

功能基因的分离新方法专栏

编者的话：新年伊始，面对科技创新和生物科技日新月异的发展大潮，本刊新开辟了“功能基因的分离新方法”栏目，今后根据需求将会陆续推出实验室新技术、新方法等方面的栏目，使读者能够及时、准确地了解本学科实验技术与方法的最新动态与成果。本刊热切希望作者、读者关注本栏目，欢迎踊跃投稿和提出宝贵建议和意见。

快速、有效筛选新的功能基因——荧光差异显示技术

王 夏

(中国科学院微生物研究所生物新技术中心 北京 100080)

摘要：控制生物性状的基本单位是基因，研究细胞的基因表达一直是分子生物学的重要课题之一。不同细胞间基因表达的差异决定了生命活动的多样性，如发育与分化、内环境稳定、细胞周期调节等。近年来，随着DNA重组技术的发展，已有数万个人类基因被克隆分析。要从如此众多的表达基因中找出引起细胞生理或病理变化的基因并非易事。应用荧光标记的mRNA差异显示技术将有可能在一定程度上起到关键的作用。以总RNA为模板，采用荧光标记的锚定引物，通过逆转录、差异显示PCR反应，经5.6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离差异条带，条带清晰、明亮、背景低，各样本间的差异不仅呈有否的变化，亦表现出很多强弱改变；本实验室经过多年的坚持摸索、研究，现已能成功的应用荧光标记差异显示技术，可快速(2d)、敏感、经济有效的筛选各种未知的表达基因。

关键词：差异显示，mRNA，荧光

中图分类号：Q93 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2654(2003)01-0103-02

mRNA差异显示技术(differential display, DD)是用于研究基因的差异表达的新方法。该技术是1992年^[1]由Liang和Dardec以研究与癌症发生有关基因为目的，创立的一种鉴定与克隆哺乳动物正常生理状态与异常生理状态之间差异表达的基因的方法，首次报道后，即已其不可替代的优势被广泛应用于生物医学领域，在应用过程中不断得到改进，已比较成功地应用于动物及人类癌症、心脏病、糖尿病、胚胎发育、脑发育、生长因子激活与抑制有关的基因的鉴定与克隆(已有文献报道)。并产生了诸多衍生技术如RPA(RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR)、GDD(genomic DD)等。本文将主要介绍本实验室荧光标记差异显示技术(fluorescent DD, FDD)的应用及体会。另外，我们应该清楚认识到我们在功能基因研究方面的人力、财力的投入与美国的人类基因组是不能相提并论的。但我们在很多地方，如家族病、地方病的资源上是有优势的，这是我们寻求疾病基因的绝佳来源。中国要在人类基因研究方面占有一席之地，除了要保护好中华民族的基因资源外，还必须加快对这些基因的研究，由于在人力、财力上投入的差距决定我们必须采用目的性强，时间短，见效快的方法，mRNA差异显示技术的出现使这成为可能。

收稿日期：2001-12-16

1 基本原理与方法

所有 mRNA 都有 poly (A) 尾, 在 poly (A) 前面的第一位的碱基 (A 除外) 有 3 种可能 (G, C 或 T), 第二位的碱基有 4 种可能 (G, C, T 或 A), 这 2 个碱基共有 12 种组合。与此对应, 可合成 12 种引物, 即在 oligo (dT) 后面接上 2 个碱基, 通常表示为 T12MN (M、N 表示 4 种碱基中的一种, M 不能为 T), 如 T12CA 引物, 将覆盖 1/12 的 mRNA 群体, 用这种引物进行反转录, 将获得 1/12 的 cDNA 亚群体。然后用一个 5' 端的任意引物 (arbitrary primer, AP) 对这个 cDNA 亚群体进行 PCR 扩增。因为 5' 端的任意引物将随机结合在 cDNA 分子上, 因此来自不同 mRNA 的扩增产物大小是不同的, 可以在测序胶上明显分辨出来。当 PCR 反应时加入放射性同位素标记, 电泳后对光片曝光或其他显示反应, 可发现一对细胞群体中有差异的 DNA 片段。这些有差异的片段就是差异表达基因的 cDNA, 从胶上切下这些片段, 再扩增后进行克隆分析, 就能从 cDNA 库或基因组 DNA 库中筛选到全长 cDNA 或基因组克隆。扩增片段也可作为探针用于 Northern 杂交分析。

2 该技术的优势与不足

差异显示技术较以往的方法, 提供了几方面的理论优势, 诸如差异杂交和差异 cDNA 克隆, 这些技术能用于组织细胞特异性 mRNA 的鉴定。首先, 实验要求的 mRNA 样品的用量较少。第二, 因为 DDRT-PCR 技术程序里包括 PCR 扩增步骤, 因而从理论上说 DDRT-PCR 技术能灵敏的用于检测在组织或细胞中表达极低丰度的 mRNA 样品的差异表达。第三, 能把从两种或更多的特定组织样品来源的扩增产物放在同一块凝胶上鉴定, 因此 DDRT-PCR 技术能用于鉴别特定组织或细胞来源样品之间转录水平的 mRNA 的定性和定量变化。最后, DDRT-PCR 能够检测那些彼此密切相关的 RNA 分子间的表达差异, 而这种 RNA 分子的有些种类已在构建减除 cDNA 文库时 (subtracted cDNA libraries) 已经丢失。

然而, 该技术也存在着一些缺陷, 主要表现为: cDNA 产物的质量较低, 在序列胶中往往呈不清晰状态^[2]; 所得 cDNA 片段通常小于 500nt, 往往是 3' 端的非翻译 (编码) 序列; 所得差异片段的假阳性高, 可高达 85% 等^[3]。

3 针对不足的改进措施

荧光标记差异显示技术通过对引物设计、PCR 条件、凝胶电泳条件以及标记物的改进, 极大减少了上述不足。

差异显示的锚定引物有单碱基锚定引物、简并或非简并的双碱基锚定引物等多种类型, 本实验室推荐使用双碱基锚定引物。将 mRNA 群体分为 12 个亚群, 这极大减少了每一锚定引物产生的第一条 cDNA 的数量, 不仅可降低随机引物的用量, 更可降低 DD 产物的复杂性, 使差异显示条带在序列胶上易于分辨, 从而传统方法中常见的“重叠带”现象减少。差异显示的随机引物是采用较长的随机引物, 即指长度在 25 ~ 28mer 之间的引物, 它能使 DD-PCR 扩增产物条带明显的减少; 由于引物长度的增加, 随机引物的复性温度也升高, 引物复性的严谨性也增加, 导致用较少的 cDNA 亚组份即能扩增出特异性高和可重复性好的扩增产物。特异性高的扩增产物的获得可以通过适当的减少用于扩增的 cDNA 亚组份的模板量来得到。DD 专用的随机引物的特点为 A + T 与 G + C 含量近乎相等, 且 3' 端以 G 或 C 结尾, 可增加 DD 扩增的效率。

通过改变 RT-PCR 反应条件如底物浓度、延伸时间等, 差异片段的长度可达 2.0kb,

因较长 cDNA 片段容易通过 Northern blot 进行分析鉴定辨别真假阳性克隆, 且其中可提供更多的序列信息, 故获取大的片段具有重要意义。

用常规的序列分析胶进行分辨时, 较长的 cDNA 片段往往挤在胶的上端而影响分辨率。美国 Beckman Coulter 公司推出一种 GenomxLRs 差异显示系统, 改用 5.6% 的 PAGE 胶 (聚丙烯酰胺), 并使胶的厚度变为 250 μm , 通过提高电泳的电压 (3,000 V) 及降低温度 (52 $^{\circ}\text{C}$) 显著提高了分辨率。

同位素标记存在曝光时间长、带型不佳、不方便准确定位、基本与相邻的带混合、污染等缺点, 将荧光物质标记于锚定引物的 5' 端, 可产生清晰、明亮、低背景的分辨效果, 操作周期仅 2d。

很多文献报道的差异显示居高不下的假阳性率与反转录的引物、PCR 条件的选择及标记物的选择有关, 用上述 GenomxLRs 差异显示系统及本实验室多年的研究积累, 大大克服了上述不足。后续的文章中将会讨论这些。再扩增引起的假阳性率高的问题^[4]本实验室是通过设计再扩增引物来解决。通常, 再扩增引物与 DD 引物相同, 这里改用 T7 (22mer) 与 M13r (24mer), 此为在锚定引物的 5' 端和随机引物的 3' 端分别增加的序列, 这两种来源于原核生物的引物尽可能降低了真核 mRNA 序列中非特异性扩增的机会。同时, T7 启动子序列可直接用于体外转录合成 cDNA 探针, 为 cDNA 片段的直接测序和鉴定 (RPA 或 Northern 杂交) 提供了方便。

人们认识的基因还不够全面, 特别是对生物发生、发育及病理生理^[5]过程中某些新的功能基因和调控作用认识不足。差异显示技术的发现为在该领域中寻找新基因提供了有用的工具。随着该方法在实践中的不断改进, 大大简化了其操作程序, 提高了灵敏度, 使该方法更简便易行。因此, 差异显示技术在研究生物进化、损伤修复、癌变及治疗反应过程中具有重要意义。目前, 该方法不仅可在生物医学领域揭示发病规律、生长发育及某些刺激引起的不同基因表达, 而且也可应用于生命科学的其他领域, 相信对揭示生物界基因表达调控的奥秘将起重要的作用。

致谢 承蒙中国科学院微生物研究所生物新技术中心主任王永立教授指导、审阅, 特致感谢。

参 考 文 献

- [1] Liang P, Pardee A B. *Science*, 1992, **257**: 967 ~ 971.
- [2] Shoham N C, Arad T, Rosin-Abersfeld R, *et al.* *Biotechniques*, 1996, **20** (2): 182 ~ 184.
- [3] Zegzouti H. *Plant molecular Biology Reporter*, 1997, **15**: 236 ~ 245.
- [4] Miele G, MacRae L, McBride D, *et al.* *Biotechniques*, 1998, **25** (1): 138 ~ 144.
- [5] Cirelli C, Tononi G. *J Sleep Res*, 1999, **81**: 44 ~ 52.