

快速、有效筛选新的功能基因——差异显示技术

王 夏

(中国科学院微生物研究所基因工程新技术中心 北京 100080)

摘要: 真核生物 mRNA 差异显示技术 (Differential Display) 的创立及其对该技术的一系列改进, 为研究与生殖、发育、细胞分化、癌变、病变、衰老、程序化死亡及抗逆性与抗病性等生命过程有关的基因的差异表达, 以及有关基因的分子克隆提供了有效工具。本文将简要叙述差异显示技术的优越性、主要缺陷、技术改进等方面的研究进展, 和具体操作的注意事项。

关键词: 真核生物 mRNA 差异显示技术

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0112-03

高等生物大约有 100,000 个不同的基因, 然而, 在任一细胞中表达的基因仅占总数的 15%, 即 15000。哪些基因在何生长发育阶段以及在何种生理状态下表达, 决定了整个生命过程, 包括发育与分化、内环境稳定 (homeostans)、对逆境反应、细胞周期调控、衰老乃至程序化死亡^[1]。基因表达的变化是调控生命活动过程的核心机制^[1]。因此, 通过比较同一类细胞在不同生理条件下或在不同生长发育阶段的基因表达差异, 可为分析生命活动过程提供重要信息, 这就决定了该领域成为分子生物学的研究热点之一。该领域的常规技术有减法杂交^[2]或差异杂交^[3]、Nuclear-Run-On^[4]和蛋白质双向电泳技术^[5]。减法杂交只能检测基因表达的质变而不能检测量变, 即只能检测在特定类型细胞中表达而在另一类细胞中不表达的基因, 不能检测表达强弱的变化^[4]。故很难以此法分离低丰度的 mRNA。此外, 该方法对 mRNA 的需要量大, 且费时费力。Nuclear-Run-On 方法只能检测出已知基因的表达。蛋白质双向电泳技术则是利用反向遗传学原理研究基因表达的第一步。然而, 低丰度 mRNA 表达的蛋白含量太低时, 则无从分辨。Liang 和 Pardee^[1]于 1992 年创立的差异显示技术 (DDRT-PCR) 成功克服了上述三种常规方法的不足, 自创立以来, 一直进行着研究改进。已有几个实验小组成功应用 DDRT-PCR 分离了各种生物状态中表达差异的基因, 包括动物即人类癌症、心脏病、糖尿病、胚胎发育、脑发育及生长因子调节。此外, 该技术亦已成功应用于与植物胚胎发育、无融与生殖、形态发生、果实发育、信号传导、植物抗逆与抗病、植物与真菌的互作有关的基因的比较鉴定与克隆。

1 DDRT-PCR 的主要原理

利用真核细胞 mRNA 3'-poly (A)⁺ 尾, 选取 T7T₁₂MN (M = A/C/G, N = A/C/G/T) 作为锚定引物与 mRNA 的 poly (A)⁺ 尾结合并锚定紧靠 poly (A)⁺ 尾的两个碱基, 在反转录酶作用下起 mRNA 群体的反转录。MN 共有 12 种不同的组合, 因此锚定引物 T7T₁₂

MN 共有 12 种, 每种 T7T₁₂MN 均能识别一类特定的 mRNA, 这样, 总 mRNA 群体将分成 12 种可被 12 种 T7T₁₂MN 所识别的 mRNA 亚群体。因此, 12 种 T7T₁₂MN 锚定引物即可将总 mRNA 群体全部反转录为 cDNA。如果 5'-端引物在 mRNA (cDNA) 上的识别位点距 poly (A)⁺ 尾在 2-3kb 范围内, 则任一 cDNA 可通过 PCR 而得以扩增。对于给定的 5'-端随机引物, 它在给定 mRNA 的识别位点至锚定位点的距离是固定的。因此, 不同 mRNA 的扩增产物大小和序列就不同。由于扩增的 cDNA 片段被荧光标记, 我们可以利用 Genomyx SC 荧光扫描系统检测出 2kb-300bp 的片段在聚丙烯酰胺胶中以片段大小呈梯度分布。从聚丙烯酰胺胶中回收特异 cDNA 片段, 经再次 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测并以 Northern blot 排除假阳性后再予以克隆。以差异表达的 cDNA 片段位探针, 便可从 cDNA 文库或基因组文库中筛选全长 cDNA 序列或全基因。

2 实验操作的具体步骤及注意事项

2.1 实验操作的具体步骤

2.1.1 总 RNA 的制备: 按试剂盒提供的方法或按《分子克隆试验指南》提供的方法提取总 RNA, 以 RNase-free DNase I (终浓度 80,000 U/L) 除去其中污染的 DNA, 经甲醛变性凝胶电泳鉴定其完整性, 并以紫外分光光度及检测其纯度。

2.1.2 逆转录反应: 选择锚定引物 [T7 (dT₁₂) AP (anchored primers, AP)], 以总 RNA 为模板进行逆转录反应, 每管反应体系如下: 总 RNA 1.0 μ g, AP 4pmol, 70 $^{\circ}$ C 5min, 冰上放置 3min, 加入 50 mmol/L Tris-HCl (PH8.3), 75 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L DTT, 25 μ mol/L dNTPmix (1: 1: 1: 1), SuperScript II 60 Units, 总反应体系 20 μ L。42 $^{\circ}$ C 5min, 50 $^{\circ}$ C 50min, 70 $^{\circ}$ C 15min。

2.1.3 荧光标记差异显示 PCR: 选取与逆转录引物序列相同的带荧光标记的锚定引物 [TMR-T7 (dT₁₂) AP], 任选一随机引物, 以逆转录产物为模板, 进行 PCR 反应。反应体系包括: 20 mmol/L Tris-HCl (PH 8.4), 50 mmol/L KCl, 3.75mmol/L MgCl₂, 逆转录产物 3.0 μ L, 50 μ mol/L dNTP mix (1: 1: 1: 1), 0.35 μ mol/L 5'随机引物, 0.35 μ mol/L 3'锚定引物, Ampli Taq 0.5 Units, 总反应体系 10 μ L。95 $^{\circ}$ C 2min。94 $^{\circ}$ C 15s, 50 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 4 个循环; 94 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

2.1.4 分离差异显示片段: 配置 5.6% 变性聚丙烯酰胺胶, 胶厚 0.25mm, 大小 61 \times 33cm。将 PCR 产物加 3.0 μ L 上样缓冲液, 95 $^{\circ}$ C 变性后上样。3,000V、100W、55 $^{\circ}$ C 电泳 4.5h。干胶后置于 Genomyx SC 扫描, 用系统所带的 AcquireSC program 软件分析处理扫描结果。

2.1.5 回收差异条带: 用 AcquireSC program 软件将差异条带定位, 用一次性手术刀片切割下所需条带, 置于 30 μ L 去离子水中, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30~60min, 备用。

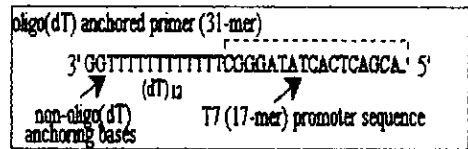
2.1.6 差异条带的再扩增: 以经上述处理的回收条带为模板, T7 启动子 22-mer、反 M13 (-48) 24-mer 为引物, 进行再扩增反应: 模板 2.0 μ L, 20 mmol/L Tris-HCl (PH8.4), 50mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 20 μ mol/L dNTP mix (1: 1: 1: 1), 0.2 μ mol/L T7, 0.2 μ mol/L M13-r, AmpliTaq 1.0 Units, 总反应体系 20 μ L。反应条件同差异显示 PCR。

2.2 注意事项

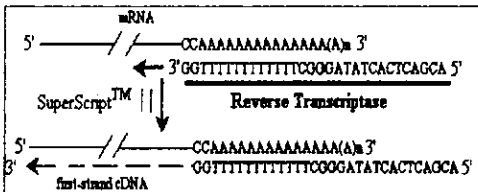
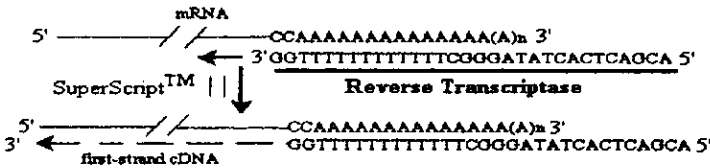
2.2.1 RNA 的质量: 差异显示实验要求 RNA 质量的重点是其完整性, 在提取 RNA 的

Detailed View of Priming Reactions

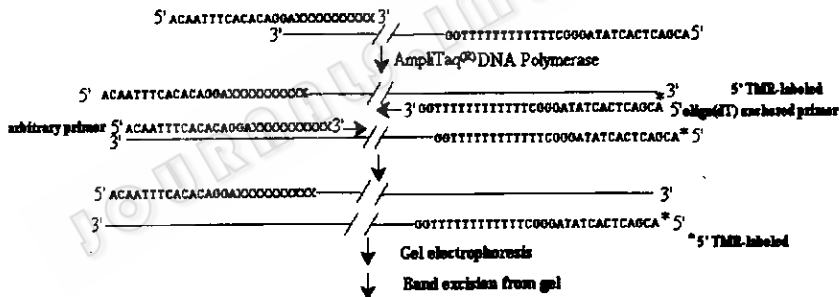
b



I. First-strand cDNA synthesis (RT rxn.)



II. Synthesis of double-strand cDNA fragments (DD-PCR)



DD 实验原理流程图

过程中要求不能降解；其次，才是 OD260 与 OD280 的比值；从组织中制备的 RNA 一般没有显著 DNA 污染。而用经历了自发或诱导细胞程序性死亡的细胞系制备的 RNA 则常常有降解的基因组 DNA 片段污染。从转染的细胞中制备的 RNA 几乎总是被转染所使用的 DNA 片段所污染。因此，提完的 RNA 应用无 RNase 的 DNase 处理或用 oligo (dT) 层析法制备 poly (A)⁺ RNA 除去 DNA 片段。

2.2.2 试剂的选择：除了实验设备本身带的引物试剂盒外，需准备的就是反转录酶和 Taq 酶；经过本实验室长期的摸索、实践，建议使用 Invitrogen 公司的 Superscript II 反转录酶和 Recombinant Taq 酶。制备变性聚丙烯酰胺胶时要用新鲜的过硫酸胺，以保证聚合的均匀。

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具有重要意义。目前，该方法不仅可在生物医学领域解释发病规律、生长发育及某些刺激引起的不同基因表达，而且也可应用与生命科学的其他领域。（参考文献略）