

- mutagenesis method with adjustable mutation frequency by use of PCR and dITP. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21** (3): 777~ 778
- 8 Chen K, Arnold F H. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (2): 5618~ 5622
- 9 Chen K, Arnold F H. Enzyme engineering for nonaqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media. *Biotechnology*, 1991, **9** (11): 1073~ 1077
- 10 Stemmer W P C. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (22): 10747~ 10751
- 11 Crameri A. Improved green fluorescent protein by molecular evolution use DNA shuffling. *Nature Biotechnology*, 1997, **15** (5): 426~ 438
- 12 Crameri A, Raillard S A, Bermudez E, *et al.* DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature*, 1998, **391** (3): 288~ 291
- 13 Zhao H M, Arnold F H. Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25** (6): 1307~ 1308
- 14 Bornscheuer U T, Altenbuchner J, Meyer H H. Directed evolution of an Esterase for the stereoselective resolution of a key

intermediate in the synthesis of Epothilones. *Biotechnology and Bioengineer*, 1998, **58** (5): 554~ 559

Progress in Artificial Evolution of Protein. DAI Ming-Hua, ZHU Ying-Min, JIANG Wei-Hong, ZHAO Guo-Ping (*Shanghai Institute of Plant Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China*).

Abstract Artificial evolution has emerged in the past few years as a powerful alternative to rational approaches for engineering protein. *In vitro* evolution of enzymes use error-prone PCR, DNA shuffling and mutator stains. Many useful enzymes have been isolated following the artificial evolution.

Key words error-prone PCR, DNA shuffling, mutator stains, artificial evolution

克隆差异表达基因的新策略

崔大祥 闫小君 王 枫 苏成芝

(第四军医大学全军基因诊断技术研究所, 西安 710032)

摘要 基因表达的变化有两种, 即新出现的基因表达与表达量差异的基因表达。表达量差异的基因克隆技术主要有 mRNA 差异展示, 此技术是目前筛选差异表达基因最有效的方法之一, 但主要存在假阳性率高的不足, 针对此缺点, 近几年提出了新的策略与方法, 如差异消减展示、基于 PCR 和减法杂交基础上的差异表达基因克隆技术, 这些技术具有显著优势。

关键词 基因表达, 克隆, 策略

学科分类号 Q52

基因表达的变化处于控制生物学调节机制的中心位置, 分离并克隆差异表达基因不仅有助于揭示生命的奥秘, 而且还能对基因诊断与治疗提供重要的理论依据。基因表达的变化有两种, 即新出现的基因表达与表达量差异的基因表达, 以前过多强调克隆新出现的表达基因, 忽略表达量差异的基因。目前研究认为表达量差异的基因表达对信号转导调控的意义更大, 分离并克隆表达量差异的基因对揭示生命的奥秘更具有意义。消减杂交、代表性差异分析、抑制性扣除杂交、Order 差异分析等在分离克隆新出现的表达基因方面具有明显优势, 而且所获基因在 RNA 印迹上重现性好, 假阳性少, 缺点是所需起始材料较多。这些技术比较成熟, 近几年无明显改进; 表达量差异的基因克隆技术主要有

mRNA 差异展示, 此技术是目前筛选差异表达基因最有效的方法之一, 但存在不足, 针对这些缺点, 近几年出现了较大改进, 并提出了新的策略及方法。现将此进展作一综述。

1 mRNA 差异展示存在问题及改进

mRNA 差异展示 (mRNA differential display, DDRT-PCR) 是目前筛选差异表达基因最有效的方法。自 1992 年 Liang 和 Pardee^[1] 建立此技术以来, 5' 端随机引物、3' 端锚定引物、循环参数都有了较大改进, 其主要目的是消除假阳性, 增强重复性与敏感性。1994 年 Liang 等^[2] 把 3' 端 12 条引物改为

Tel: (029) 3374771, E-mail: cuidx@igd.edu.cn

收稿日期: 1999-06-28, 修回日期: 1999-11-01

3 条, 即 $T_{12}A$ 、 $T_{12}C$ 、 $T_{12}G$, 使得实验操作简化; 1995 年 Ayala 等^[3] 提出了在 3' 端锚定引物与 5' 端随机引物上皆增加 CGGTAATTCG 10 个碱基, 使得上下游引物 T_m 值在 60℃ 左右; 1996 年 Liang 等^[4] 把 5' 端引物条数改为 8 条, 每条由 13 bp 组成, 3' 端采用 3 条, 每条由 16 bp 组成. PCR 循环参数进行了改进: 前 5 个循环采用 94℃ 30 s, 40℃ 2 min, 72℃ 30 s, 后 35 个循环采用 94℃ 30 s, 60℃ 2 min, 72℃ 30 s, 最后在 72℃ 延伸 7 min; 1998 年我们^[5,6] 把 PCR 循环参数改进为: 前 5 个循环采用 94℃ 30 s, 40℃ 2 min, 72℃ 30 s, 后 35 个循环采用 94℃ 30 s, 55℃ 2 min, 72℃ 30 s, 最后在 72℃ 延伸 7 min. 经这些改进, 既保持了扩增效率, 又增强了差异条带的重复性, 降低了假阳性率.

总之, mRNA 差异展示具有简便、快速、所需起始材料少、同时可在多个材料之间或不同处理材料之间进行比较等优点, 但具有一定的假阳性和获取的差异片段较短等缺点, 给后续处理带来一系列问题. 值得注意的是: 起始 RNA 的质量和浓度、引物的选择 (锚定能力、随机性、中间与末端 G/C 含量、长度、茎环形成的潜在能力等)、PCR 条件 (复性温度、缓冲液、聚合酶等)、标记方式 (放射类型、荧光显示等) 以及 PCR 片段分辨方式 (变性或非变性胶、聚丙烯酰胺或琼脂糖电泳等) 都可影响最终结果.

2 差异消减展示

差异消减展示 (differential subtraction display, DSD) 是 1998 年 Kang 等^[7] 提出的, 它是针对差异展示的不足而提出的改进方法. 此法可显著降低假阳性, 增强重复性及敏感性, 同时还保持识别轻度、中等程度改变的 (up or down regulation) RNAs. 它的最大改进是: DDRT-PCR 呈现出差异条带之后, 克隆差异条带之前, 先对 PCR 扩增产物进行消减杂交, 即回收目的方差异条带的同时, 回收对照方相应范围的条带. 回收的差异条带用非生物素标记的引物与 dNTPs 进行 PCR 扩增, 而对照方回收的产物用含生物素标记的 dATP 的 dNTPs 进行 PCR 扩增, 其 PCR 产物进行消减杂交, 用链亲和素-生物素磁珠分离系统去除杂交产物, 剩下的产物由带有 α -³²P dATP 的 dNTPs 进行扩增, 可重复差异展示, 增加差异条带的特异性. 实验证明, 消减杂交使得轻度、中等程度改变的

(up or down regulation) 差异表达基因都能够保留下来, 而假阳性产物被去除. 其他方面的改进是: a. 使用标准的 oligo (dT) 起始 mRNAs 而不用总 RNA 反转录合成 cDNAs; b. 重复性好的双引物扩增所需的 cDNA 范围很小, 摸索合适的 cDNA 量对重复性很重要; c. 锚定引物具有扩增优势, 为了克服这种优势, 增加随机引物的浓度后发现, 随着随机引物浓度的增加, 呈现出的条带数显著减少, 这就是引物相互干扰, 其原因可能有二: 5' 端 10 bp 的随机引物不受 mRNA 3' 端限制, 只是提供总的扩增容量; 另一方面, mRNA 3' 端非翻译区包含 AT 富集区, 使得锚定引物更易结合 mRNA 3' 端. 因此, 设计新的增强特异性及灵敏性的锚定引物更加必要. 实验证实, 使用 $T_{12}VNN$ ($V = A, C, \text{或 } G; N = A, C, G, \text{或 } T$) 锚定引物比常规的 $T_{12}VN$ 锚定引物能呈现出更大量的差异条带, 而且具有更强的特异性及灵敏性, $T_{12}AA$ 、 $T_{12}AT$ 、 $T_{12}CT$ 、 $T_{12}GT$ 不能产生清晰的差异条带, 只能出现 smear 现象, 应避免使用; d. 循环次数太多, 引物消耗完后常导致高分子质量 smear 现象. 这主要原因是: PCR 产物的 3'-OH 端相互退火, 导致 PCR 循环期间产物末端被延伸或随意终止, 因此摸索最佳循环次数及退火温度对消除假阳性更具有意义. 此技术最大的优势是获得的差异条带在 RNA 印迹上重现性好, 保持了中等程度改变的差异表达基因的呈现与克隆, 特别是长距离 PCR 扩增 (LD-PCR) 技术的运用, 使得此技术有可能成为目前筛选差异表达基因最有效的技术. 它的唯一不足是步骤繁琐, 工作量大.

3 PCR 和减法杂交基础上的克隆技术

消减杂交技术是 20 世纪 80 年代发展起来的一项克隆新基因的主要技术, 它是利用细胞基因表达的差异性, 并结合杂交技术建立起来的, 成功地用于多种差异表达基因的克隆. 近几年由于长距离 PCR^[7] 扩增技术与消减杂交技术结合, 使得此技术获得较大进展, 归纳起来目前主要有两种方案, 即基于 cDNA 文库的减法杂交 (subtracted cDNA library) 基础上的 LD-PCR 和基于 LD-PCR 基础上的减法杂交技术 (PCR-based subtraction). 前者的经典基本方法如下: a. 制备目的细胞的 cDNA; b. 制备扣除细胞的 RNA; c. 将 cDNA 和 mRNA 进行杂交; d. 分离出未杂交的目的 cDNA. 此传统的方法在实际操作中采用的技术有很大差别, 例如在杂

交过程中用cDNA柱来扣除 mRNA, 或用cDNA来扣除cDNA; 分离杂交体的技术则更多, 经典方法为羟磷灰石柱层析法, 后又引入了生物素亲和层析、化学 GC 交联和 oligo dA 柱层析等。此技术的主要优点是可以获得全长 cDNA 克隆, 缺点是操作复杂, 大量扣除 mRNA, 差异的 cDNA 容易丢失, 这样特异表达基因在 cDNA 文库中的相对丰度就较低。把 PCR 引进此技术后, 可克服这些不足。a. 运用磁珠法获取靶方 mRNA 后, 立即运用带有能识别 5' 端帽子结构的专利引物及 oligo (dT)₃₀ 引物, 同时进行反转录, 此改进可获得完整靶方全长 cDNA; b. 用磁珠法获取对照方 mRNA, 把靶方 cDNA 加入后, 直接进行杂交; c. 运用磁架去除杂交产物, 回收剩余的上清中 cDNA。运用 5' 端帽子引物与 3' 端 oligo (dT)₃₀ 引物, 进行严谨条件下 LD-PCR 扩增, 其产物可直接克隆入 T 载体。整个过程可在一周内完成, 效率明显提高, 而且特异表达基因不会丢失, 假阳性很少。

第二种基于 PCR 基础上的减法杂交技术其优点在于可将目的 cDNA 和扣除 cDNA 进行 PCR 扩增, 因此可以解决材料来源少的问题, 而且还可以进行多次扣除以提高特异表达基因的丰度。具体方法如下: a. 制备目的细胞的 cDNA: 采用磁性分离技术可一步获得 mRNA, 运用带有能识别 5' 端帽子结构的专利引物及 oligo (dT)₃₀ 引物, 同时进行反转录, 此改进可获得完整靶方全长 cDNA; b. 制备扣除细胞的 cDNA: 提取 mRNA 后用 oligo (dT)₃₀ 按常规方法进行反转录, 然后 PCR 扩增, 获取大量标记上 biotin 的产物; c. 将目的细胞的 cDNA 和扣除细胞的大量标记上 biotin 的产物进行杂交; d. 运用链亲和素-生物素磁性分离技术分离出未杂交的目的 cDNA, 采用 LD-PCR 技术特异扩增 cDNA; e. PCR 产物克隆入 T 载体。若需要, 可重复 c、d 步骤。此种方法的优势非常明显, 克服了经典方法的缺点, 对特别难获得的标本或非常珍贵的标本更具有优势^[8~11]。

总之, 随着高效反转录酶与具有自动校正功能的 Taq 酶的出现, 长距离 PCR 扩增技术的优化, 差异表达基因克隆技术将会不断发展, 我们相信运用这些方法不仅提高工作效率, 而且将会获得更多的差异表达基因。

参 考 文 献

- Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, **257** (14): 967~971
- Liang P, Zhu W, Zhang X, *et al.* Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22** (25): 5763~5764
- Ayala M, Balint R F, Fernandez-de-Cossio M E. New primer strategy improves precision of differential display. *Biotechniques*, 1995, **18** (5): 840~848
- Liang P. Factors ensuring successful use of differential display. *Methods*, 1998, **16** (4): 361~364
- 崔大祥, 闫小君, 苏成芝. mRNA 差异展示 PCR 的进展. *生命的化学*, 1997, **17** (4): 42~45
- Cui D X, Yan X J, Su C Z. *Chemistry of Life*, 1997, **17** (4): 42~45
- Cui D X, Yan X J, Su C Z. Differentially expressed genes in GC7901 or GES-1 were isolated by optimized differential display RT-PCR and their primary clinical significance. *Journal of Fourth Military University*, 1998, **18** (6): 601~605
- Kang D C, LaFrance R, Su Z Z, *et al.* Reciprocal subtraction differential RNA display: an efficient and rapid procedure for isolating differentially expressed gene sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (23): 13788~13793
- Chenchik A. Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. In: Siebert P, Chenchik A, eds. *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR*. USA: BioTechniques Books, Clontech Company, 1997. 305~319
- Nelson K, Brannan J, Kretz K. The fidelity of TaqPlusTMDNA polymerase in PCR. *Strategies Mol Biol*, 1995, **8**: 24~25
- Zhumabayeva B, Chenchik A, Siebert P D. RecA-mediated affinity capture: a method for full-length cDNA cloning. *Biotechniques*, 1999, **27** (4): 834~836
- Zhao Z, 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 Biotech*, 1999, **73** (1): 35~41

New Strategy of Cloning of Differentially Expressed Genes. CUI Da-Xiang, YAN Xiao-Jun, WANG Feng, SU Cheng-Zhi (*Institute of Genetic Diagnosis of the Fourth Military Medical University of PLA, Xi'an 710032, China*).

Abstract There are two kinds of changes of gene expression, that is, novel gene expression and differential gene expression in quantity. Cloning technique of differentially expressed gene in quantity mainly is mRNA differential display, which is presently one of the most effective methods. However, mRNA differential display possesses higher unreal positive rate, in order to overcome its shortcoming, some novel strategies and methods were advocated, such as differential subtraction display, subtraction based on LD-PCR, LD-PCR based on subtraction, those techniques have dominant advantages to mRNA differential display.

Key words gene expression, cloning, strategy