引物进行 PCR 扩增. 引物序列分别为引物 1: 5' CCGAATTG-

* 国家自然科学基金资助项目 (3977092).

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: 013600471493, E-mail: fxzhang@990.net

收稿日期: 1999-05-26, 修回日期: 1999-11-08

CTCGAGGATCCA 3', 引物 2: 5' CGAAGCTT-GTCGACAGAGCG 3'. 扩增反应按 PCR 试剂盒说明书进行, 热循环条件为 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环. PCR 产物用低熔点琼脂糖胶回收纯化后, 用 *Xho* I 和 *Sal* I 限制性酶消化, 将获得片段与相同内切酶消化的 pBluescript SK 相连. 所用连接酶为 T4 DNA 连接酶, 连接条件为 20 mmol/L, Tris-HCl (pH 7.6), 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L DTT, 0.6 mmol/L ATP, 16℃ 连接 4 h. 转化受体菌为 *E. coli* DH5 α , 感受态细胞采用 PEG 法制备. 经转化, 涂皿, 采用蓝白斑筛选重组子. 碱法提质粒. 质粒酶切后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定. 双脱氧末端终止法进行测序^[1]. 将序列正确的基因, 连续多次克隆, 直到获得含 10 体核酶基因的载体.

1.5 体外转录

提取含有多体核酶基因的质粒, 用 *Sal* I 限制性酶酶解使模板线性化, 低熔点琼脂糖胶回收纯化模板. 转录方法按照 Promega 试剂盒提供的方法进行. 转录完毕用等体积的酚/氯仿 (1:1) 抽提, 取适量样品在 5% 聚丙烯酰胺-尿素凝胶中电泳.

2 结 果

2.1 10 拷贝自切割核酶基因的克隆和鉴定

PCR 扩增的全长自切割核酶基因用 *Xho* I 和 *Sal* I 限制性内切酶酶解后, 与相同内切酶作用的 pBluescript SK 载体连接. 转化大肠杆菌后, 挑取白斑克隆菌培养过夜. 提取的质粒用 *Xho* I 和 *Sal* I 限制内切酶酶切后, 进行 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 图 1 表明 70 bp 的自切割核酶基因已被克隆上. 对重组质粒测序表明, 克隆的序列与设计的序列完全一致.

由于用 *Xho* I 和 *Sal* I 酶切的片段能获得相同的粘端. 因此, 用 *Xho* I 酶切获得载体或片段能与 *Sal* I 酶切获得的片段或载体连接, 但连接后的位点 *Xho* I / *Sal* I 消失不能被 *Sal* I 和 *Xho* I 所酶解. 为了获得多拷贝串联基因, 用限制酶 *Xho* I 和 *Xba* I 将克隆的核酶序列切下, 与用 *Sal* I 和 *Xba* I 酶切制备的已含一个拷贝核酶基因的载体连接. 由于是定向克隆, 载体上的原来基因后面很容易地增加又一拷贝基因, 而且方向是首尾相连的. 按照同样的策略, 连续 4 次克隆获得了 10 个拷贝的首尾相连的自切割核酶基因, 如图 1 所示, 最后将 10 拷贝的核酶基因转移至 pSP71 载体上.

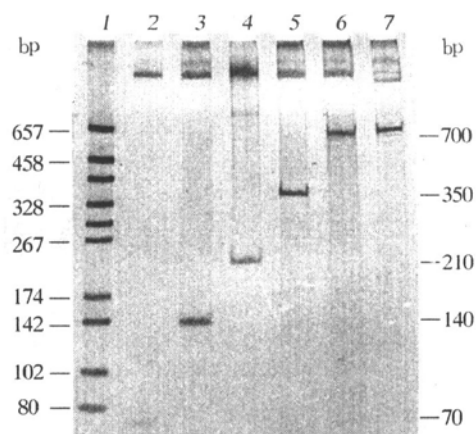


图 1 重组质粒的酶切鉴定

1: pGEM7Z/*Hae* III; 2: pBluescript-Rz/*Xho* I + *Sal* I; 3: pBluescript-2Rz/*Xho* I + *Sal* I; 4: pBluescript-3Rz/*Xho* I + *Sal* I; 5: pBluescript-5Rz/*Xho* I + *Sal* I; 6: pBluescript-10Rz/*Xho* I + *Sal* I; 7: pSP71-10Rz/*Xho* I + *Sal* I.

2.2 RNA 小分子质量标记的制备

将载有 10 拷贝核酶基因的 pSP71 质粒用限制酶 *Sal* I 酶切线性化, 纯化后的模板在 T7RNA 聚合酶指导下进行体外转录反应 1.5 h, 反应结束后, 用酚/氯仿 (1:1) 抽提, 取 2 μ l 转录物在 6% 聚丙烯酰胺尿素凝胶上电泳检测 (图 2). 10 体核酶转录后, 因转录体系中存在一定浓度 Mg²⁺, 10 体核酶转录物自切割成一系列不同大小的片段. 理论上, 10 体核酶随机自切割能产生 70 nt、140 nt、...、700 nt 等 10 个片段. 但由于载体上的序列也

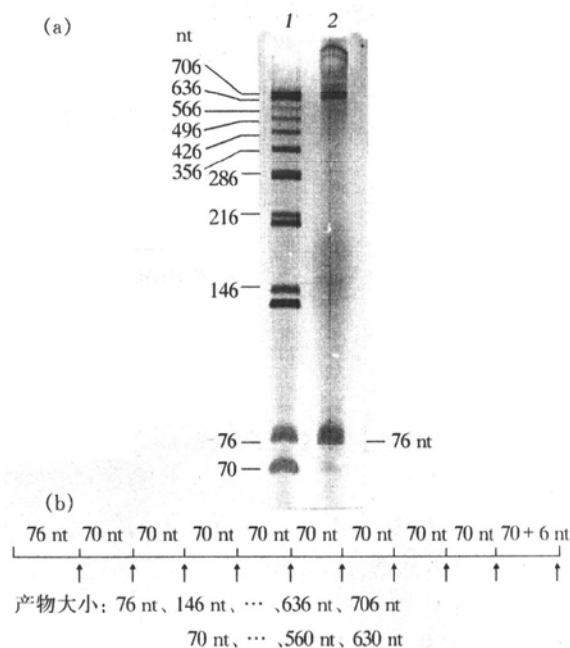


图 2 10 体核酶自切割形成的产物大小的实际值 (a) 与理论值 (b)

(a) 1: 10 体核酶产物; 2: 76 nt RNA 转录产物.

被转录, 导致形成又一组 10 个大小不同的片段如 76 nt、146 nt、...、706 nt 等 (图 2b), 图 2a 表明, 核酶自切割产物大小与理论推算值是相符的。由此可见, 这种等梯度分子质量大小排列带可以作为其他 RNA 小分子的分子质量参照物。

3 讨 论

RNA 分子质量标记制备方法通常由体外转录工程质粒获得, 在传统的制备方法中, 每个标准分子均来自不同的质粒载体转录获得, 因此非常耗时而且成本昂贵。尽管 Audic 等^[2]用同一载体在不同的限制酶作用后转录获得了不同长度的 RNA 分子质量标记, 似乎在一定程度上能满足实验的要求。但因一个转录反应中同时含有几种模板, 转录产物背景混杂, 作为分子质量标记不很理想, 而且需要先纯化每种模板, 再按比例混合, 也是一种很费时费钱的方法。有些研究者^[3]曾经利用顺式切割核酶也制备出 RNA 小分子质量标记, 而因其克隆策略的缺陷不能提供较大范围的分子质量标记。在本实验中, 利用某些限制酶的作用特点巧妙地克隆了多体自切割核酶基因的质粒, 体外转录后, 10 体核酶发生自切割。成功地制备了 70 nt 至 706 nt 的 RNA 分子质量标记范围, 若以 70 nt、76 nt 为一组带, 那么每组带之间均相差 70 nt, 是一套等距离 RNA 分子质量参照物。由于它们是由一个全长转录物自切割形成的小分子, 因此, 带形整齐美观, 避免了因模板过多转录带来的不利背景。总之, 从整个制备过程看, 制备方法简单, 快速, 省时省钱, 是一种非常实用的 RNA 小分子质量标记制备方法。

参 考 文 献

- 1 Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 644~ 647
- 2 Audic Y, Omilli F, Osborne H B, *et al.* Design and use of easily mad RNA size markers. *BioTechnique*, 1997, **23** (4): 612~ 616
- 3 Boreman J, Altschuler M. Simple method to produce RNA size markers using cis ribozymes. *BioTechnique*, 1995, **18** (3): 404 ~ 406

A New Method for Quickly Preparing Small RNA Molecular Mass Marker. DENG Wen-Sheng, YANG Xi-Cai, KANG Liang-Yi (*Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*); ZHANG Feng-Xue, FU Lin-Chun (*Institute of Tropical Medicine, Guangzhou Traditional Chinese Medicine University, Guangzhou 510407, China*).

Abstract A self-cleaving ribozyme was comprised of a hammerhead ribozyme and its target sequence located the downstream of the hammerhead ribozyme. The self-cleaving ribozyme gene was synthesized, amplified and cloned into the Bluescript SK plasmid. The construct harboring 10 copies of the self-cleaving ribozyme gene was obtained through successively cloning for four times. The result of polyacrylamid denatured gel electrophoresis showed: the multimeric ribozymes caused self-cleaving during the transcription reaction *in vitro* and formed RNA step ladders from 70 nt to 706 nt, which indicates that the self-cleavage ribozyme transcripts can be used as RNA molecular mass markers.

Key words hammerhead ribozyme, self-cleaving, transcription *in vitro*, RNA molecular mass marker

用均匀设计优化 apo E 基因的 PCR 扩增方案*

朱 滨¹⁾ 王国荃 陈 坚

(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054)

摘要 由于 PCR 影响因素多, 获得理想扩增结果比较困难, 有必要寻找一种简单有效的方法建立最佳扩增体系。针对 Mg^{2+} 浓度、二甲基亚砜 (DMSO) 浓度、变性时间、延伸时间、循环次数等因素进行 4 因素 6 水平和 6 因素 10 水平均匀设计实验优化 apo E 基因 244 bp 片段的 PCR 扩增条件。采用纯化模板和简易模板, 只需 6~

* 国家卫生部青年科技人才基金和新疆卫生厅科技人才基金共同资助项目。

¹⁾ 中国科学院上海冶金研究所 8710 室, 上海 200050. Tel: (021) 62511070-8710, E-mail: zhubin@itsvr.sim.ac.cn

收稿日期: 1999-06-21, 修回日期: 1999-10-08