

一种用少量标本快速构建老年性白内障 消减 cDNA 文库的方法*

刘燕¹⁾ 周健¹⁾ 刘新平²⁾ 药立波²⁾ 王吉村²⁾ 苏景宽³⁾ 惠延年^{1)**}

(¹⁾第四军医大学西京医院眼科, 西安 710032; (²⁾第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032;

(³⁾第四军医大学唐都医院医教部, 西安 710032)

摘要 为从少量标本中获得含较大片段的、高质量的老年性白内障消减 cDNA 文库, 利用磁珠分离、生物素标记的改良消减杂交法获得差异 cDNA, 利用选择性 PCR 法扩增其中大片段差异 cDNA, 从而成功构建老年性白内障消减 cDNA 文库. 在文库中随机挑取的 22 个克隆中, 1 000 bp 以上的片段有 7 个, 占 31.8%, 750 bp 以上有 15 个, 占 68.2%. 所得 cDNA 片段较大, 可以满足下一步研究需要. 改良消减杂交法结合选择性 PCR 法可以从少量标本中快速有效地获得大片段高质量的消减 cDNA 文库.

关键词 改良消减杂交法, 选择性 PCR 法, 老年性白内障, 消减 cDNA 文库

学科分类号 R776.1, Q7

在构建消减 cDNA 文库时, 由于不同处理的两组经杂交后所形成的消减文库非常小, 而每一种基因的分子数又非常少, 因此要求起始阶段用大量样本或 mRNA, 利用 PCR 法对文库进行扩增又不可避免地优先扩增短的片段, 长的有意义的片段往往得不到扩增, 在下一步进行基因的克隆和鉴定时, 长片段因分子数过少得不到克隆而被丢失. 我们在利用赵忠良^[1]的改良消减杂交法构建消减 cDNA 文库时, 对此方法又进行了改进, 利用了选择性 PCR^[2]等方法, 用少量标本成功地构建了老年性白内障消减 cDNA 文库.

1 材料与方法

1.1 材料

皮质性老年性白内障晶体前囊膜 (来自白内障超声乳化术中环形撕囊) 20 例, 正常晶体前囊膜 (来自供角膜移植之眼球) 10 例, 取材后迅速冻于液氮中, 存于 -70℃ 待用.

mRNA 提取试剂盒 (Poly A Tract System 1000) (Promega 公司); Superscript 反转录试剂盒 (Gibco 公司); Sephacryl S-400 柱和链亲和素-磁珠 (Promega 公司); Biotin-dUTP 和 KlenTaq 酶 (Clontech 公司); LaTaq 酶和 pMD18-T 载体 (TAKARA 公司); 胶回收试剂盒 (Gibco 公司); EcoR I 和 BamH I 酶 (华美公司); 琼脂糖 (Sigma 公司); DH-5 α 感受态细胞由本实验室自制, 引物由赛百盛公司合成, PCR 仪 PE2400 购自

PE 公司.

1.2 方法

1.2.1 mRNA 提取与反转录: 取皮质性老年性白内障晶体前囊膜 20 例 (20 mg), 正常晶体前囊膜 10 例 (20 mg), 用 mRNA 提取试剂盒提取 mRNA, 经定量, 确认所提 mRNA 符合要求. 反转录时, 实验组 (即白内障组) 按 Cap-finder 方法进行反转录, 反转录时采用带锚定序列的反转录引物, 序列为 5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAG-TACT₍₃₀₎N₋₁N-3', 使其在反转录时在 cDNA 3' 端引入锚定序列. 同时在反应体系中加入根据 5' GGG 帽结构设计的 5' 锚定引物, 序列为 5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGG-3', 使其在反转录时在 cDNA 5' 端引入锚定序列. 3' 和 5' 的锚定序列是完全相同的, 这样在后续的 PCR 扩增中只需用一条引物, 5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3', 反转录酶为无 RNA 酶 H 活性的 SuperscriptTM II. 扣除组 (即正常组) 用普通反转录方法反转录.

1.2.2 扣除探针的制备: 将正常组 cDNA 进行 PCR 扩增, 扩增体系中掺入生物素 (biotin) 标记的 dUTP, 使每一条 cDNA 链都带有生物素标记的 dUTP, 从而制成扣除探针. 扩增体系: 100 μ l 中,

* 国家自然科学基金资助项目 (30000185).

** 通讯联系人.

Tel: 029-3375371, E-mail: HuiYN@fmmu.edu.cn

收稿日期: 2002-05-27, 接受日期: 2002-06-28

dNTP 0.25 nmol/L, 10-mer 随机引物 0.02 g/L, oligo dT₍₁₈₎ 0.02 g/L, biotin-dUTP 0.02 mmol/L, 正常组 cDNA 1 μL, Taq 酶 1 U. 扩增条件: (95 °C 20 s, 40 °C 5 min, 72 °C 3 min) × 40 循环.

1.2.3 杂交: 取实验组 cDNA 5 μL, 扣除组 cDNA 60 μL, 在 6 × SSC, 0.5% SDS 中, 经 65 °C 杂交 18 h.

1.2.4 杂交后产物的纯化: 将杂交后液过 Sephacryl S-400 柱, 以除去盐和小片段. 过柱液经磁珠分离, 以除去杂交体和未杂交的扣除探针. 留上清, 即为目的产物——未杂交上的白内障组 cDNA.

1.2.5 差异 cDNA 的选择性 PCR 扩增: 先做第一轮扩增. 以上述上清液为模板, 50 μL 体系中, 含上清液 41 μL, dNTP 0.25 mmol/L, KlenTaq 酶 0.5 U, 引物 0.4 μmol/L, 引物序列为 5'-AAGCA-GTGGTAACAACGCAGAGT-3'. 扩增条件: (95 °C 15 s, 68 °C 5 min) × 25 循环, 72 °C 延伸 20 min.

取第一轮扩增产物进行 1% 琼脂糖胶电泳, 切下小于 750 bp 的片段, 用相同电压进行反向电泳, 使大于 750 bp 的剩余部分浓缩, 当溴酚蓝离加样孔很近时, 样品中大于 750 bp 的剩余部分就浓缩得很好了. 切下浓缩部分, 用 Gibco 公司的胶回收试剂盒回收 cDNA 并溶于 20 μL 水中, 取 9 μL 回收产物进行第二轮 PCR, 体系同第一轮 PCR, 所用酶为 TAKARA 公司的 LaTaq 酶, 30 个循环.

1.2.6 PCR 产物加“A”: 第二轮 PCR 结束、72 °C 延伸 20 min 后, 先不关闭 PCR 仪, 取出样品置冰上, 加 dATP (10 mmol/L) 3 μL, Taq 酶 0.5 μL, 72 °C 10 min 完成加“A”.

1.2.7 加“A”产物的纯化: 利用酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀法, 纯化产物溶于 10 μL 水中.

1.2.8 cDNA 的克隆: 取纯化产物 6.9 μL, 加入 pMD18-T 载体 0.6 μL, solution I 7.5 μL, 16 °C 连接过夜, 70 °C 加热 30 min, 将连接产物全量转化入 DH-5α 感受态细胞中, 铺氨苄板过夜.

1.2.9 克隆的酶切鉴定: 随机挑取 22 个克隆, 摇菌扩增后用煮沸法提质粒, 用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切, 琼脂糖电泳鉴定有无插段以判断文库的质量.

2 结果与讨论

2.1 关于改良的消减杂交法

改良的消减杂交法是我校生化教研室赵忠良博

士建立的. 其原理是利用磁珠分离提取 mRNA, 反转录时实验组利用 mRNA 的 3' poly (A) 尾和 5'-GGG 帽子结构, 分别在反转录时在 cDNA 两端加上序列相同的锚定引物, 对扣除组 cDNA 进行随机引物 PCR 扩增同时掺入生物素, 制成生物素标记的扣除探针. 两组进行杂交, 用磁珠吸附掉杂交体和未杂交上的扣除探针, 得到实验组独有的 cDNAs, 再用锚定引物将其扩增并克隆. 该方法较代表性差异分析技术^[3]和抑制消减杂交^[4]有两点改进之处: 一是在反转录时将实验组 cDNA 的两端分别引入锚定序列, 这不仅有利于杂交后差异基因的扩增和克隆, 而且有利于获得全长或较长的 cDNA 片段; 二是扣除探针中掺入生物素, 这样利用生物素与亲和素结合的特征, 就可以将杂交混合物中的杂交体和未杂交上的扣除组成分去掉. 实践证明, 该方法具有简便易行、快捷的特征.

2.2 克隆的酶切鉴定

随机挑取 22 个克隆酶切鉴定结果如图 1, 显示: 1 000 bp 以上的片段有 7 个, 占 31.8%, 750 bp 以上的片段有 15 个, 占 68.2%. 较单纯应用改良消减杂交技术的同类研究^[5], 大片段比例有提高.

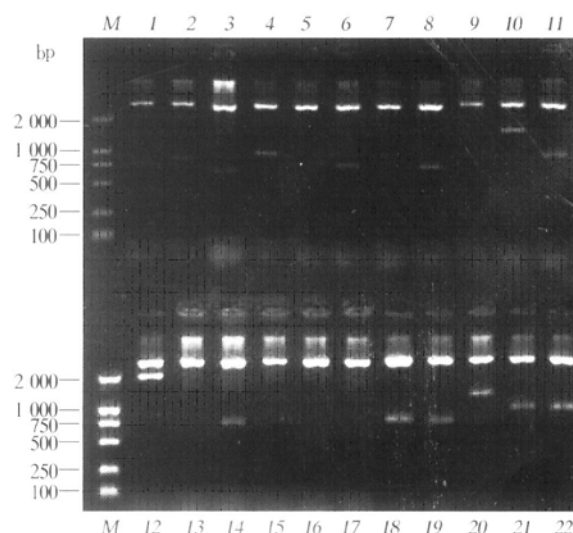


Fig 1 Identification of the clones with inserted fragments by restriction enzymes digestion

M: DL2000 marker; 1~ 22: different clones.

由于杂交后的差异 cDNA 混合液中每一种基因的分子数非常少, 下一步进行克隆以及鉴定非常困难, 需要将差异 cDNA 进行 PCR 扩增. 但 PCR 过程中往往优先扩增短的片段, 而长的有意义的片段往往得不到扩增, 在下一步的连接、转化中, 有意

义的大片段的克隆将很难得到。为了解决这个问题,我们参考了 Jepson 等^[2]的方法,采用选择性 PCR 法:第一轮 PCR 扩增时,采用 Clontech 公司的 Klen-Taq 酶,以保证 PCR 过程的忠实性,减少突变。电泳后切去小的片段,并进行反向电泳,使 DNA 片段浓缩,减少胶块使胶回收过程中效率提高。第二轮 PCR 时使用 TAKARA 公司的 La-Taq 酶,并在 PCR 结束时单独加“A”(72℃ 10 min),以保证 cDNA 分子末端都带上“A”,利于以后的连接。另外,第二轮 PCR 结束后,PCR 产物的纯化采用酚-氯仿抽提纯化而不用胶回收,一方面是为了提高回收效率,另一方面以防止胶回收过程中末端“A”的丢失从而影响连接效率。由于正常人晶体囊膜较难获得,故本实验所用样本量较少,仅 20 mg,但所建消减 cDNA 文库质量仍较高,可以满足下一步研究需要。

实践证明,应用改良的消减杂交结合选择性 PCR 法,方法稳定,重复性好。而且,该方法还简便快捷,从 mRNA 的提取到消减文库构建完成,

最快可在一周内完成。对标本量少或 mRNA 量少的也可以有效地获得高质量的消减 cDNA 文库。对于标本珍贵较难获得的一些实验,此方法不失为一种快速有效的方法。

参 考 文 献

- 1 Zhao Z L, Huang X, Li N, *et al.* Direct cloning of cell differential expression genes with full-length by a new strategy based on the multiple rounds of 'long distance' polymerase chain reaction and magnetic beads mediated subtraction. *J Biotechnol*, 1999, **73** (1): 35~ 41
- 2 Jepson I, Bray J, Jenkins G, *et al.* A rapid procedure for the construction of PCR cDNA libraries from small amounts of plant tissue. *Plant Mol Biol Rep*, 1991, **9**: 131~ 138
- 3 Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science*, 1993, **259** (509): 946~ 951
- 4 Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, *et al.* Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (12): 6025~ 6030
- 5 王吉村, 药立波, 吕厚山, 等. 用改良消减杂交筛选类风湿性关节炎滑膜细胞中高表达基因. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, **17** (2): 244~ 249
Wang J C, Yao L B, Lu H S, *et al.* *Chin J Biochem Mole Biol*, 2001, **17** (2): 244~ 249

A Rapid Procedure for The Construction of Subtractive cDNA Library of Age-related Cataract From Small Amounts of Sample*

LIU Yan¹⁾, ZHOU Jian¹⁾, LIU Xir-Ping²⁾, YAO Li-Bo²⁾,
WANG Ji-Cun²⁾, SU Jing-Kuan³⁾, HUI Yan-Nian^{1)**}

⁽¹⁾ Department of Ophthalmology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

⁽²⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

⁽³⁾ Department of Science Reserch, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract In order to obtain a quality subtractive cDNA library of age-related cataract which contains more large fragments from small amounts of sample, an improved subtractive hybridization which using magnetic beads isolation and biotin labelling was used to obtain the subtractive cDNA. Then the large fragments of the subtractive cDNA were amplified by using selective PCR method, so the subtractive cDNA library of age-related cataract was successfully constructed. 22 clones of the library were selected at random and were identified by the restriction enzymes digestion. 7 fragments were larger than 1 000 bp, which is 31.8% of the totals, 15 fragments were larger than 750 bp, which is 68.2% of the totals. The cDNA fragments are larger and can be used in further study. A subtractive cDNA library with high quality and more large fragments can be constructed rapidly and effectively by improved subtractive hybridization and selective PCR method from small amounts of sample.

Key words improved subtractive hybridization, selective PCR, age-related cataract, subtractive cDNA library

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30000185).

** Corresponding author. Tel: 86-29-3375371, E-mail: HuiYN@fmmu.edu.cn

Received: May 27, 2002 Accepted: June 28, 2002