

- 8 Bradford M M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** (1): 248~ 254
- 9 Hardie D G. Cyclic nucleotide and Ca^{2+} -independent protein kinases. *Methods Enzymatic Analysis*. 1983, **3**: 474~ 481
- 10 Marshak D R, Carroll D. Synthetic peptide substrates for casein kinase II. *Methods in Enzymology*. 1991, **200**: 134~ 156
- 11 刘新光, 梁念慈, 马润泉. 重组人蛋白激酶 CK2 α 亚基的原核表达、纯化与鉴定. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, **21** (1): 17~ 22
Liu X G, Liang N C, Ma J Q. *Chinese J Biochem & Mol Biol*, 2000, **21** (1): 17~ 22
- 12 Jakobi R, Traugh J A. Characterization of the phosphotransferase domain of casein kinase II by site-directed mutagenesis and expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1992, **267** (33): 23894~ 23902
- 13 Bodenbach L, Fauss J, Robitzki A, *et al.* Recombinant human casein kinase II. A study with the complete set of subunits (α , α' and β), site-directed autophosphorylation mutants and a bicistronically expressed holoenzyme. *Eur J Biochem*, 1994, **220** (1): 263 ~ 273
- 14 Tuazon P T, Traugh J A. Casein kinase I and II: multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation. In: Greengard P, Robison G A, eds. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*, 23. New York: Raven Press Ltd, 1991, 124~ 164

Prokaryotic Expression, Purification and Characterization of Recombinant Human Protein Kinase CK2 β Subunit. LIU Xir-Guang, LIANG Nian-Ci (*Institute of Biochemistry & Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China*); MA Jian-Quan (*Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China*).

Abstract Protein kinase CK2 is a heterotetramer ser/thr protein kinase composed by two catalytic subunits (α or α') and two regulatory subunits (β). The recombinant plasmid containing human CK2 β subunit cDNA was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and expressed induced by IPTG. Most of the expressed CK2 β proteins were insoluble. From 6 L (about 10.4 g) bacteria, 20 mg soluble protein was extracted from the insoluble pellet and purified by a single step P11 phosphocellulose chromatography, the yield of purified CK2 β subunit was 6.8 mg. SDS-PAGE analysis of the purified protein showed only one band with molecular mass of 26 ku. Western blot analysis confirmed that the expressed product was human CK2 β subunit. Addition of the CK2 β subunit to CK2 α subunit led to maximum stimulation at a 1: 1 molar ratio of both subunits. These results demonstrated strongly that the cloned, expressed and purified recombinant protein was human CK2 β subunit. The large amount of purified recombinant CK2 β protein lays solid basis for further study directly the characteristics of the enzyme and the relationship of structure and function between CK2 β subunit and its interacted proteins.

Key words human protein kinase CK2 β subunit, expression vector pT7-7, prokaryotic expression, protein purification, enzyme kinetic analysis

用改进的 DDRT-PCR 技术进行人胚差异基因筛选*

苟德明 李文鑫¹⁾ 蒋达和 黄 健
(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 介绍一种从不同类型细胞或不同生长状态细胞中分离差异表达基因的快速高效 mRNA 差异显示技术, 其特点是利用 Ready-To-Go RT-PCR 反应珠和 Ready-To-Go RAPD 分析珠进行 mRNA 差异显示分析, 使取样步骤降至最低程度, 减少了潜在的取样误差和外源 DNA 污染, 并确保每次反应的高度重复性. 通过银染测序胶分析差异显示的 cDNA 带, 便于 DNA 回收和进一步克隆. 用此方法分析人胚发育早期不同阶段基因的差异表达, 选用 6 条随机引物对 3、4 和 5 周龄人胚进行 mRNA 差异显示分析, 从 2 000 多条带中共分离出 14 个差异产物, 经二次扩增及反向 RNA 印迹确证其中 6 个片段为发育不同阶段差异表达基因.

关键词 人胚胎, 发育, mRNA 差异显示, PCR

学科分类号 Q522

* 中国博士后基金 (207981440) 和武汉大学自强基金资助. ¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (027) 27664548, E-mail: bcdmgou@polyu.edu.hk 收稿日期: 1999-02-01, 修回日期: 1999-08-04

受精卵究竟怎样发展成为一个成体以及它们的发展模式如何是发育生物学的中心问题。近几年, 分子生物学技术在胚胎生物学和发育生物学上的应用使得人们从分子水平和细胞水平上探讨和阐明生命的奥秘。令人惊异和受到鼓舞的是, 在各种发育系统发现了诸如生长因子、原癌基因和同源异形盒基因, 这对于阐明胚胎发生的分子机制开创了一条新途径^[1]。研究的重点集中在胚胎发育不同阶段的基因表达和调节上^[2]。研究范围深入到基因组 DNA 在发育的特定阶段转录成信使 RNA, 以及在特定组织和特定时期翻译成蛋白质而发生功能。然而, 因材料所限, 目前人们对早期人胚胎分化发育的分子机制了解还不多。

由 Liang 和 Pardee^[3]发明的 mRNA 差异显示反转录 PCR (DDRT-PCR) 技术在分离正常与异常细胞之间的差异表达基因中具有迅速、有效、灵活等优点, 是基因筛选方法的一大突破, 该项技术已在小鼠^[4]、大鼠、斑马鱼等动物的早期胚胎发育研究中得到了广泛应用。近年来, 许多学者对这一技术进行了改进, 本研究在 Sokolov^[5] 和 Weaver^[6] 的报道基础上, 建立了一种通过银染测序胶电泳分辨差异带的快速、简便且重复性较高的 mRNA 差异显示技术, 并将其成功地应用于人胚发育早期不同周龄差异表达基因的分离, 为从分子水平阐明人类胚胎发生和分化等重大理论问题的研究提供重要的信息。

1 材料和方法

1.1 材料

受精 3、4、5 周龄人胚胎由湖北省妇幼保健院和同济医科大学附属协和医院提供, 经患者同意; Ready-To-Go RT-PCR 珠和 Ready-To-Go RAPD 珠 (含 6 条随机引物序列分别为 P1: 5'-GGTGCGGGAA-3', P2: 5'-GTTTCGCTCG-3', P3: 5'-GTAGACCCGT-3', P4: 5'-AAGAGCCCGT-3', P5: 5'-AACGCGCAAC-3', P6: 5'-CCCGTCAGCA-3') 购于 Pharmacia 公司; 银染试剂盒购自 Pharmacia 和 Promega 公司。

1.2 总 RNA 的提取及 mRNA 的分离

用改进的异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步抽提法提取总 RNA^[7]; 寡聚 d (T) -纤维素亲和柱层析法纯化 mRNA^[8]。

1.3 逆转录 PCR (RT-PCR)

用 Ready-To-Go RT-PCR 珠进行反转录: 将

0.5 μ g mRNA 70 °C 变性 10 min 后加入预制好的逆转录反应管内, 再加 100 ng 6mer 随机引物, 补加 DEPC 水至总体积为 50 μ l, 42 °C 保温 1 h, 随后用 1 U RNase H 37 °C 消化 30 min。接着用 Ready-To-Go RAPD 珠进行 PCR 扩增: 向预制好的 PCR 管中加入一条或二条随机引物 (各 25 pmol), 补加超纯无菌水至总体积为 25 μ l, 轻弹管壁, 待反应珠全部溶化后, 微离心, 分 3 份, 各加 1 μ l 合成好的 3、4 和 5 周龄一链 cDNA 进行 PCR 扩增, 循环参数为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 1 min, 40 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 45 个循环后 72 °C 继续保温 10 min。

1.4 PCR 产物电泳及显带

取 4 μ l 的 PCR 扩增产物在 6% 的尿素变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 当二甲苯氰至胶底时结束电泳, 按照试剂盒说明进行 DNA 银染检测。

1.5 差异片段的回收及再扩增

直接观察带型分布, 从凝胶上切下差异带后, 置于干净的管中, 用枪头磨碎胶, 加双蒸水 20 μ l, 100 °C 煮 5 min 后, 离心, 取上清液 5 μ l 进行二次 PCR 扩增, 反应条件不变。从 1.0% 低熔点琼脂糖电泳中分离 PCR 产物, 冻溶 2~3 次, 离心, 取上清 5 μ l 再次进行 PCR 扩增, 用玻璃粉回收 PCR 产物。

1.6 反向 RNA 印迹

1.6.1 点膜: 各取 50 ng PCR 产物, 100 °C 变性 10 min, 冰上冷却, 用点样器将样品点到三套尼龙膜上, 80 °C 烤膜 2~3 h。

1.6.2 探针制备: 各取 1.0 μ g 的 3、4 和 5 周龄人胚 mRNA, 加 300 U 逆转录 Superscrip II RT, 18.8×10^5 Bq [α -³²P] dCTP, 0.5 μ mol/L 的 dATP、dTTP 和 dGTP, 42 °C 反应 20 min 后, 补加 dCTP 至 0.5 μ mol/L, 继续反应 40 min, 由此制备的混合 cDNA 探针比活 (cpm 值) 高于 $1.5 \times 10^9/\mu$ g。

1.6.3 杂交: 将制备好的膜经 $5 \times$ SSC 溶液预湿, 在杂交袋中加 5 ml 预杂交液 ($5 \times$ SSC, $5 \times$ Denhardt's, 0.5% SDS, 50 mg/L 变性鲑鱼精 DNA), 65 °C 预杂交 30 min 后, 加入 cDNA 探针, 65 °C 继续杂交至少 16 h。杂交后洗膜: 先用 $2 \times$ SSC、0.1% SDS 溶液室温下洗膜 2 次, 每次 10 min; 再用 $0.5 \times$ SSC、0.1% SDS 溶液 65 °C 下洗二次, 每次 15 min, 最后用 $0.1 \times$ SSC、0.1% SDS 溶液 65 °C 洗膜 1~2 次, 进行 X 光片放射自显影, -70 °C 曝光。

2 结果与分析

2.1 引物的选择

用 6mer 随机引物代替 Oligo d (T) 将 mRNA 逆转录成一链 cDNA, 经碱变性电泳放射自显影检测, 大小介于 0.4~6.0 kb, 表明 cDNA 的合成正常. 用 10 个碱基的随机引物进行 PCR 扩增, 发现使用两条引物的扩增带总数比单一引物明显增多, 且条带清晰可辨, 但部分带的产量明显下降(图 1).



图 1 单、双随机引物 PCR 扩增效果比较
1: P4 单引物; 2: P4 + P6 双引物; M: 100 bp DNA Ladder.

Ag⁺ 离子的干扰, 二次扩增产量不高, 为此, 本文采取从琼脂糖电泳中快速回收少量产物并再次进行扩增以放大产量, 最终得到 12 个片段的扩增产物. 电泳纯化后一部分用于鉴定, 另一部分用于克隆.

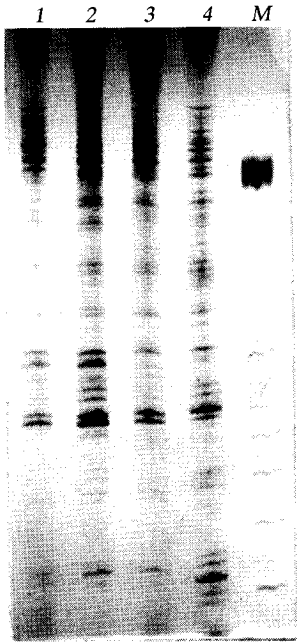


图 2 不同退火温度 PCR 扩增效果比较
模板为 4 周龄胚引物为 P5, M: 100 bp Ladder DNA 分子质量标准. 1: 36℃; 2: 39℃; 3: 42℃; 4: 45℃.

2.2 不同退火温度扩增效果比较

根据 Bauer 等^[9]报道, DDRT-PCR 扩增的最适退火温度为 40~42℃, 高于 42℃ 扩增带总数明显减少, 低于 40℃ 则呈 “Smear” 现象. 本研究发现退火温度 (36~45℃) 对扩增无明显影响 (图 2). 这是由于本系统使用 6mer 随机引物代替锚定引物进行逆转录, 并用 GC 含量较高的 10 bp 随机引物进行 PCR 扩增, 使得 PCR 反应不致于因含有 Oligo(dT)12MN 而受退火温度的显著影响. 本文最终选用 40℃ 作为退火温度进行 PCR 扩增.

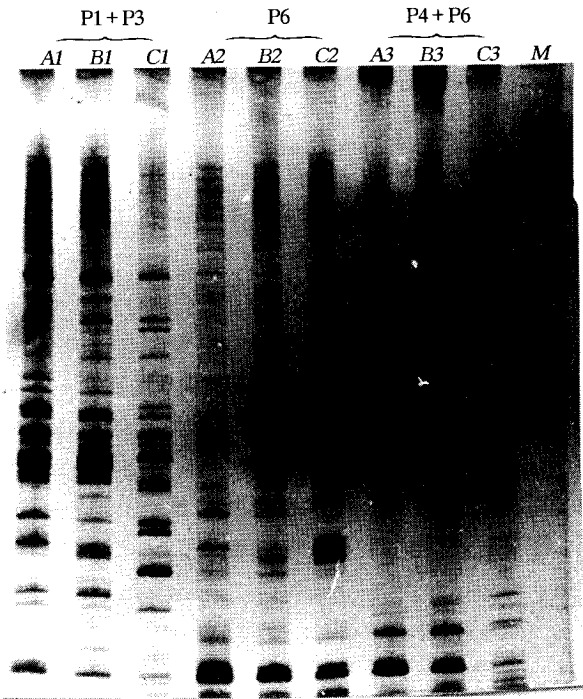


图 3 对不同周龄人胚 mRNA 的差异显示分析
A1, A2, A3: 3 周龄胚; B1, B2, B3: 4 周龄胚; C1, C2, C3: 5 周龄胚; P1, P2, P4, P6: 随机引物; M: 100 bp Ladder DNA 分子质量标准.

2.3 不同发育阶段人胚 mRNA 的差异显示

以 3、4 和 5 周龄人胚作为差异样品, 用 6 条随机引物进行差异显示分析, 共获得到 2 000 多条扩增条带, 从中发现了 14 个有明显差异的带, 部分结果见图 3, 汇总结果见表 1. 由于受重金属

表 1 三个不同时期胚胎的差异表达基因

编号	大小	3 周龄	4 周龄	5 周龄
1	120	-	+	+
2	140	+	-	+
3	910	-	-	+
4	420	-	-	+
5	820	-	+	+
6	420	-	+	-
7	310	-	+	+
8	200	-	+	+
9	300	+	-	-
10	250	-	+	+
11	540	+	-	+
12	120	-	+	+
13	180	+	-	-
14	1200	+	-	+

2.4 反向 RNA 印迹分析

鉴定工作在差异展示研究中至关重要，通常是将每个片段分别标记后进行 RNA 印迹以排除假阳性。显然，工作量很大且难度较高。为了快速鉴定阳性克隆子，我们首先用同位素标记好的一链 cDNA 为探针对差异基因片段进行斑点杂交。放射自显影后，通过比较杂交信号的强弱，确定了 6 个差异表达基因（图 4），另有 3 个基因未检测到任何杂交信号，可能是由于表达丰度太低而无法用此方法检测，有待于进一步的鉴定。

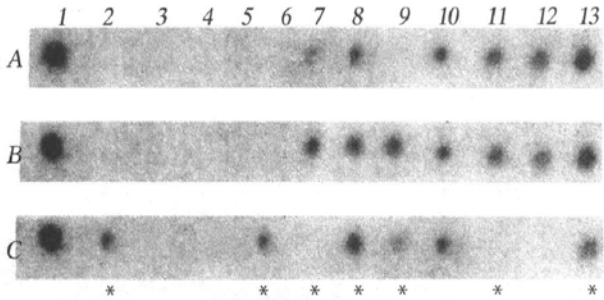


图 4 反向 RNA 印迹鉴定差异表达基因

打“*”的为鉴定的差异基因。A：以 3 周龄胚 cDNA 为探针；B：以 4 周龄胚 cDNA 为探针；C：以 5 周龄胚 cDNA 为探针。1：阳性对照（β-肌动蛋白）；2~13：50 ng 二次扩增 cDNA 片段。

3 讨 论

3.1 所用技术方法的特点

由 Liang 和 Pardee 设计发展起来的 RNA 差异显示 PCR 技术，从理论上讲可以系统地分离、克隆不同组织样品之间所有差异表达的基因，被广泛应用于生物学和医学领域的众多学科，尤其是在寻

找发育基因和疾病相关基因的工作中潜力巨大^[8~10]。但许多研究者发现该技术存在一定缺陷，其中三点较为突出^[11,12]：a. 操作步骤多，外源 DNA 污染严重而导致假阳性比例偏高，重复稳定性较差；b. 得到的差异片段多局限于 3' 端 100~500 bp 大小范围，且多为 3' 非编码区；c. 必须采用放射性同位素标记反应，使得实验周期长、成本高、易造成同位素污染，且不好回收差异片段。基于上述原因，Sokolov^[5]建立了通过琼脂糖凝胶电泳分辨差异基因并得到 1.08 kb 的差异片段。尽管该技术快速、简单，但我们发现琼脂糖凝胶电泳显示扩增产物一般只有 10~15 条，若改用银染测序胶电泳，能分辨的扩增带可达 60~100 条，显然，琼脂糖凝胶电泳的灵敏度和分辨率远远不够。本研究对此作了进一步的改进：a. 改用银染测序胶电泳进行差异片段的分析，不仅避免使用放射性同位素所造成的污染问题，而且分辨率和灵敏度大大优于琼脂糖电泳结果；b. 用 Ready-To-Go RT-PCR 珠和 RAPD 珠进行 DDRT-PCR，减少外源污染和加样误差，从而使反应的准确性和重复性显著提高；c. 用 6mer 随机引物替代锚定引物 Oligo d (T) NMN 进行逆转录，使得此后的 PCR 反应不会因含有与反转录相同的引物而增加差异表达的背景，且合成的 cDNA 不局限于 mRNA 的 3' 端，扩增片段长度也明显增加。

DDRT-PCR 技术包括两大酶学反应过程，即逆转录和随机 PCR 扩增。逆转录过程中需要特别留意防止 RNA 的降解，以及防止外源 DNA 的污染。Ready-To-Go RT-PCR 珠是将逆转录反应所需的各种成分制成室温稳定的反应珠，并分装成单独的小管保存，操作时只需加入 mRNA 模板，引物和水，从而减少加样次数、RNase 和外源 DNA 的污染。随机 PCR 扩增由于是在较低退火温度下进行，所以必须严防污染，并要保证其重复性。用 Ready-To-Go RAPD 珠进行 cDNA 的随机扩增，该珠同样提供了 PCR 反应所需的各种试剂（dNTPs, BSA 和缓冲液），并且含有两种热稳定的聚合酶（Taq DNA polymerases and Stoffel fragment），与单独使用其中一种聚合酶相比，在反应中混合使用两种不同的热稳定聚合酶不仅扩增片段的长度较大，且图谱复杂，条带清晰，无弥散现象，明显优于单一聚合酶的扩增效果。同样，唯一必需加进反应中的试剂是引物和模板，因而扩增效果和重复性很高。使用该系统完全可以保证阴性对照无扩增带，

这在 DDRT-PCR 研究中一般较难达到. 为了快速鉴定真正表达差异的基因, 本研究选用反向 RNA 印迹技术, 不仅简单易行, 且实验周期明显缩短, 费用显著减少. 二次扩增后的 12 个差异片段经反向 RNA 印迹鉴定, 有 6 个片段在 3~5 周龄间存在差异.

3.2 分离人胚发育早期差异表达基因的意义

胚胎早期是细胞生长, 分化和发育最旺盛时期, 基因处于高度活化状态, 其发育、分化及相关疾病的研究一致吸引着众多科学家的注意. 因此, 分析不同发育阶段 mRNA 表达是研究胚胎发育分化的关键, 应用各种方法分离差异表达基因, 对于阐明胚胎发育的内在机制具有重要意义. 尽管小鼠是一种很好的模型, 对于我们认识哺乳类动物早期胚胎发育提供了很多信息, 但它与人类必然存在着差异. 因此, 要想深入准确地了解早期人胚胎发育的分子机制, 必须以人胚胎为材料入手. 然而, 由于取材等方面因素的限制, 迄今尚未鉴定出在人胚胎发育 3~5 周龄阶段特异表达的基因. 本文首次将 DDRT-PCR 技术应用于受精后 3~5 周龄人胚差异表达基因的分离, 并发现多数差异基因在 3~4 周龄不表达, 但在 5 周龄有表达. 本研究结果不仅为人类基因组物理图谱和基因表达图谱的构建提供新的表达序列标签 (expressed sequenced tags, ESTs), 而且对这些基因的深入研究将可能为从分子水平阐明胚胎发育、分化及某些生理功能奠定基础.

致谢 感谢西北农业大学王智新硕士参与本研究工作.

参 考 文 献

- 1 Acampora D, Esposito M, Faiella A, *et al.* The HOX gene family. *Nucleic Acids Res*, 1989, **17** (24): 10385~10402
- 2 Davidson D R, Crawley A, Hill R E, *et al.* Position dependent expression of two related homeobox genes in developing vertebrate limbs. *Nature*, 1991, **352** (6334): 429~431
- 3 Liang P, Pardee A B. Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, **257** (5072): 967~971
- 4 Zimmermann J W, Schultz R M. Analysis of gene expression in the preimplantation mouse embryo: use of mRNA differential display. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (20): 9664~9671
- 5 Sokolov B P, Prockop D J. A rapid and simply PCR-based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22** (9): 4009~4015
- 6 Weaver K R, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M, *et al.* Isolation and cloning of DNA amplification products from silver-stained polyacrylamide gels. *BioTechniques*, 1994, **16** (2): 226~227
- 7 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by

acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162** (1): 156~159

- 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 Bauer D, Muller H, Reich J, *et al.* Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res*, 1993, **21** (18): 4272~4280
- 10 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
- 11 Miele G, MacRae L, McBride D, *et al.* Elimination of false positives generated through PCR re-amplification of differential display cDNA. *Biotechniques*, 1998, **25** (1): 138~144
- 12 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

Differential Expression Analysis of the Gene in Human Early Embryos Using a Modified DDRT-PCR. GOU De-Ming, LI Wen-Xin, JIANG Da-He, HUANG Jian (College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China).

Abstract PCR based method for differential display of eukaryotic mRNA has been designed to isolate differential expressed genes in various cell types or under different growing conditions. A modified method for mRNA differential display originally developed by Sokolov was employed and optimized here. This procedure, based on the application of Ready-To-Go RT-PCR beads and Ready-To-Go RAPD beads, minimized pipetting steps, decreased the potential for pipetting errors, reduced the risk of contaminating and ensured greater reproducibility between reactions. Distinct cDNA bands can be observed by silver-staining 6% sequencing urea gel and easily excised and recovered for further use in cloning. The stage-specific genes in the developing human embryos were analyzed with six sets of arbitrary primers using this modified DDRT-PCR from 3-, 4- and 5-week-old human embryos. About 14 bands containing differential fragments were obtained from silver-staining 6% polyacrylamide gel, six of which were proved to be developmental related genes by RNA reverse-Northern hybridization using [α - 32 P] dCTP labeled first strand cDNA as probes.

Key words human embryo, development, mRNA differential display, PCR