

降低差异显示-PCR 假阳性和提高重复性的几种策略

肖华胜 黄文晋

(第四军医大学神经科学研究所, 西安 710032)

摘要 简要介绍了几种提高 mRNA 差异显示重复性和降低假阳性的策略。mRNA 差异显示技术从建立时起就引起了科学家的广泛兴趣, 是克隆不同生理或病理过程中差异表达基因的一种高灵敏度、简单、有效的方法。但 mRNA 差异显示因其假阳性率高和重复性低, 限制了其在生命科学中的应用。

关键词 mRNA, 基因表达, 聚合酶链反应

学科分类号 Q522.2, Q781

1992 年, Liang 和 Pardee 建立了真核生物 mRNA 差异显示技术, 其基本原理是利用了一套寡核苷酸引物, 结合 RT-PCR 反应来分析不同生理或病理过程中基因表达的变化, 并克隆差异表达基因^[1]。因其操作简便、快速, 且能同时进行两组或两组以上样品的分析、比较, 所以引起了科学家的极大兴趣。但因其假阳性率偏高, 重复性低而限制了其在生命科学领域的应用, 到目前为止, 还没有几个感兴趣的基因被克隆。经过许多科学家的努力, 针对 mRNA 假阳性率高, 重复性低而进行了一些技术上的改进。

1 高质量的总 RNA 是降低假阳性率的前提

DDRT-PCR 是以细胞或组织的总 RNA 为模板, 模板质量的好坏直接关系到 DDRT-PCR 的成败。在提取 RNA 时, 首先要保证 RNA 的完整性, 不被 RNase 降解, 经过变性琼脂糖电泳检测, 28 S 带的亮度应是 18 S 带的两倍, 表明 RNA 未被降解。其次, RNA 要不受 DNA 污染, 如有 DNA 污染, 在 PCR 扩增过程中, 优先扩增 DNA, 造成假阳性和背景。提取的 RNA 须用无 RNase 的 DNase I 消化, 去除痕量的 DNA 污染。在实验中可设立一个不加反转录酶的反应来检验 DNA 是否去除干净。

2 引物的改进提高了 DD-PCR 的重复性

Liang 和 Pardee 在设计 mRNA 差异显示的引物时, 其 5' 端为 10 个碱基的武断引物, 3' 端为 5' T₁₁MN3' (M = A、C、G, N = A、C、G、T) 的锚定引物, 有 12 个组合, 后又有人将 3' 端改为 5' T₁₁M3' (M = A、C、G), 按其原理, 应该扩增 poly

(A) 尾上游的部分编码区或非编码区基因片段。而实际上经常会发现, 扩增产物的两端都用了武断引物, 而没有利用 3' 端锚定引物。究其原因, 可能是: 第一, G/C 之间的相互作用比 A/T 之间的相互作用强, 武断引物中 G/C 含量为 50% ~ 60%, 武断引物同基因的结合能力比 oligo-dT 锚定引物的结合力强, 所以优先扩增的产物为两端都是武断引物; 第二, 在基因的 3' 端非编码区通常是 A/T 富含区, 武断引物互补配对的几率就少, 因而, oligo-dT 锚定引物/武断引物扩增的产物比预期的少。Daniel 等^[2]针对这一问题, 设计了 A/T 含量在 60% ~ 80% 的合理引物 (rational primer), 设计的三条引物为: UTR-10: c/gTTc/gTTTc/gTTTc/g; UTR-11: gTAc/gc/gTc/gc/gATTTA; UTR-12: CATTGTTATATTA。将这三条合理引物 (rational primer) 同 oligo-dT VG 引物组合进行 PCR 扩增。测序结果表明, 所有克隆的基因片段的两端都为合理引物/oligo-dT 引物。这种引物设计方法大大降低了两端都为武断引物扩增产物的比例, 但所扩增的片段几乎都是 3' 端非编码区, 获取的信息较少。

3 降低 dNTP 浓度

常规 PCR 反应中, dNTP 的终浓度通常为 200 μmol/L, 在 DD-PCR 反应中, 如 dNTP 浓度过高, 一是降低扩增的特异性, 二是不利于同位素的掺入。已有的研究表明, 将 dNTP 的终浓度降低到 2 μmol/L 在保证产物产量和特异性的前提下, 能最大限度地提高同位素的掺入率, 从而提高序列胶的分辨率。

4 选择最适的反转录和 PCR 退火温度

反转录酶的最适温度通常在 37 °C 和 48 °C 之间, 如采用 T₁₁MN 作为反转录引物, 可采用 42 °C. 采用较低的反转录温度有利于引物和模板的配对, 但不利于模板二级结构的解开, 合成的 cDNA 第一链偏短. 我们在实验中作了一些改进, 先在 42 °C 反转录 30 min, 再在 48 °C 反转录 30 min, 这有利于解开模板的二级结构, 合成成长的 cDNA.

PCR 扩增时的退火温度是决定 PCR 扩增特异性的关键因素之一. DD-PCR 如采用武断引物时, 常采用 42 °C 可得到数量和产量以及特异性都会令人满意的扩增产物. Khushbeer 等^[3] 在实验中发现. 在同一复性温度下, 不同的武断引物和锚定引物组合, 扩增出的条带数目不同. 如 T₁₁CG、T₁₁CC、T₁₁GG、T₁₁GC 与不同的武断引物组合, 在 42 °C 条件下能得到较多的致密条带, 而 T₁₁CA、T₁₁GA、T₁₁AC 同武断引物组合, 则得到较少的带. 然而, 当复性温度降至 40 °C, 则得到 2 倍数量的带. T₁₁AA 和 T₁₁AG 同任何武断引物组合, 在 40 °C 和 42 °C 都得到较少的带. Chapman 等^[4] 发现, 在 40 °C 的复性条件下, T₁₁GC、T₁₁GG、T₁₁AC、T₁₁CA, 可获得大量的 cDNA 条带. 同样在 40 °C 的复性条件下, Mou 等^[5] 则发现 T₁₁GA、T₁₁AG、T₁₁GC、T₁₁GG、T₁₁AC、T₁₁CG 可得到较多的致密带. 从这些结果可以总结出, 在锚定引物中, 有一个或两个 G, 其扩增效率比 C 和 A 高.

5 设立重复对照降低假阳性率

DDRT-PCR 是在锚定引物和 AMV 作用下转录成 cDNA, Sung 等^[6] 在反转录时, 用两种不同的反转录酶进行反转录平行实验, 很容易区分出 RNA 制备过程中造成的假阳性.

在 PCR 扩增过程中, DNA 聚合酶的质量直接决定扩增的结果好坏. 在预实验中, 可以试几个不同公司的 DNA 聚合酶, 同一反转录产物做两次平行 PCR 扩增, 如电泳后两平行管的 cDNA 带型和数目都一致. 则表明 DNA 聚合酶的质量尚可. 在 DDRT-PCR 中, 通常都进行两次平行扩增, 选取两个反应都同时出现的差异表达带, 则可大大降低假阳性率.

6 展 望

mRNA 差异显示技术从建立到现在, 尽管在生

命科学各个领域里受到重视, 得到了较为广泛的应用, 但其致命的弱点是假阳性率高, 重复性低, 限制了其在克隆差异表达基因的应用. 经过近几年的研究, 在提高重复性, 降低假阳性方面已有所改进. 尤其最近两年, mRNA 差异显示试剂盒的商品化, 为 mRNA 差异显示提供了成套试剂, 高分辨率的 DNA 测序仪的研制成功, 为 mRNA 差异显示提供了强有力的研究工具. 随着假阳性率的降低, 重复性的提高, mRNA 差异显示将会越来越广泛地应用于生命科学的研究, 将会有越来越多感兴趣的基因被克隆.

参 考 文 献

- 1 Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, **257** (5072): 967~ 971
- 2 Daniel G, Amanda G F, Matthias M. Rational primer design greatly improves differential display-PCR (DD-PCR). *Nucleic Acids Research*, 1997, **25** (11): 2239~ 2240
- 3 Khushbeer M, Lisa F, Walter C M, *et al.* Interaction and effect of annealing temperature on primers used in differential display RT-PCR. *Nucleic Acid Res*, 1998, **26** (3): 854~ 856
- 4 Chapman M S, Qu N, Pascoe S, *et al.* Isolation of differentially expressed sequence tags from steroid responsive cells using mRNA differential display. *Mol Cell Endocrinol*, 1995, **108** (1): 1~ 7
- 5 Mou L, Miller H, Li J, *et al.* Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **199** (4): 564~ 569
- 6 Sung Y J, Denman R B. Use of two reverse transcriptases eliminates false positive results in differential display. *Biotechniques*, 1997, **23** (3): 462~ 464

Several Strategies to Reduce False Positive of DD-PCR and Improve Its Reproducibility. XIAO Hua Sheng, HUANG Wen Jin (*Institute of Neurosciences, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China*).

Abstract Differential display PCR (DD-PCR) has attracted widespread interest since it was established. It is a sensitive, simple and powerful method to clone differentially expressed gene fragment in different courses of physiology and pathology. But the main drawback of differential display is high false positive and low reproducibility. This restricted its application in life science. Several strategies to reduce false positive of differential display and improve its reproducibility was reviewed briefly.

Key words mRNA, gene expression, polymerase chain reaction