

介绍一种高效, 简便的 cDNA 合成方法

沈翊珩 吴宁华 程小款

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

随着 DNA 重组技术日益广泛地用于医学和生物学各领域中, 某些与细胞的生长、增殖或分化有关的表型蛋白编码基因的分离和克隆愈来愈得到重视。由于真核基因组的高度复杂性和内含子的存在, 为便于进行基因体外表达或结构分析, 人们常以互补 DNA (cDNA) 作为分子克隆的起点。为此, 首先必须获得高效、稳定的信使 RNA (mRNA) 作为 cDNA 合成的模板, 随后再高效地合成 cDNA。我们曾探索了多种反应体系, 现将所获得的比较满意的结果总结于此。

材 料 和 方 法

一、mRNA 的分离纯化: 基本按照 Chirgwin 的硫氰酸胍-氯化铯超离法^[1]略加改进(以下简称 GuTC/CsCl 法)。按细胞压积的 5 倍加入硫氰酸胍裂解液(4M 硫氰酸胍、25mM 枸橼酸钠 pH7.0、0.1M β -巯基乙醇、0.5% 十二烷基甲基甘氨酸钠)中剧烈旋震, 再向每毫升裂解的细胞悬液中加 0.4 克氯化铯 (BRL 超纯试剂), 待溶解后加于含 0.1M EDTA 的 5.7M 氯化铯溶液上, 在 20℃ 离心 150,000 $\times g$ 共 12 小时。RNA 沉淀溶于不含 N-十二烷基甲基甘氨酸钠的上述硫氰酸胍溶液中, 经等体积酚/氯仿抽提后, 乙醇沉淀。

mRNA 的分离系按文献方法^[2]经 Oligo-dT 纤维素(P-L Biochemicals, Type 7) 吸附, 收集 10mM Tris-Cl pH7.5、1mM EDTA、0.05% SDS 洗脱部分, 乙醇沉淀后保存于 -70℃。

二、cDNA 的合成: 第一、二链的合成均在不含氯离子的乙酸盐系统中进行。

I. 第一链的合成 (pH8.3):

在 50 μ l pH8.3 乙酸盐缓冲体系 (50 mM Tris-OAc, pH8.3; 138mM KOAc, 6mM MgOAc, 10mM NaOAc, 20mM DTT) 中, 以 100 μ g/ml Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (P. L. Biochemicals) 为引物, 含 4 种脱氧核苷三磷酸(dNTP) (P. L. Biochemicals) 各 20 μ M, AMV 逆转录酶 (Life Science) 44u。在 37℃ 保温 90' 后, 直接用酚-氯仿溶液抽提一次, NaOAc-乙醇沉淀。

II. 第二链的合成 (pH7.5):

离心收集 mRNA-cDNA 杂交双链, 在 pH 7.5 的 100 μ l 第二链 cDNA 合成缓冲液 (20mM Tris-OAc, pH 7.5; 5 mM MgOAc, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 100mM KOAc) 中, 加入 0.15mM β -NAD 及 4 种 dNTP 各 125 μ M。混匀后加入不同量的核酸酶 H (RNaseH 1u/ μ l; P. L. Biochemicals), DNA 聚合酶 I 30u (DNA pol I 15u/ μ l; P. L. Biochemicals) 和大肠杆菌 DNA 联结酶 3u (5u/ μ l; New England Biolabs)。先后在 14℃ 及 22℃ 保温各 1 小时后, 计算产量或进行电泳分析。

三、同位素 ³²P-或 ³H-标记 dNTP (Amersham) 掺入 DNA 量的计算、琼脂糖电泳及放射自显影等均为本实验室常规方法。

结 果 和 讨 论

一、合成底物的制备

为探索高效 cDNA 的合成, 我们应首先分离出完整的或大片段 mRNA 作为底物, 为此, 必须防止外源或内源的 RNA 酶活性。目前, 公认有效的 RNA 酶抑制剂是 RNasin, 它来自鼠肝或胎盘的蛋白质, 分子量约为 40,000d。此外, 钒氧核苷酸复合物 (vanadyl ribonucleotide

表1 cDNA 第一链合成体系的比较

反应体系	缓冲系统	阴离子		阳离子 (mM)			巯基试剂	反应温度 (°C)	相对产率
		Cl ⁻	OAc ⁻	K ⁺	Na ⁺	Mg ⁺⁺			
I	Tris-OAc ^[3]		+	138	10	6	DTT	37	1.00
II	Tris-Cl ^[2]	+		140	—	10	EtSH	42	0.63
III	Tris-Cl ^[4]	+		50	—	10	EtSH	37	0.81

complex) 也有相当的抑制作用。近几年来,国外较为普遍采用的则是一种强变性剂——硫氰酸胍, 它的优点是在裂解细胞的同时能促进核酸从核蛋白中解离下来, 以及对 RNA 酶强有力的变性作用。

由于淋巴细胞中内源性 RNA 酶的含量较高, 我们采用了不同的反应条件和三种不同的 RNA 酶抑制剂, 结果表明, 当反应体系中含 RNasin 为 1,000u/ml 时, 所获得胞浆总 RNA 和 mRNA 单位产量最高(图 1), 而在硫氰酸胍系统中的产量为最低, 前者约为后者的三倍。

纯化 mRNA 时, 为提高流速, 我们将 Oligo (dT)₁₂₋₁₈ 纤维素柱分离系统中的 NaCl 用 LiCl 代替, 效果较好。mRNA 产率一般为总 RNA 中的 1—5%, 其中 1/3 在 0.1M LiCl 浓度中洗出, 2/3 在无 LiCl 洗脱液中出现。用兔网织细胞裂解系统进行体外转译时, 两部分洗脱液都具有转译活性。由于转译产物电泳分离的区带的位置相同, 我们认为在 0.1M LiCl 浓度中洗

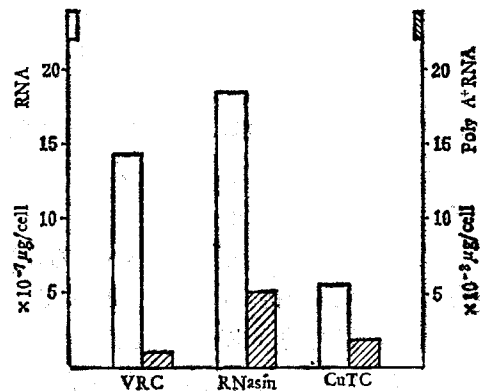


图1 不同 RNA 酶抑制剂对人淋巴细胞总 RNA 及 mRNA 产率的影响

出的部分可能是带有较短 polyA⁺ 的 mRNA。为避免 12—18 寡聚胸苷不能有效地与洗涤部分的 mRNA 结合, 我们一般只采用洗脱部分作为逆转录的模板。

尽管 GuTC/CsCl 法所获得的总 RNA 和 mRNA 产量都最低, 然而, 此 mRNA 比用

表2 cDNA 第二链合成体系的比较

反应体系	缓冲系统 (pH)	阴离子			阳离子 (mM)			辅酶或巯基试剂	反应温度 (°C)	相对产率
		Ac ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ⁻	K ⁺	NH ₄ ⁺	Mg ⁺⁺			
I	Tris-OAc (7.5)	+		+	100	10	5	β-NAD	14/22	1.00
II	Tris-Cl (7.6)	+	+		100		10	DTT	14/22	0.51
III	HEPES (7.6) ^[4]		+		67.5		4	EtSH	14/22	0.25
IV	HEPES (7.6)		+		200		4	EtSH	14/22	0.26

RNasin 所获得的 mRNA 具有较高的体外转译活性,而且片段完整,因此,该法成为我们分离淋巴细胞 mRNA 的主要方法。用 RNasin 作为抑制剂所提取出的 mRNA 各批之间体外转译活性差异较大,而且,步骤较多, RNasin、蛋白酶 K 等用量较大,因而成本较高,故只在必须从胞浆中提取 mRNA 时使用。

二、mRNA 的逆转录 (cDNA 第一链的合成)

为将 mRNA 高效地逆转录成 cDNA,我们在 pH8.3 比较了三种不同条件下所得到的结果 (表 1)。并选择 I 作为本实验室的常规方法。

从表 1 可以看出 OAc^- , Na^+ 以及巯基试剂很可能是反应体系获得较好结果的主要原因。它们的作用机制尚待研究。

用 GuTC/CsCl 法提取的 mRNA 为模板,所得到的 cDNA 第一链合成效率一般都在 50—70%。同时,提纯的 mRNA 在乙醇中保存于一60℃ 达 2—3 年之久,仍具有逆转录模板活性,合成效率达 40%,这表明本文所选用的方法是较为满意的。

三、cDNA 第二链的合成

在高效合成第一链的基础上,我们参照载体克隆 (或称直接克隆) 的方法^[1],直接以 mRNA/cDNA 杂交双链作为合成第二链的底物,反应系统中需要核酸酶 H、DNA 聚合酶 I 和大肠杆菌中提取的依赖 β -NAD 的 DNA 联结酶。我们对反应条件作了下列的比较研究:

1. 反应体系的研究

从表 2 可以看出 OAc^- 可能是提高产量的关键离子。 EtSH 可能对反应体系有抑制作用。我们在实验中基本选用 I 的条件 (见“材料与与方法”)。

2. RNaseH 的用量:

由于 RNaseH 的用量直接影响杂交双链上缺口的多少,从而决定了 DNApol I 合成 DNA 时的有效起始点。为获得较稳定的产量,我们比较了不同酶浓度对产量的影响 (图 2)。结论是在 100 μl 反应体系中第一链 cDNA 含

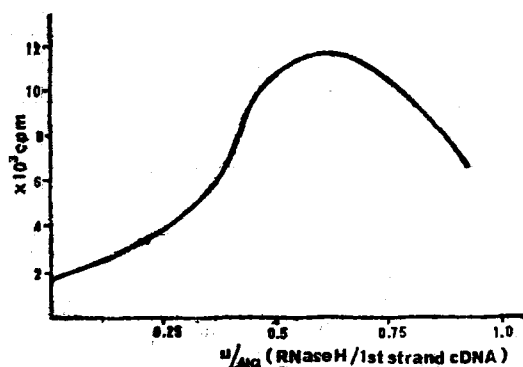


图 2 不同浓度 RNaseH 对 cDNA 第二链产率的影响 (Tris-OAc 缓冲系统)

量高于 3 μg 时最好按每 μg cDNA 用 0.6u RNaseH,在此浓度下第二链合成的片段 (图 3, 见封三)仍可达 500bp 左右。

3. 大肠杆菌 DNA 联结酶的应用:

依赖于 β -NAD 的 *E. coli* DNA 联结酶与 *T.* DNA 联结酶不同,它主要用于联接 cDNA 第二链片段间的缺口,而对 DNA 和 RNA 之间以及末端联结的效率较低,因此,特别适用于 RNaseH 和 DNA 聚合酶 I 合成 cDNA 第二链的反应体系。但是,由于 cDNA 第二链的片段并不影响整个 cDNA 的链长,经末端补齐后也可得到较高的克隆效率,因此,我们探讨了应用联结酶的必要性。

在 RNaseH 最适条件下,如继续在 14℃ 保温过夜,产量在原有基础上只增加 14.5%,然而,若在系统中加入 DNA 联结酶,则产量比加酶前增加 89.6%,从而使合成效率达到 100% 左右。将产物进行电泳,放射自显影的结果显示链长明显增加 (图 4, 见封三)。因此,与 Gubler 等人所报道^[7]的不同。我们认为,如能将 DNA 联结酶加入系统中,则有可能使第二链产量进一步提高。

综上所述,对人淋巴细胞分离 mRNA 及合成 cDNA 的较好条件是: (1) 用 GuTC/CsCl 法提取总 RNA,再用 Oligo(dT) 纤维素柱分离 mRNA 较其它分离方法简便、省时、可靠。两天内即可完成 mRNA 的分离纯化。

(2) mRNA 逆转录采用乙酸系统较 Cl^- 为

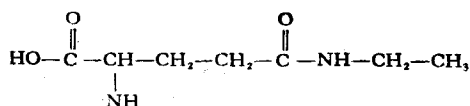
茶叶中茶氨酸的高压液相色谱的测定

朱 珩

(中国农业科学院茶叶研究所, 杭州)

茶氨酸 (Theanine acid) 主要存在于山茶科 (Theaceae) 植物中, 也是茶 [*Camellia sinensis* (L.) O. Ktze] 中含量较高的一种氨基酸, 占茶叶中游离氨基酸的 50—65% 左右。过去的资料认为除了茶以外只在一种蕈 (*Xeccomus badins*) 和茶梅 (*Camellia sasanqua*) 中有少量存在, 后来发现红山茶 (*Camellia japonica* Linn)、油茶 (*Camellia oleifera* Abed.) 等植物中均含有茶氨酸^[1,2], 只是数量上比茶少得多。茶芽中茶氨酸的含量比红山茶和油茶要高 30 倍。在适制绿茶的品种中尤为丰富。因此, 茶氨酸含量多少, 往往作为鉴别真假茶的重要依据。同时茶叶中茶氨酸含量高低, 可直接影响茶树的新陈代谢和茶叶品质, 与绿茶滋味等级具有强正相关。对于红茶茶汤滋味也有一定影响, 故精确测定茶氨酸的含量是十分重要的。

茶氨酸属酰胺类化合物, 化学上系统命名为 N-乙基-L-谷氨酰胺 (N-ethyl-L-glutamine) 其结构式如下:



自然界存在的茶氨酸均为 L 型, 纯品为白色针状结晶, 熔点为 217—218°C (分解), $[\alpha]_D^{20} = +7.0$ 极易溶于水, 而不溶于无水乙醇和乙醚; 水溶液呈微酸性, 具有焦糖香和类似味精的鲜爽味; 经盐酸水解后, 生成 L-谷氨酸和乙胺^[2], 用茚三酮显色, 呈紫色, 其发色强度与谷氨酸相似; 与碱式碳酸铜生成淡紫色柱状铜盐。根据这些特性可以从茶叶中分离出纯态茶氨酸。

茶叶中的和一般植物中的氨基酸, 研究方法有很多相同之处。但分离方法有其特殊性, 特别是对茶氨酸的分离, 更具有自身的特色。测定茶氨酸的方法较多, 以往常采用纸上层析、柱上层析、薄层扫描、凝胶电泳、氨基酸自动分析仪等。但这些方法常受茶汤中其它生化成分的干扰, 预处理又十分复杂, 因而影响分析结果的准确性。采用高压液相色谱法测定茶叶中的茶

佳。在 pH8.3 用逆转录酶进行反应, cDNA 第一链合成效率最高可达 70%, 一般均在 50% 以上。

(3) cDNA 第二链的合成可采用 RNaseH, DNA pol I 和 DNA 联结酶反应体系。此法的优点是合成效率高, 有可能达到 100%; 此外, 还省去碱解 mRNA 和 S_1 核酸酶水解两步, 不仅省时, 而且保证了大片段合成和 5' 末端的完整性。

用同样条件进行其它哺乳动物细胞和疟原虫 mRNA 分离及 cDNA 合成也获得较满意的结果。

参 考 文 献

- [1] Chirgwin, J. M. et al.: *Biochemistry*, 18, 5294—5299, 1979.
- [2] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- [3] Liew, C. C.: 个人交流, 1984.
- [4] BRL, AMV, 逆转录酶系统 I 资料, 1982.
- [5] Okayama, H. & Berg, P.: *Mol. Cell Biol.*, 27 161—170, 1982.
- [6] Watson, C. J. & Jackson, J.: in *DNA Cloning* (Glover, D. M. editor), Vol. 1, p 79—88, IRL Press. Oxford, 1985.
- [7] Gubler, U. & Hoffman, B. J.: *Gene*, 25, 263—269, 1983.

[本文于 1986 年 3 月 5 日收到]

《甲型流感病毒的固相碘化标记及放射免疫沉淀》的图

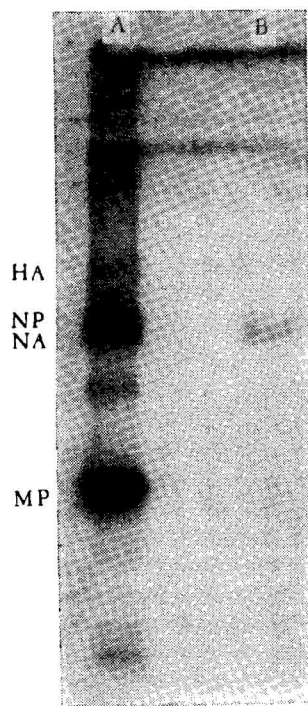


图 1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳放射自显影
A 示¹²⁵I标记的流感病毒多肽, B 示相应抗体的免疫沉淀

《凝胶中³H,¹⁴C和³⁵S同位素测定的快速荧光自显影方法》的图

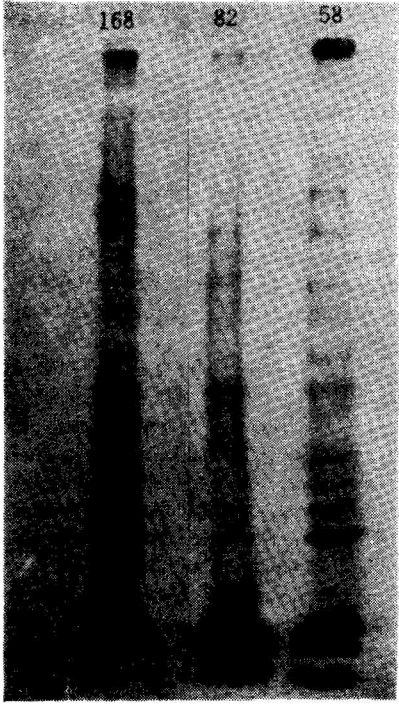


图 4 运用本文标准方法的荧光自显影实例
对数生长期的枯草杆菌,加入³H-丝氨酸(5μCi/ml细胞)标记30分钟,提取蛋白质作 SDS-PAGE. 自显影三天结果. 168 为野生型 82 及 58 为核糖体蛋白基因突变株。

《介绍一种高效,简便的 cDNA 合成方法》的图

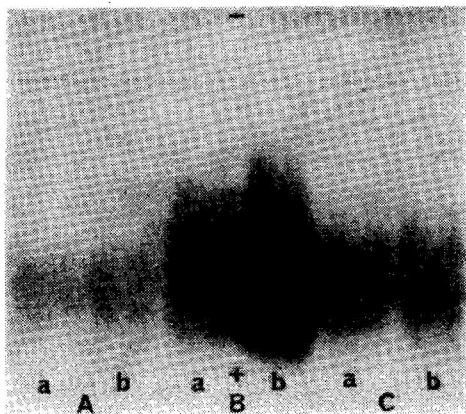


图 3 碱性琼脂糖电泳、放射自显影图谱
示不同浓度 RNaseH 对 cDNA 第二链链长的影响。A、B、C 的 RNaseH 浓度分别为 0.42u, 0.58u 和 0.75u(参看图2)。a 和 b 分别表示在不同 RNaseH 浓度下反应 2 小时和反应 16 小时。

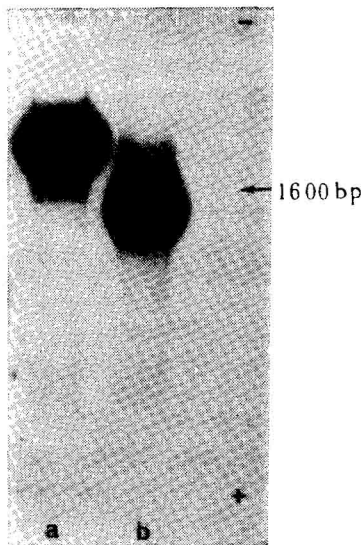


图 4 琼脂糖电泳、放射自显影图谱
示大肠杆菌 DNA 连接酶对 cDNA 链长的影响。
a. 加 *E.coli* DNA 连接酶(反应过夜); b. 未加 DNA 连接酶。