

## 技术与方法

## 大鼠脑 cDNA 文库的构建\*

宋学文 赵 崇 周 仁<sup>1)</sup> 郭善一<sup>2)</sup> 张镜宇

(天津医科大学内分泌研究所, 天津 300070)

**摘要** 采用简单高效的 cDNA 合成技术制备 Wistar 大鼠脑 cDNA 基因文库。以纯化的 poly(A)<sup>+</sup>-RNA 为模板, 含 Not I 切点的 oligo-(dT)15 为引物, 在反转录酶的作用下, 合成第一股单链 cDNA; 用 *E. coli* RNase H 除去模板 RNA, 并以 *E. coli* DNA 聚合酶 I, *E. coli* DNA 连接酶和 T4 DNA 聚合酶催化合成 cDNA 第二条链, 即成为双链 cDNA; 此双链 cDNA 除 0.5  $\mu$ g 用于插入 pSPORT I 载体, 转入 *E. coli* DH 5 $\alpha$ , 建成 cDNA 文库外, 其余保存在 -20 $^{\circ}$ C, 以此 cDNA 为模板, 应用 PCR 方法, 先后克隆了谷氨酸脱羧酶 (GAD, 1800 bp)、神经元特异性烯醇化酶 (NSE, 1340 bp), 甲状腺激素受体 (T3-receptor, 1230 bp)、胆囊收缩素 (CCK, 345 bp) 的全编码基因。

**关键词** Wistar 大鼠脑, cDNA 文库, 聚合酶链式反应, 分子克隆

大鼠以其许多独特优点被作为研究人类疾病的应用最广泛的实验动物。为了在分子水平上对其各基因进行研究, 我们构建了 Wistar 大鼠脑 cDNA 文库来克隆所需目的基因, 为搞清许多疾病的发病机制提供了有力的工具。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Wistar 大鼠为本校饲养, 逆转录酶、*E. coli* DNA 聚合酶 I、*E. coli* DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶、硫氰酸胍等均为 BRL 公司产品, oligo-(dT)(寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸)纤维素, 焦碳酸二乙酯, 十二烷基肌苷酸为 Sigma 公司产品,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 购自北京福瑞公司, PCR 试剂盒及 DNA 扩增仪为 Perkin Elmer Cetus 公司产品, PCR 引物由中国科学院微生物研究所合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 总 RNA 的提取:** 按 Chomczynski 等<sup>[1]</sup>的一步法进行。

**1.2.2 信使 RNA (poly(A)<sup>+</sup>-RNA) 的纯**

化: 按 Jacobson<sup>[2]</sup>的纤维素亲和层析法进行。

**1.2.3 cDNA 的合成:** 按 Gubler 等<sup>[3]</sup>的方法进行。经碱性凝胶电泳及放射自显影显示逆转录效果。逆转录产物经酚-氯仿-异戊醇抽提, 乙醇沉淀, 真空干燥后, 除取 0.5  $\mu$ g 插入 pSPORT I 载体并转入 *E. coli* DH 5 $\alpha$  构建文库外, 其余置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.2.4 NSE、T3-receptor、GAD、CCK 全编码序列的 PCR 扩增:** 神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE) 和甲状腺激素受体 (thyroid hormone receptor, T3-receptor) 的扩增按赵崇等<sup>[4,5]</sup>的方法。谷氨酸脱羧酶 (glutamic acid decarboxylase, GAD) 和胆囊收缩素 (cholecystokinin, CCK) 的扩增均取上述保存备用的未克隆的建库材料 dsDNA 10 ng 作为模板, 以合成的寡核苷酸为引物, 用 100  $\mu$ l 反应体系进行 PCR 扩增。变性, 复性及

\*天津市 21 世纪青年科学基金资助项目。

<sup>1)</sup>天津医科大学总医院内分泌科, 天津 300070。

<sup>2)</sup>天津医科大学代谢病中心, 天津 300070。

收稿日期: 1995-04-07, 修回日期: 1995-09-07

链延伸的温度和时间为 GAD (92℃, 1 min; 58℃, 1 min 及 72℃, 3 min); CCK (92℃, 30 s; 55℃, 30s; 72℃, 1 min) 共反应 30 个循环, 最后 72℃ 延长 5 min. 取 5  $\mu$ l 反应物经 1% 和 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定.

**1.2.5 构建文库:** 上述合成的双股 cDNA 在高浓度 Sal I 内切酶接头及高浓度 T4 DNA 连接酶体系中使 cDNA 两端接上 Sal I 接头, 再以 Not I 内切酶酶切, 使得 cDNA 的一端为 Not I 粘端, 另一端为 Sal I 粘端; 然后经 Sephacryl S-500HR 色谱柱分离纯化; 通过 T4 DNA 连接酶将 cDNA 连接到经 Not I -Sal I 酶切的载体 pSPORT I 上, 然后转入 *E. coli* DH 5 $\alpha$  中, 再依 Vogeli 等<sup>[6]</sup> 软胶方法保存该基因库.

## 2 结果和讨论

### 2.1 鼠脑总 RNA 的提取

一步法所提总 RNA 经甲醛变性凝胶电泳检测表明 28 S RNA:18 S RNA > 2:1 (图 1), 证实了所提 RNA 的完整性.

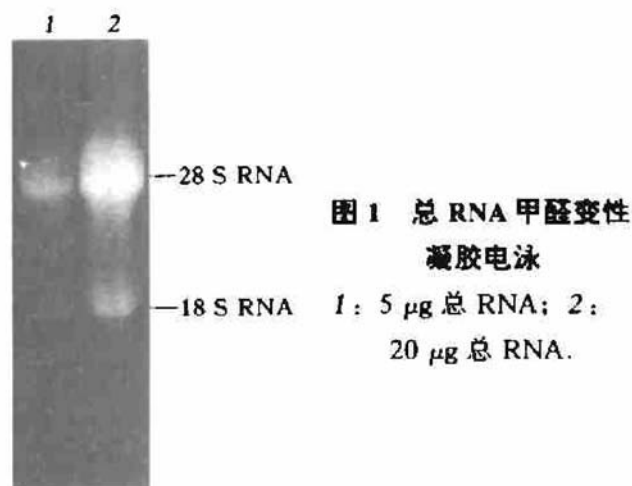


图 1 总 RNA 甲醛变性凝胶电泳  
1: 5  $\mu$ g 总 RNA; 2: 20  $\mu$ g 总 RNA.

### 2.2 poly(A)<sup>+</sup>-RNA 的纯化

上述提取的总 RNA 经 oligo-(dT) 纤维素亲和层析柱纯化, 紫外分光光度法检测表明, poly(A)<sup>+</sup>-RNA 约占总 RNA 的 1%, 与其在总 RNA 中所占比值相符. 取少量该 poly(A)<sup>+</sup>-RNA 所做体外翻译实验证实 (数据未列出), 所纯化的 poly(A)<sup>+</sup>-RNA 能够用作构

建 cDNA 基因文库的起始物.

### 2.3 cDNA 的合成

**2.3.1 第一股单链 cDNA 的合成:** 以往常用的反转录酶除了具有聚合酶的活性外, 还有部分 RNase H 的活性, 这在 cDNA 的合成中会造成 poly(A)<sup>+</sup>-RNA 的水解, 降低 cDNA 的长度和产量. 我们使用基因工程生产的反转录酶不含 RNase H 的活性, 以尽可能保证第一股单链 cDNA 能够全长和高产.

**2.3.2 cDNA 第二链的合成:** 经典的方法中往往以第一链形成的发卡为引物合成 cDNA 第

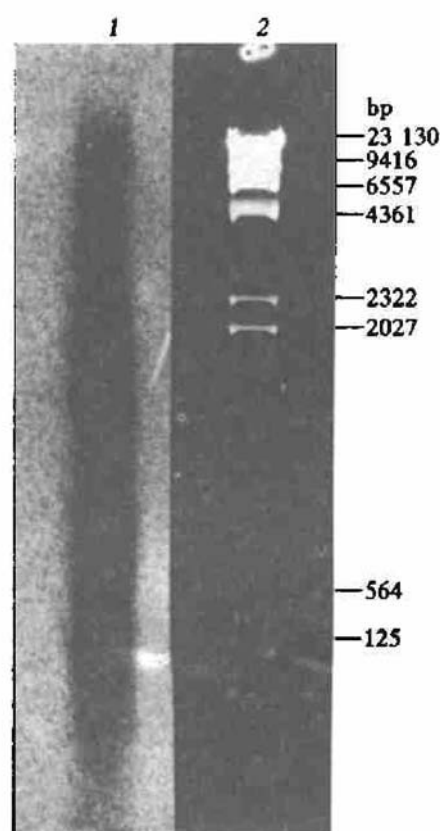


图 2 cDNA 碱性胶 (1%) 电泳  
放射自显影  
1: cDNA 第二链; 2: 标准分子  
量 ( $\lambda$ /Hind III).

二链, 最后用 S1 核酸酶切去发卡单链部分, 但控制不好常导致 cDNA 的截短和大量损失, 本文采用的是一种类似缺口平移的方法, 经 RNase H 部分水解的 poly(A)<sup>+</sup>-RNA 形成许多 RNA 引物, 加 *E. coli* DNA 聚合酶 I 合成 cDNA 第二链, 而 *E. coli* DNA 连接酶则对 2 kb



以上的 cDNA 的合成起促进作用, 最后加 T4 DNA 聚合酶是为了补齐 cDNA 的粘性末端. 我们将第一链和第二链的反应在同一管中进行, 避免了由于酚抽提和乙醇沉淀所造成的损失. 根据比放射活性及三氯乙酸 (TCA) 沉淀的 cDNA 放射计数结果, cDNA 的产量为  $1 \mu\text{g}$ . 经碱性凝胶电泳及放射自显影显示 cDNA 的长度在  $100 \sim 10\,000 \text{ bp}$  之间 (图 2).

## 2.4 方法学探讨

**2.4.1 关于所建 cDNA 基因文库的全员性:** 我们以此 cDNA 为模板已成功地扩增了四个基因, 经过对其进行序列分析证实, 它们分别是 GAD、CCK (图 3)、NSE 基因<sup>[4]</sup> 和 T3 受

隆至多功能表达载体 pSPORT I 并转化到 *E. coli* DH5 $\alpha$  中贮存, 共得到约  $5 \times 10^5$  个转化子, 克隆效率相当于产生  $1 \times 10^{12}$  个转化子每克 cDNA; 另一半 cDNA 直接于  $-20^\circ\text{C}$  贮存, 用作 PCR 的模板, 一般认为 cDNA 库以长短不等的裸露线状形式保存是不稳定的, 但在至今的 3 年中我们以此 cDNA 为模板, 应用 PCR 技术扩增并克隆了 4 个基因, 证明了此基因库虽然以“裸露”的 DNA (未连接载体、未引入宿主细胞) 的形式贮存, 但是仍然很稳定, 很适于用作 PCR 的模板. 逆转录标记所用的同位素也似乎没对 cDNA 的完整性产生较大的影响.

我们应用 cDNA 合成技术, 构建了适用于 PCR 方法分子克隆的大鼠脑 cDNA 文库, 经证明此文库稳定、完整, 并为我们今后的 cDNA 克隆工作提供了有力的工具.

## 参 考 文 献

- 1 Chomczynski P, Sacchi N. *Anal Biochem*, 1987; **162**: 156
- 2 Jacobson A. *Methods Enzymol*, 1987; **152**: 254
- 3 Gubler U, Hoffman B J. *Gene*, 1983; **25**: 263
- 4 赵 崇, 王立斌, 宋学文. *生物化学杂志*, 1994; **10** (3): 268
- 5 赵 崇, 宋学文, 邓 彤. *生物化学杂志*, 1995; **11** (4): 22
- 6 Vogeli G, Hore E, Laurent M. *Anal Biochem*, 1985; **151**: 442

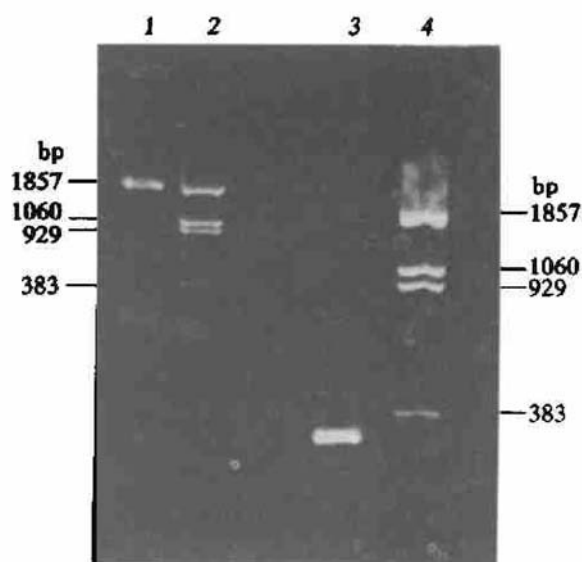


图 3 GAD 与 CCK 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图  
胶浓度分别为 1% 和 1.5%. 1: GAD 的 PCR 产物; 2、4: 标准分子量 pBR322 (Bst NI); 3: CCK 的 PCR 产物.

体<sup>[5]</sup>, 其大小依次是 1800、345、1340、1230 bp, 在 RT-PCR 方法中, 扩增较多碱基的基因是很困难的, 1500 bp 已少有报道, 而我们多次成功地扩增了 1800 bp 的 GAD 基因, 并且 T3 受体为低丰度的 mRNA, 亦得到满意的克隆结果, 说明该基因库具有相当高的完整性.

**2.4.2 关于所建 cDNA 基因文库的稳定性:** 该库建于 1991 年, 我们将其中一半 cDNA 克

**Construction of a Wistar Rat Brain cDNA Library.** Song Xuewen, Zhao Chong, Zhou Ren<sup>1)</sup>, Guo Shanyi<sup>2)</sup>, Zhang Jingyu (*Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China*; <sup>1)</sup> General Hospital; <sup>2)</sup> Prevention and Control Center of Metabolic Disease, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China).

**Abstract** A cDNA library of Wistar rat brain was constructed with a highly efficient and simplified method. The template poly(A)<sup>+</sup>-RNA was extracted from Wistar rat brain. The first strand of cDNA was synthesized by SuperScript RNase H<sup>-</sup> reverse transcriptase with the oligo

(dT)<sub>15</sub> primer which contains Not I site. After the poly(A)<sup>+</sup>-RNA was removed with *E. coli* RNase H, the second strand was synthesized by means of *E. coli* DNA polymerase I, *E. coli* DNA ligase and T4 DNA polymerase. Then Sal I adapter was added and the cDNA digested with Not I. Half of the cDNA was inserted into plasmid pSPORT I and transformed *E. coli* DH 5 $\alpha$ . The other half was stored at -20°C. It was shown that the cDNA length ranged from

100 to 10 000 bp. Using this cDNA library as a template, four genes have been amplified successfully. They are glutamic acid decarboxylase (GAD, 1800 bp), neuron-specific enolase (NSE, 1340 bp), T3 receptor (1230 bp) and cholecystokinin (CCK, 345 bp). The method for storage of the cDNA library which can be kept for a longer period was also developed.

**Key words** Wistar rat brain, cDNA library, PCR, molecular cloning.

## 脘梯度电泳方法的技术关键

周军贤 王希成<sup>1)</sup> 张艳玲 周筠梅<sup>2)</sup>

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

**摘要** 介绍在应用丙烯酰胺-脘梯度电泳技术进行蛋白质折叠、去折叠研究工作中的实验步骤和技术关键, 并在文献方法的基础上作了改进. 通过加入 15%~0% 的甘油, 抵消在凝胶中由于脘浓度不同而引起的溶液粘度变化, 保证在凝胶上脘浓度不同的部位对蛋白质保持同样的电泳阻力, 防止前沿偏斜. 采用核黄素光照催化含脘凝胶的聚合, 以防止凝胶在梯度灌制完成前发生聚合. 加浓缩胶和样品梳于脘梯度胶上可较好地克服边缘效应, 获得好的样品迁移图谱.

**关键词** 脘梯度凝胶电泳, 聚丙烯酰胺凝胶, 蛋白质折叠, 肌酸激酶

丙烯酰胺-脘梯度电泳方法对研究蛋白质的折叠、去折叠是非常有用的实验技术. 其基本原理是在常规的丙烯酰胺凝胶中加入非离子型变性剂——尿素, 使其形成浓度梯度. 电泳时将此梯度垂直于电泳方向, 使同一蛋白质样品在不同浓度的变性剂环境中电泳. 蛋白质的折叠状态随脘的浓度而变化, 因而表现出不同的迁移率, 最终在显色后的凝胶中呈现出反映蛋白质构象变化的二维图象<sup>[1]</sup>. 我们应用这一方法对一些蛋白质的去折叠和重折叠进行了研究, 对操作这一电泳实验技术方法的关键有所认识, 并对此方法做了改进.

### 1 仪器和方法

#### 1.1 仪器

选用 Bio-Rad 公司 Protein II 垂直电泳仪.

因它具有以下优势: a. 用双层玻璃中间夹条 (spacer) 保证边缘的密封和无渗漏, 这使得灌完梯度胶后再作 90 度转向的操作比较容易进行. b. 可灌制成 16 cm × 18 cm 的大尺寸胶, 便于样品的迁移变异的观察. c. 具有中心水循环, 能保证电泳过程中的温度恒定; d. 充足的上槽、下槽电极液, 可使电泳进行较长时间而不必担心干胶、电解质不足等所引起的不良效应.

#### 1.2 梯度胶的灌制

灌制线性脘梯度是靠两个蠕动泵将输液量调成 1:2 的恒定流量来保证形成准确的线性梯度. 其过程见图 1.

<sup>1)</sup>清华大学生物科学技术系, 北京 100084.

<sup>2)</sup>通讯联系人.

收稿日期: 1995-05-29, 修回日期: 1995-08-17