

Isolation of Novel Transcribed Sequences from FRAXA Site via Exon Trapping. KONG Jian, ZHU Ning-ning, YIN Bin, SHEN Yan, WU Guanyun (*National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China*).

Abstract Exon Trapping is a powerful method developed recently for isolating transcribed sequences from genomic DNA. Two novel exons, A91 and D12, were isolated from YAC209G4 spanning FRAXA site using the

exon trapping system with pSPL3 as splicing vector. A91 was amplified strongly in fetal liver and skeletal muscle cDNA library and mildly in liver, kidney and bone marrow library, respectively. While D12 was failed to be detected from the 8 libraries. A fragment of 315 bp containing A91 has been cloned (AM4470) from the skeletal muscle cDNA library. A single transcript of 2.8 kb was detected from mRNA samples of human heart and skeletal muscle on multiple tissues Northern blot using AM4470 probe.

Key words exon trapping, transcribed sequences, FRAXA site

一种改进的构建杂交扣留 cDNA 文库的方法^{*}

赵大中¹⁾

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

陈民 种康 谭克辉

(中国科学院植物研究所发育室, 北京 100093)

摘要 介绍了一种改进的利用减法杂交构建 λ 噬菌体 cDNA 文库的方法, 该方法利用处理的 sscDNA 减去两种对照的 mRNA 富集目的 sscDNA 并用磁珠法分离杂交单体, 结果表明其增加了杂交单体的产量、简化了实验步骤, 而且更有利于富集所需基因, 是构建 cDNA 文库的一个有效改进.

关键词 cDNA 文库, 磁珠, 减法杂交

学科分类号 Q946.2

减法杂交与差异筛选是在未知基因产物的情况下克隆低丰度发育调控基因的经典方法^[1,2]. 生物在其发育过程中, 不同组织或处于不同发育阶段的同一组织, 其基因具有特异性的表达, 其 mRNA 也就不同. 利用基因相减的方法 (即减法杂交) 构建一个 cDNA 文库, 然后再进行差异筛选克隆出特异表达的基因, 这就是减法杂交与差异筛选的原理^[3]. 在实行减法杂交时, 一般利用羟基磷灰石柱层析的方法分离杂交单体, 这种技术存在着操作复杂、周期长、核酸损失量大等缺点. 本文介绍了一种新的利用磁珠分离杂交单体的技术, 同时在核酸杂交方式上也作了改进.

1 材料与方法

1.1 材料

冬小麦京冬 1 号 (*Triticum aestivum* L. cv Jingdong No. 1) 种子均匀播于垫有滤纸的培养皿中, 吸胀露白后: 在 25℃ 培养箱中暗培养 48 h, 即为未春化处理材料 (nonvernalization, NV); 在 0~4℃ 冰箱中暗培养 21 d 为春化处理材料 (vernalization 21 d, V₂₁); 将春化处理的材料转移到无菌的石英砂基上于

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (39330010).

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1997-06-18, 修回日期: 1998-01-05

35℃的培养箱中暗培养5 d为脱春化处理材料 (devernalization, DV). 用镊子剥取上述材料的胚芽, 分别投入液氮中备用.

1.2 冬小麦总 RNA 的提取及 Poly(A)⁺ RNA 的纯化

总 RNA 的提取采用盐酸胍、异硫氰酸胍强烈变性剂法. Poly(A)⁺ RNA 的纯化采用 poly ATtract^R mRNA 分离系统 (Promega). 实验用器皿均经过焙烤、焦磷酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水处理或硅化处理, 实验操作在超净台中进行, 确保无 RNA 酶污染.

1.3 减法杂交

1.3.1 单链 cDNA (sscDNA, single stranded cDNA) 的合成: 取 4 μg 经春化处理的 mRNA (V₂₁mRNA), 加入 2 μg Oligo (dT) 作为引物, 于 70℃变性 5 min. 放置室温后依次加入 9 μl 的 5 倍反应缓冲液、100 U 的 RNA 酶抑制剂 (Promega 产品)、60 U 的 AMV 逆转录酶 (Promega 产品), 使反应体系达到 45 μl, 吸取 5 μl 反应液置于另一含有 1.85 × 10⁵ Bq 的 α³²P-dCTP 的试管中, 将二者于 42℃水浴中反应 60 min, 加入 0.2 mol/L 的 NaOH 除去模板 mRNA 后, 用乙醇沉淀法收集 sscDNA, 含有同位素的反应用碱性电泳^[4]检测第一条链的合成效果.

1.3.2 减法杂交: 取 40 μg 的 NVmRNA 与 DVmRNA 溶液至离心管中于 60℃水浴 5 min, 放置冰浴中, 加入用 DEPC 水溶解的 sscDNA, 再加入杂交缓冲液 (终浓度: PIPES (piperazine N, N'-bis (2-ethanesulfonic acid), 哌嗪 N, N'-双 (2-乙磺酸)) 33 mmol/L、NaCl 1 mol/L、EDTA 0.2 mmol/L、SDS 2%) 至终体积 150 μl, 封上石蜡油后转移至 100℃水浴中 60 s, 用冰冷却后放置 70℃水浴中杂交 20 h.

1.3.3 未杂交 sscDNA 的分离 (磁珠法, 参照 Promega corporation, Promega protocols and applications guide. 2nd. 1991, 130~132): a. 在反应体系中加入 DEPC 水 850 μl, 65℃水浴 10 min 后加入 30 μl 生物素标记的 Poly(A)⁺ (8.6 nmol/L, 军事医学科学院放射医学研究

所合成)、27 μl 的 20 倍 SSC 放置室温. b. 重悬离心管中的亲和素磁珠并放到磁性分离架上, 当磁珠集中于试管一侧时, 小心去除溶液, 然后加入 0.5 倍的 SSC 漂洗 3 次, 最后重悬于 0.1 ml 的 0.5 倍的 SSC 中. c. 将加好生物素的溶液加入到漂洗过的试管中, 室温温育 10 min. d. 将离心管放至磁性分离架上, 待磁珠移至一侧时, 移出溶液, 并重复用 1.0 ml 的 0.1 倍的 SSC 漂洗 4 次. e. 将磁珠重悬于 0.1 ml 的双蒸水中, 然后放至磁性分离架上, 待磁珠移至一侧时, 小心移出溶液, 再用 0.15 ml 的双蒸水洗脱一次. f. 在收集的 0.25 ml 溶液中加入 0.1 倍体积的 3 mol/L 的乙酸钠和 1 倍体积的异丙醇-20℃过夜, 然后 12 000 g, 4℃下离心 10 min, 用 75% 的乙醇冲洗、吹干后溶于 100 μl 的 DEPC 水中.

1.3.4 sscDNA 3' 端加尾: 在含有 sscDNA 的离心管中依次加入 5 倍末端转移酶缓冲液 30 μl、10 μl 1 mmol/L 的 dCTP、8 μl 的末端转移酶 (Promega 产品) 在 150 μl 反应体系中温育 30 min. 乙醇沉淀法浓缩 sscDNA.

1.3.5 双链 cDNA (double stranded cDNA, dscDNA) 的合成: 在 sscDNA 溶液中依次加入 1 μl 的 6 个碱基的随机引物 (0.5 g/L)、1 μl 的 Oligo (dG) (0.5 g/L)、10 倍的反应缓冲液 10 μl、DNA 聚合酶 30 U (Promega 产品)、RNA 酶 H (Promega 产品) 2 U 于 100 μl 反应体系中 14℃反应 4 h. 反应完毕后放入 70℃水浴 10 min, 然后加入 3 U 的 T4 DNA 聚合酶 (Promega 产品) 于 37℃温育 10 min, 用终浓度 20 mmol/L 的 EDTA 终止反应, 乙醇沉淀法浓缩 dscDNA.

1.4 扣留 cDNA 文库的构建

将合成的 dscDNA 用 *EcoR* I 甲基化酶进行 *EcoR* I 位点的甲基化, 然后在两头接上 *EcoR* I 接头, 再用 T4 DNA 连接酶与 λDNA 的长、短臂连接. 对含有插入片段的 DNA 利用 Promega 公司的 Lambda gt10 包装系统进行体外包装后, 按照 1: 100、1: 1 000、1: 10 000 的比例稀释包装好的 λ噬菌体, 以 C₆₀₀ hfl 为

受体菌，用 LB 培养基铺板，37℃温育过夜，根据噬菌斑形成的多少计算库容（参照 Promega corporation, Promega protocols and applications guide. 2nd. 1991, 218~ 222）.

1.5 插入片段的分析

1.5.1 λDNA 的提取: λDNA 的提取采用快速分析法^[4].

1.5.2 插入片段的扩增: 以 λDNA 的 *Eco*RI 位点两侧的序列为引物（正向引物: 5' CTT TTG AGC AAG TTC AGC CTG GTT AAG 3', 反向引物: 5' GAG GTG GCT TAT GAG TAT TTC TTC CAG GGT A 3'），λDNA 为模板，在 Taq DNA 聚合酶存在下，94℃变性 1 min、55℃退火 2 min、72℃延伸 2 min，扩增 35 个循环. 扩增产物用 1% 的琼脂糖电泳分析.

2 结果与讨论

2.1 不同处理冬小麦的总 RNA

利用盐酸胍、异硫氰酸胍强烈变性剂法提取了冬小麦京冬 1 号 NV、V₂₁、DV 的胚芽的总 RNA，图 1 是 3 种总 RNA 的甲醛变性电泳图谱. 从图谱上可以看出获得的 3 种总 RNA 均很完整，可以用作分离 mRNA.

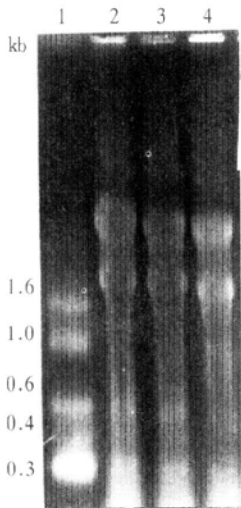


图 1 从 NV、V₂₁、DV 三种不同处理材料中提取的冬小麦京冬 1 号的总 RNA 的甲醛变性琼脂糖电泳 每样 20 μg，琼脂糖浓度 1.2%. 1: 0.3~ 1.6 kbRNA 分子质量标准; 2: NV; 3: V₂₁; 4: DV.

2.2 扣留 cDNA 文库的构建

春化处理 21 d 的冬小麦京冬 1 号胚芽的 mRNA 在逆转录酶的作用下合成 sscDNA. 图 2 的碱性电泳分析表明合成的 sscDNA 在长度上很完整. 将过量 10 倍以上的 NVmRNA、DVmRNA 与 sscDNA 杂交，未春化、春化 21 d、脱春化中均表达的 mRNA 反转录成的 sscDNA 将与 NVmRNA、DVmRNA 形成 mRNA/cDNA 杂交分子，而由春化 21d 特异表达的 mRNA 反转录成的 sscDNA 则保持单链状态. 运用磁珠分离法将这些特异的 sscDNA 分离出来，³²P-dCTP 掺入实验表明得到的杂交单体占杂交复合物的 5%. 将分离的 sscDNA 合成 dscDNA，在 dscDNA 的两端加上 *Eco*RI 的接头，将其与 λgt10 的左、右臂连接起来，经过体外包装，获得了富集低温诱导的冬小麦扣留 cDNAλ 噬菌体文库. 库容测算结果表明文库的库容为 4 × 10⁶ pfu. 使用同样的实验材料，用羟基磷灰石柱层析分离杂交单体构建的 cDNA 文库，库容只有 10⁴ pfu^[5]，可以推测用磁珠分离法增加了杂交单体的产率.

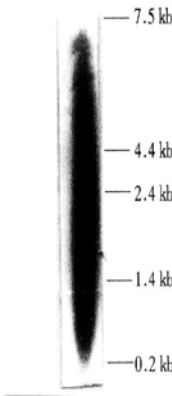


图 2 由 V₂₁mRNA 反转录的 sscDNA 的碱性电泳 α-³²P 标记，琼脂糖浓度 1.4%.

2.3 插入片段的分析

以 λDNA *Eco*RI 位点两侧的序列为引物，随机挑选了 8 个噬菌斑，以提取的 λDNA 为模板进行 PCR 扩增，图 3 是扩增产物的电泳图谱，其中有 7 个得到了插入片段，从分子质量

上来看, 部分插入片段虽然较小, 但插入率较高. 从库容及插入片段上来看, 所构建的扣除文库可以满足利用差异筛选等方法作进一步研究的要求. 由于在建库的过程中进行了减法杂交及在 cDNA 第二条链的合成中使用了随机引物, 使得一些插入片段显得较小, 但这不影响筛选特异表达基因. 本实验以一种 mRNA 为处理, 两种 mRNA 为对照进行减法杂交, 可以扣除多一些的非特异性基因, 利于寻找更加特异的基因或基因片段. 更为有利的是, 本实验采用了磁珠的方法分离杂交单体, 这样可使整个分离过程缩减到 1 h 以内, 而且使用的工具也较羟基磷灰石柱层析简单, 这就缩短了实验周期, 简化了实验程序, 杂交单体的损失量也因而得到了降低. 另外, 由于 mRNA 的 Poly (A) 尾巴较长, 足以完全封闭 sscDNA 中的 Oligo (dT), 所以不会将非特异的 sscDNA 分离出来.

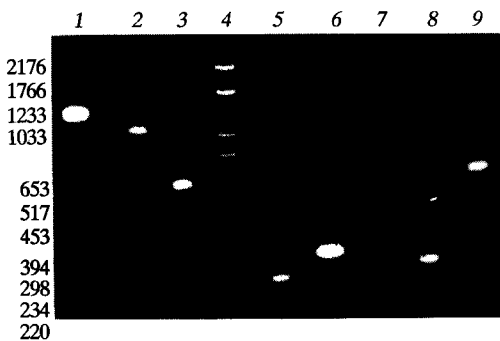


图 3 由 PCR 扩增出的插入片段的电泳图谱
4 为分子质量标准, 其他为扩增产物.

参 考 文 献

- 1 Duguid J R, Dinauer M C. Library subtraction of *in vitro* cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18** (9): 2789

~2792

- 2 Gasser C S. Molecular studies on the differentiation of floral organs. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1991, **42**: 625~629
- 3 Zimmerman C R, William C O, Robert F C *et al.* Molecular cloning and selection of genes regulated in *Aspergillus* development. *Cell*, 1980, **21** (3): 709~715
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 160~318
- 5 Chong K, Wang L, Tan K *et al.* Molecular cloning and characterization of vernalization-related genes (*ver*) in winter wheat. *Physiol Plant*, 1994, **92** (3): 511~515

An Improved Method for Constructing Hybrid Arrested cDNA Library. ZHAO Da-zhong (College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China); CHEN Min, CHONG Kang, TAN Ke-hui (Department of Developmental Biology, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China).

Abstract An improved method was utilized for constructing hybrid arrested λ phage cDNA library by subtractive hybridization, in which magnetic particles were applied to separate monomers from hybrids, and candidate sscDNAs were enriched by subtracting two control mRNAs from one treated sscDNA. The results showed that this new approach had a efficient improvement in constructing cDNA library which increased the yield of monomers, simplified experimental procedures and enriched more candidate genes.

Key words cDNA library, magnetic particle, subtractive hybridization