

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2002)10-05-0396-04

cDNA 文库基础上运用热启动聚合酶链反应 末端延伸快速分离全长 cDNA 序列

闫宏伟¹, 杨向东, 何淑雅¹, 杨永宗

(南华大学心血管病研究所, 1. 南华大学生物化学与分子生物学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[主题词] cDNA; 聚合酶链反应, 热启动; 序列标签

[摘要] 建立一种 cDNA 文库基础上运用热启动聚合酶链反应末端快速扩增分离人类新基因全长 cDNA 序列的新技术。以文库载体序列与待扩增目的基因片段为模板各设计引物进行热启动聚合酶链反应扩增, 从人胎肝 cDNA 文库中获得氧化型低密度脂蛋白诱导 U937 细胞泡沫化过程中差异表达序列标签片段(FRG4)的全长 cDNA 序列, 聚合酶链反应产物克隆到 pGEM-T 载体中, 并测序鉴定, 从而成功获得 FRG4 的全长 cDNA 序列。该技术是一种快速有效的分离人类新基因全长 cDNA 序列的方法。

[中图分类号] R781

[文献标识码] A

Rapid Isolation of Full-Length cDNA Sequence from cDNA Library by Hot-Start Polymerase Chain Reaction

LU Hong-Wei, YANG Xiang-Dong, HE Shu-Ya, and YANG Yong-Zong

(Institute of Cardiovascular Disease, Biochemistry Department, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[MeSH] cDNA; Polymerase Chain Reaction, Hot Start; Sequence Tagged Sites

[ABSTRACT] **Aim** To establish a new technique for rapid isolation full-length cDNA sequence of human novel gene from cDNA library using hot-start PCR. **Methods** The library vector-specific primers and gene-specific primers have been designed for performing hot-start PCR to attain the full-length cDNA of differential expressed sequence tag (FRG4) of U937 foam cell formation induced by ox-LDL from human fetal liver cDNA library. The products of PCR are cloned to pGEM-T vector and sequenced. **Results** We have successfully attained the full-length cDNA sequence of FRG4. **Conclusion** This technique is a rapid and efficient method for isolating full-length cDNA sequence of human novel gene from cDNA library.

人类基因组计划的实施为疾病相关基因的克隆提供了机遇, 目前获取基因全长 cDNA 序列较常见的方法有: cDNA 文库筛选、cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 和 Internet 网上电子克隆等^[1,2]。本文采用 cDNA 文库基础上运用热启动聚合酶链反应末端延伸快速分离全长 cDNA, 其原理最初来源于 RACE 方法。此方法从已经逆转录成 cDNA 的文库中进行末端延伸, 而避开了 RNA 的提取、mRNA 的分离及逆转录等步骤, 直接以文库载体与目的基因片段各设计引物进行聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增^[3]。针对我们筛选氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 诱导 U937 细胞泡沫化过程中获

得的差异基因中一新的表达序列标签 (expressed sequence tags, EST) 片段 (FRG4)^[4], 本文运用热启动 PCR 从人胎肝 cDNA 文库中快速获取 FRG4 全长 cDNA 序列, 取得了良好效果, 现将该方法报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人胎肝、胎心和胎盘 cDNA 文库 (载体为 λ gt10) 和高保真聚合酶链反应试剂盒均购自 Clontech 公司, 克隆载体 pGEM-T 和连接反应体系试剂购自 Promega 公司。其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 cDNA 模板的制备

cDNA 文库 λ 噬菌体的铺平板培养: 制备铺平板的感受态细菌, 将感受态细菌和噬菌体加入一灭菌 15 mL 试管, 混匀, 于 37 °C 温育 20 min, 加上层琼脂糖 (50 °C) 10 mL, 混匀后铺上平板, 37 °C 培养 12 ~ 16 h, 然后进行 λ 噬菌体的洗脱以及 λ 噬菌体 DNA 的提取, 其方法主要参照分子克隆实验指南^[5]。

[收稿日期] 2002-03-21 [修回日期] 2002-08-24

[基金项目] 国家自然科学基金 (30200103)、国家重大基础研究项目 (G2000056905)、湖南省自然科学基金 (00JJY2027) 和湖南省教育厅课题 (00C151) 资助。

[作者简介] 闫宏伟, 男, 1972 年出生, 湖南临湘人, 生物化学与分子生物学硕士研究生。何淑雅, 女, 教授, 硕士研究生导师。杨向东, 男, 1970 年出生, 心血管病理生理学博士, 主要从事动脉粥样硬化相关基因克隆和细胞凋亡机制研究, 为本文通讯作者。

1.3 FRG4 片段在不同 cDNA 文库中表达检测

以 FRG4 cDNA 序列设计基因特异的引物, 上游引物为 5'-CITGCTCTCTGCCAATTGCTC-3'; 下游引物为 5'-CGTGGCCCTGGTCATGCTCC-3'。分别以人胎肝、胎心和胎盘 cDNA 为模板。PCR 反应体系 20 μ L, 其中含 cDNA 模板 200 ng、FRG4 上、下游引物各 125 pmol/L、 Mg^{2+} 1.5 mmol/L、dNTPs 200 μ mol/L、 $1 \times$ buffer 和 Taq DNA 聚合酶 2 u。在 PE9600 PCR 扩增仪上 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 完成 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min; 置 4 $^{\circ}$ C 保存。1.5% 琼脂糖电泳分析。

1.4 热启动聚合酶链反应

热启动 PCR 原理是防止在较低温度下的错配与延伸, 设计了先将 PCR 反应体系的各试剂(Taq 酶除外) 加到一起, 上面加盖一层蜡块, 当温度达 80 $^{\circ}$ C 时蜡块熔化, Taq 酶移至液体, 各试剂混合在一起, 这时 PCR 反应才开始进行, 避免了相对低温环境的非特异性扩增反应, 从而大大提高了扩增的特异性。以文库载体序列设计引物。 λ gt10-3': 5'-GTGGCT-TATGAGTATTTCTCCAGG-3', λ gt10-5': 5'-TTGAG-CAAGTTCAGCCTGGTTAAGG-3'。PCR 反应体系 20 μ L, 其中含人胎肝 cDNA 模板 200 ng, FRG4 上游引物和 λ gt10-5' 作为一对引物, 以及 FRG4 下游引物和 λ gt10-3' 作为另一对引物, 每条引物浓度为 125 pmol/L, $50 \times$ dNTPs 0.4 μ L, $10 \times$ buffer 2 μ L, $50 \times$ Mix Enzyme 0.4 μ L。在 PE9600 PCR 扩增仪上完成扩增。94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 68 $^{\circ}$ C 退火、延伸 2 min, 完成 27 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min; 置 4 $^{\circ}$ C。1.5% 琼脂糖电泳分析。

1.5 聚合酶链反应产物克隆、酶切及测序

聚合酶链反应产物 1 μ L, pGEM-T 载体 1 μ L, $2 \times$ buffer 5 μ L, T4 连接酶 1 μ L, 补双蒸水 2 μ L 至反应体系 10 μ L, 14 $^{\circ}$ C 水浴 6 h 或过夜, 转化到 DH5 α 感受态细菌, 经蓝白筛选, 挑选白色克隆抽提质粒, 酶切分析, 挑选片段大小在 500~800 bp 的质粒送北京微生物研究所经 ABI377 自动测序仪上完成测序。

2 结果

2.1 FRG4 片段在不同 cDNA 文库中表达检测结果

从人胎肝、胎心和胎盘 cDNA 文库中提取 DNA 作为模板, 以 FRG4 primer1, 2 作为引物进行 PCR 扩增, 经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析, 可见 FRG4 在胎肝 cDNA 文库中表达最高, 结果如图 1(Figure 1)。

2.2 胎肝 cDNA 文库中钓取 FRG4 同源片段的聚合

酶链反应扩增结果

从人胎肝 cDNA 文库中提取 DNA 作为模板, FRG4 与 λ gt10 作为引物进行 PCR 扩增, 经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色分析。在构建 cDNA 文库中, 因同一基因的 cDNA 存在大小不同的片段, 可见扩增产物片段大小呈现多条电泳带, 主要分布在 0.5~1.0 kb 之间, 电泳区带见图 2(Figure 2)。

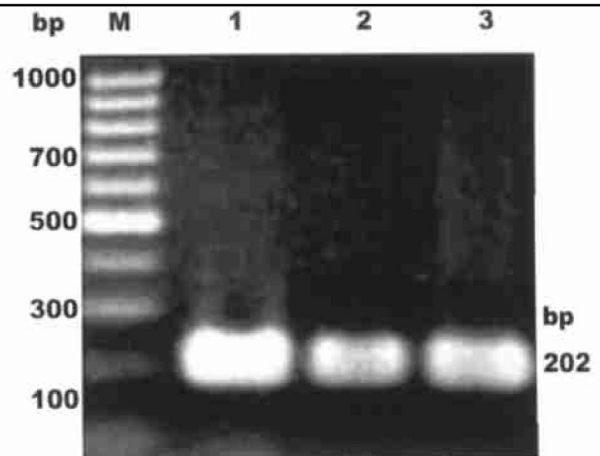


图 1. FRG4 片段在不同 cDNA 文库中表达的凝胶电泳图谱。

Figure 1. Results of FRG4 amplified in different cDNA libraries. Lane M: 100 bp ladder Maker, Lane 1: FRG4 amplified in fetal liver cDNA library, Lane 2: FRG4 amplified in placenta cDNA library, Lane 3: FRG4 amplified in fetal heart cDNA library.

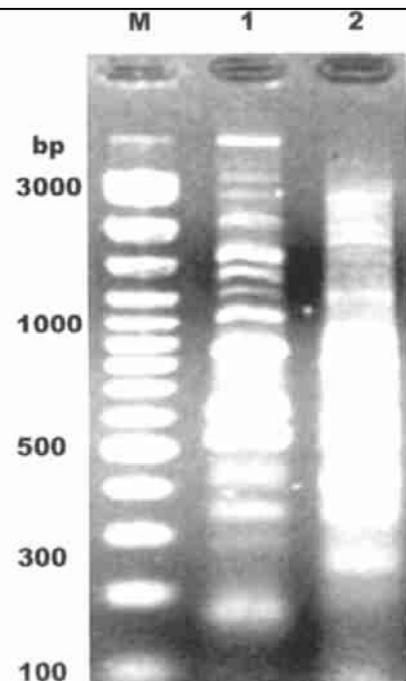


图 2. 胎肝 cDNA 文库中 FRG4 延伸产物的凝胶电泳图谱。

Figure 1. Results of FRG4 extend amplified in fetal liver cDNA libraries. Lane M: 100 bp DNA size maker, Lane 1: FRG4 extend amplified with λ g3, t10 and FRG4 primer 1 in fetal liver cDNA library, Lane 2: FRG4 extend amplified with λ g5, t10 and FRG4 primer 2 in fetal liver cDNA library.

2.3 FRG4 延伸产物克隆后的酶切检测结果

从每个平板上随机挑取 10~15 个白色菌落, 抽提质粒 DNA 后经 *EcoR* Ⅰ 酶切消化, 1.5% 的琼脂糖电泳, EB 染色, 酶切图谱如图 3 (Figure 3)。

2.4 FRG4 全长 cDNA 序列及编码氨基酸序列

氨基酸序列如下:

MFRGLSSWLGLQQPVAGGGQPNGDALPEQPSETV
AESAEELQAGDQELLHQAKDFGNLYLNFASAATKKI
TEQDSVAETAQTIKKSVEEGKIDGIIIDKTIIGDFQKEQKK
FVEEQHTTKSEAAVPPWVDIINDEETIQQILALSADKR
NFLRDPPAGVQFNFDQMYPVVALVMLQEDELLESKMRF
ALVPKLVKEEVFWRNYFYRVSLIKQSAQLTALAAQQQA
AGKKEESNGREQDLPLAEAVRPKTPPVVIKSQLKTQED
EEEISTSPGVSEFVSDAFDACNLNQEDLRKEMEQLVLD
KKQEETAVLEEDSADWEKELQQLQEQEYEVVTESEKRD
ENWDKEIEKMLQEEN

FRG4 全长 cDNA 序列如下:

```

1   GGCAACCACT GCTCGCTGCC GTCTCTGGGG ATCGGGACCG CGGCGGCGGC CCCCGAGCCG
61  GATGTTCCCG GGCCTGAGCA GTTGGTTGGG CTTGCAGCAG CCGGTGGCAG GCGGTGGGCA
121 GCCCAATGGA GATGCTCTAC CCGAGCAGCC GTCCGAGACG GTGGCTGAGT CTGCGGAGGA
181 GGAGCTGCAG CAAGCGGGAG ACCAGGAGCT CCTCCACCAG GCCAAAGACT TCGGCAACTA
241 TTTATTTAAC TTTGCATCTG CTGCCACAAA AAAGATAACT GAATCAGTTG CTGAAACAGC
301 ACAACAATA AAGAAATCCG TAGAAGAAGG AAAAATAGAT GGCATCATTG ACAAGACAAT
361 TATAGGAGAT TTTCAGAAGG AACAGAAAAA ATTTGTTGAA GAGCAACATA CAAAGAAGTC
421 AGAAGCAGCT GTGCCCCCAT GGGTTGACAC TAACGATGAA GAAACAATTC AACAACAAAT
481 TTTGGCCTTA TCAGCTGACA AGAGGAATTT CCTTCGTGAC CCTCCGGCTG GCGTGCAATT
541 TAATTTGAC TTTGATCAGA TGTACCCCGT GGCCCTGGTC ATGCTCCAGG AGGATGAGCT
601 GCTAAGCAAG ATGAGATTTG CCCTCGTTCC TAAACTTGTG AAGGAAGAAG TGTTCTGGAG
661 GAACTACTTT TACCGCGTCT CCCTGATTAA GCAGTCAGCC CAGCTCACGG CCCTGGCTGC
721 CCAACAGCAG GCCGCAGGGA AGGAGGAGAA GAGCAATGGC AGAGAGCAAG ATTTGCCGCT
781 GGCAGAGGCA GTACGGCCCA AAACGCCACC CGTTGTAATC AAATCTCAGC TTA AAAACTCA
841 AGAGGATGAG GAAGAAATTT C TACTAGCCC AGGTGTTTCT GAGTTTGTC GTGATGCCTT
901 CGATGCCTGT AACCTAAATC AGGAAGATCT AAGGAAAGAA ATGGAGCAAC TAGTGCTTGA
961 CAAAAAGCAA GAGGAGACAG CCGTACTGGA AGAGGATTCT GCAGATTGGG AAAAAGAACT
1021 GCAGCAGGAA CTCAAGAAT ATGAAGTGGT GACAGAATCT GAAAAACGAG ATGAAAAC TG
1081 GGATAAGGAA ATAGAGAAAA TGCTTCAAGA GAAAATTAG CTGTTCTCTGA AATAGAAGAA
1141 TAATCCTTAA CAGTCTGCAA ACTGACATTA AATTCTAGAT GTTGACAATT ACTGAAAAAA
1201 AAAAAAAAAA AAA

```

3 讨论

从短片段 EST 中获取全长 cDNA 序列非常费时费力, 主要方法有通过 cDNA 文库筛选、cDNA 末端

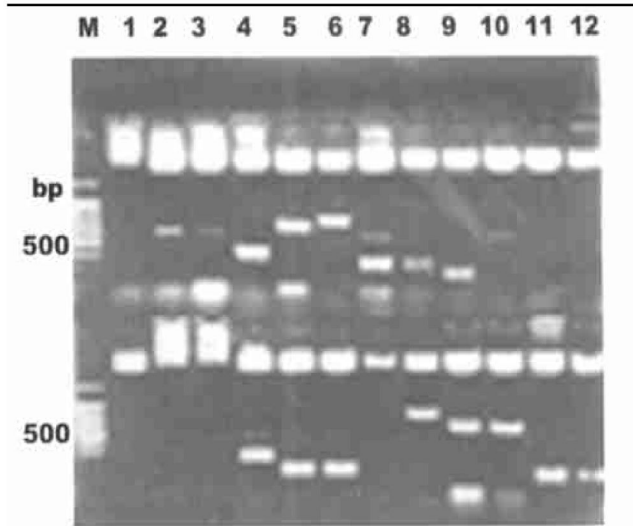


图 3. FRG4 延伸产物克隆后的 *EcoR* Ⅰ 酶切凝胶电泳图谱。
Figure 3. Restriction pattern of the recombinant plasmid with *EcoR* Ⅰ enzyme.

快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 和 Internet 网上电子克隆等方法。cDNA 文库筛选是经典方法, 适用范围广, 特异性较高, 但工作量大, 从 cDNA 文库筛选全长 cDNA 需要使用同位素, 经过初

筛、复筛等多次筛选的繁琐工作,既不安全又费钱费时费力,而且往往得到的仍非全长 cDNA 序列; RACE 方法可以不需要购买 cDNA 文库,但 RACE 方法需要从各种组织中提取 mRNA 再反转录成 cDNA 池,有时很难保证 mRNA 的质量而影响全长 cDNA 的克隆;人类基因组计划的实施为许多基因片段在网上直接克隆提供了方便,但电子克隆也因 Internet 网上部分序列不全而不能克隆到全长 cDNA 序列。目前有些采用上面的几种方法联合使用克隆全长 cDNA 序列^[6,7]。

运用热启动 PCR 技术,能够从 cDNA 文库中快速分离基因的 5' 和 3' 末端,从而获取全长 cDNA 序列。我们在实验过程中注意了以下几点: 引物设计:提高引物 T_m 值,使扩增产物的特异性增加,避免出现假阳性。④使用高保真的 DNA 聚合酶,本实验应用了 Clontech 公司的 Mix Enzyme。④从短片段 EST 中获取全长 cDNA 序列前,先检测该 EST 片段在不同 cDNA 文库中表达高低,选用表达高的 cDNA 文库来获取全长 cDNA 序列较容易。采用热启动 PCR 技术也是减少非特异性扩增的一个重要途径。

FRG4 是通过抑制消减杂交(SSH)筛选 ox-LDL 诱导 U937 细胞泡沫化过程中差异表达得到的,同一基因在不同组织中存在表达差异,常采用斑点杂交方法检测 FRG4 在不同组织中的表达,然后确定选用筛选哪种组织的 cDNA 文库。我们将 EST(FRG4)通过 Blast 同源性比较,结果与人胎肝和胎盘 cDNA

文库中 cDNA 克隆测序所得序列有较高同源性,我们现有人胎肝、胎心和胎盘 cDNA 文库,经过聚合酶链反应检测,FRG4 在人胎肝 cDNA 文库中表达最高(图 1),故选用筛选人胎肝 cDNA 文库。同时,我们根据获得的 FRG4 cDNA 全长序列设计了其开放阅读框(ORF)特异引物,以人胎肝 cDNA 为模板,经热启动聚合酶链反应扩增其开放阅读框序列,凝胶电泳检测,其产物片段大小与预期大小一致(待发表资料),更进一步证实该方法的可行。FRG4 全长 cDNA 的克隆,为进一步探讨动脉粥样硬化相关基因提供了基础,也为该疾病的发生、发展机制提供了深入研究的基础。

[参考文献]

- [1] Cai Y, Gao Y, Sheng Q, et al. Characterization and potential function of a novel testis-specific nucleoporin BS-63. *Mol Reprod Dev*, 2002, **61** (1): 126-134
 - [2] 沈洁, 郭连英, 金成刚. 新基因 TMBP-1 的全长 cDNA 克隆. *大连医科大学学报*, 2000, **22** (4): 241-244
 - [3] 傅俊江, 李麓芸. 用巢式 PCR 技术从 cDNA 文库中快速分离人类新基因 5' 末端. *中国医师杂志*, 1999, **1** (1): 24-26
 - [4] 杨向东, 王抒, 唐蔚青, 等. 人单核细胞泡沫化敏感候选基因的筛选. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (3): 195-198
 - [5] 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯. *分子克隆实验指南*. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992; 127-138
 - [6] Lin L, Wu Y, Li C, et al. Cloning, tissue expression pattern, and chromosome location of a novel human gene BRI3BP. *Biochem Genet*, 2001, **39** (11-12): 369-377
 - [7] Yan Y, Davis EL. Characterisation of guanylyl cyclase genes in the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. *Int J Parasitol*, 2002, **32** (1): 65-72
- (此文编辑 朱雯霞)