

- 5 Duenas M, Borrebaeck C A K. *Bio/Technology*, 1994; **12**: 999
- 6 McCafferty J, Griffiths A D, Winter G *et al.* *Nature*, 1990; **384**: 552
- 7 Altling-Mees M A, Short J M. *Gene*, 1993; **137**: 93
- 8 Folgori A, Tafi R, Meola A *et al.* *EMBO J*, 1994; **13**: 2236
- 9 Crowe J E, Murphy B R, Chanock R M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; **91**: 1386
- 10 Jiang W R, Bonner T R, Venugopal K *et al.* *Virology*, 1994; **200**: 21
- 11 Goodson R, Doyle M V, Kaufman S E *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; **91**: 7129
- 12 Pardo L, Baliesteros J S, Osman R *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89**: 4009
- 13 Kenan D J, Tsai D E, Keene J D. *Techniques*, 1994; **19**: 57
- 14 Zouali M, Hansen D E. *TIBTECH*, 1994; **12**: 73
- 15 Morrison S L. *Ann Rev Immuno*, 1992; **10**: 239
- 16 Gololodov G V, Chernova E A, Schourov D V *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; **92**: 254
- 17 Hiatt A C, Cafferkey R, Bowdish K. *Nature*, 1989; **342**: 76
- 18 Burton D R, Barbas III C F, Lerner R A. *Science*, 1995; **13**: 255
- 19 Pack P, Kujau M, Schroeck V *et al.* *Bio/Technology*,

1993; **11**: 1271

- 20 Ridder D R, Schmitz R, Legay F *et al.* *Bio/Technology*, 1995; **13**: 255

The Development and Future of Antibody Library. Wang Xue, Wang Haitao (*Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China*).

Abstract The development of antibody library has opened an effective way to produce human monoclonal antibodies. Although the antibody library technology came out only a few years ago, its selection system has been improved greatly, and now monoclonal antibodies with various uses can be screened from antibody libraries rapidly. This technology eliminates some limitations of traditional hybridoma methods. The development and future of antibody library was reviewed.

Key words antibody library, monoclonal antibody, phage antibody

运用差异展示分离特异性表达的基因

孙 涛 刘雪丰

(中国医学科学院实验动物研究所, 北京 100021)

摘要 在高等生物中含有约 100 000 个不同的基因, 其中仅有 15% 的基因在任何个体细胞中均表达. 因此分离特异的目的基因便显得十分重要. 差异展示是通过部分扩增 mRNA 的逆转录产物、经测序胶电泳, 分离到差异性表达的基因. 它与消减杂交相比是分离特异表达基因的更有效的手段. 虽然这种方法在实际运用中存在着这样或那样的困难, 但随着对这种技术的不断改进, 它将会有越来越广泛的用途.

关键词 差异展示, 分离, 特异表达的基因

分离特异的目的基因一直是人们关注的问题. 在高等生物中一般含有 100 000 个不同的基因, 而仅有约 15% 的基因是在任何个体细

胞中均表达的^[1]. 因此在胚胎发育中, 不同

分化时相特异表达基因的筛选^[2]、调控细胞周期的特异目的基因的分离^[3]，在成体中具有器官表达特异性的基因的克隆^[4]就显得十分重要。此外在肿瘤细胞中差异性表达的基因的筛选^[5]、确定由于癌基因的异常表达所抑制的正常基因^[6]，以及在肿瘤细胞转化过程中特异性表达基因的分离^[7]，均需要有一套成熟的分离目的基因的技术。

1992年，Liang和Pardee^[1]通过部分扩增mRNA的逆转录产物，然后经测序胶(sequencing gel)电泳，分离到差异性表达的基因。这就是差异展示(differential display)。它是比消减杂交更有效的检测和克隆特异性目的基因的手段。

差异展示是提取不同个体、不同器官或不同细胞来源的mRNA，经过逆转录合成cDNA。以此为模板经PCR扩增，得到能在测序胶上分辨的条带。因测序胶只能分离500 bp以下的条带，因此对PCR扩增时引物选择便有一定的要求。Liang等采用了两种引物：一类是3'端的固定引物(anchor primer)。mRNA 3'端含有约250 bp的poly(A)尾，Liang等设计了引物5'-T11CA使其仅扩增poly(A)上游区5'-TG的序列，并仅扩增11个A。另一类是5'端的随机引物(arbitrary primer)，其含有9~10个碱基，保证了其尽可能扩增出poly(A)尾上游区500 bp内的cDNA片段。来自不同组织或细胞的cDNA，通过同样条件的PCR扩增，经测序胶电泳便可以分离到差异片段。以此为探针，经RNA印迹可分离到差异性的mRNA片段。通过测序及在Genebank中检测，可以确定是否为特异性表达的基因。因此差异展示为展示细胞mRNA的组成、某一特异性表达基因的克隆及新的目的基因的分离提供了有效的手段^[1]。

但实际上，应当有12种3'端的固定引物(在poly(A)前面的两个碱基除NA以外有12种组合)，才能包括poly(A)尾上游区的两种碱基的全部可能性。它们是5'-T11AA, AC, AG, AT, CA, CC, CG, CT, GA,

GC, GG, GT^[8]。同时为了扩增出poly(A)尾上游区500 bp以内的所有可能性的mRNA序列，应有20种10个碱基长度的随机引物^[1]。

差异展示的方法建立以后，也做了很多改进。如改进PCR扩增条件，以提高扩增效率^[9]；采用荧光标记代替同位素标记，改善了操作的安全性，也提高了差异展示的分辨率^[10]；更主要的是在PCR扩增中，优化了引物的设计^[2,11]，从而提高了分离特异表达新基因的可能性。

差异展示与消减杂交比较起来具有很多优点。首先差异展示分离特异基因的速度远远快于消减杂交。在国外一个较完善的实验室，采用消减杂交的方法，从mRNA的提取，cDNA文库的构建，到消减杂交特异片段的筛选要两个月。而采用差异展示，仅需要7~10 d^[1]。其次，因为差异展示运用了PCR扩增技术，仅需要微量的mRNA，这使克隆极低表达量的基因成为可能。着床前胚胎发生过程中基因表达的研究一直因没有成熟的实验方法而无法进行，运用差异展示的方法，可以分析从二细胞期到囊胚期的胚胎发生过程中基因表达的情况^[12]。另外，差异展示是通过测序胶比较mRNA间的差异，因此可以比较两种以上的不同来源的mRNA^[13]，而不像消减杂交仅能消减两种不同的mRNA。

尽管差异展示有这些优点，但它依然存在着一一些问题。例如要想获得mRNA的全部片段，必须有20个10碱基长度的随机引物和12个固定引物也就是有240种随机的组合。由此看来，工作量还是相当大的。其次，从测序胶上分离出差异性片段，在技术上存在很大的困难，经常出现错误的分离^[13]。

可喜的是，Liang等^[14]又对这一技术做了进一步改进。第一，在3'端固定引物的设计上，变两个碱基固定的oligo-dT引物为一个碱基固定的oligo-dT引物。这样，3'端固定引物仅用三种即可。它们是5'T12G、5'T12C和5'T12A。与两个碱基固定的oligo-dT引物相比，

一个碱基固定的 oligo-dT 引物减少了每个 mRNA 样品对逆转录反应种类的需要, 把由于引物的简并性引起的某些 RNA 的代表性差和 RNA 数量过多的现象降低到最低程度. 第二, 在固定和随机引物的 5' 末端引入限制性内切酶识别位点. 使在克隆后的 cDNA 扩增易于操作. 同时, 由于引物变长, 使 cDNA 的扩增更有效. 随着这种方法的不断完善和简化, 其在肿瘤学、心血管疾病研究、胚胎发生、细胞分化等领域的应用, 将会越来越广泛.

参 考 文 献

- 1 Liang P, Pardee A B. *Science*, 1992; **57**: 967
- 2 Donohue P J, Alberts G F, Guo Y *et al.* *J Biol Chem*, 1995; **270** (17): 10351
- 3 Bauer D, Muller H, Reich J *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1993; **21** (18): 4272
- 4 Marechal D, Forceille C, Breyer D *et al.* *Anal Biochem*, 1993; **208**: 330
- 5 Shinoura N, Shamraj O I, Hugenholz H *et al.* *Cancer Lett*, 1995; **89** (2): 215
- 6 Frankfort B J, Gelman I H. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995; **206** (3): 916
- 7 Blok L J, Kumar M V, Tindall D J. *Prostate*, 1995; **26** (4): 213
- 8 Mou L, Miller H, Li J *et al.* *Biochem Biophys Commun*, 1994; **199** (2): 564
- 9 Callard D, Lescure B, Mazzolini L. *Biotechniques*, 1994; **16** (6): 1096
- 10 Ito T, Kito K, Adati N *et al.* *FEBS Lett*, 1994; **351**: 231

- 11 Liang P, Averboukh L, Pardee A B. *Nucleic Acids Res*, 1993; **21** (14): 3269
- 12 Zimmermann J W, Schultz R M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; **91**: 5456
- 13 Lohmann J, Schickle H, Bosch T C G. *Biotechniques*, 1995; **18** (2): 200
- 14 Liang P, Zhu W, Zhang X *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1994; **22** (25): 5763

Isolate Specifically Expressed Genes by Differential Display. Sun Tao, Liu Xuefeng (*Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China*).

Abstract There are about 100 000 different genes in higher organisms, and only 15% of them are expressed in any individual cell. Thus it is very important to isolate specific genes. Comparing with subtractive hybridization, differential display is a more effective approach to isolate specifically expressed genes. In differential display, reverse transcribed products of mRNA are amplified and displayed on sequencing gel. Then differentially expressed genes are isolated. Although there are many difficulties in using this method, as further improved, it will be useful in various fields.

Key words differential display, isolate, specifically expressed gene

诱导免疫应答的一种新手段 ——基因免疫

雷章恒 潘星华 傅继梁

(第二军医大学医学分子生物学开放实验室, 上海 200433)

摘要 近年来, 一种诱导免疫应答的新手段——基因免疫, 正在引起人们越来越多的关注. 所谓基因免疫, 是将含有编码序列及必要表达调控元件的质粒 DNA, 直接导入动物组织, 经诱导动物免疫系统对编码序列所表达的蛋白质发生免疫应答, 达到免疫的目的. 文章介绍了基因免疫的基本方法, 综