

## 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生物新技术中心 北京 100080)

**摘要:**真核生物 mRNA 差异显示技术 (mRNA 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。本文将就引物的问题进行讨论。

**关键词:** 锚定引物 随机引物

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0110-03

差异显示 (DD) (Liang and Pardee 1992), 或根据 PCR 命名, 称之为 DDRT-PCR (Bauer *et al.* 1993; Liang *et al.* 1995); 是利用真核细胞 mRNA<sup>3'</sup>-poly (A) 尾, 用锚定引物 (T12MN (M = A/C/G, N = A/C/G/T)) 与 mRNA 的 poly (A) 尾结合并锚定紧靠 poly (A) 的两个碱基, 在反转录酶作用下启动 mRNA 群体的反转录。如果 5'-端引物 (RAPD 引物或 DDRT-PCR 专用引物或特异引物) 在 mRNA (cDNA) 上的识别位点距 poly (A)<sup>+</sup> 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 Genomix 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 片段为探针, 便可从 cDNA 文库或基因组文库中筛选全长 cDNA 序列或全基因。

随着实验深入, 该项技术的缺陷也日趋暴露, 主要表现为: (1) 所得特异性 cDNA 片段克隆假阳性的比例高<sup>[1]</sup>。主要原因有 3 方面, ①总 RNA 虽经 DNase I 处理, 但仍有微量 DNA 污染<sup>[2]</sup>, ②序列胶中显示的一条特异 cDNA 带中可能含有放射自显影所检测不到的重叠带 (标记或未被标记的异源序列, 包括基因组组成性表达的 cDNA 片段)。业已证明, 从序列胶中回收的单一 cDNA 带中含有至少 3 种不同的序列<sup>[3-5]</sup>。由于再次扩增尤其当未获得足够克隆所需的 DNA 量而连续两次 PCR 扩增时, 这些非专一性 cDNA 的比例将极大提高。因此, 这些 PCR 产物被克隆后, 插入无关序列的克隆将占相当比例<sup>[2]</sup>。③有些特异 cDNA 片段太短, 在 Northern blot 检测时往往得不到杂交信号, 误认为是假阳性。(2) cDNA 产物的质量往往较低, 在序列胶中常呈 Smear 状态<sup>[6]</sup>。(3) cDNA 的扩增产物的量不仅取决于 mRNA 丰度, 也取决于引物与模板之间的特定匹配情况。这样, 即使是高丰度的 mRNA, 由于随机引物与之匹配不适合, 其扩增产物的量将少于用丰度虽低但与引物匹配良好的模板扩出的量, 因此导致对基因表达差异的错误认识。

收稿日期: 2003-03-14

自该技术 1992 年首次建立以来, 学者们对此做出了很大改进, 大大克服了上述部分缺陷, 本篇仅从引物方面简述如下。

## 1 锚定引物的改进

常规 DDRT-PCR 用非简并或简并的 2 个碱基其锚定作用的 Oligo (dT)  $T_{12}MN$  (M、N 表示 4 个碱基中的一种, M 不能为 T), 如  $T_{12}CA$  引物, 将覆盖 1/12 的 mRNA 群体, 用这个引物进行反转录, 将获得 1/12 的 cDNA 亚群体。因此要全面分析所有 mRNA 的差异, 工作量太大, 因为据报道,  $T_{12}MN$  与至少 20 种随机引物结合, 要进行 240 次 PCR 反应 (配对组织/细胞越多, 进行 PCR 的次数就越多), 而且用其中的  $T_{12}MT$  往往导致差显过程中序列分析胶上的 Smear 状态<sup>[6]</sup>。在实验中发现 5' 端引物  $T_{12}MN$  在只改变引物的 M 时, 扩增结果不受影响, 但 N 碱基的改变直接导致扩增结果的改变, 因此, 决定引物特异性的碱基是 N, 而不是 M。故将锚定引物改为  $T_{12}MA$ ,  $T_{12}MG$ ,  $T_{12}MC$ ,  $T_{12}MT$  (M = A/C/G) (Liang and Pardee 1992) 4 种简并引物。显然, 4 种简并引物仅将总 RNA 群体分为 4 个亚群体, 因此大大减少了 DDRT-PCR 的工作量, 但结果却不甚满意。因为无锚定碱基的 Oligo (dT) 在反转录和 PCR 过程中的锚定作用具有很大的随机性, 因此同一个 PCR 扩增反应中同一个模板扩增的产物可能是大小不同的 cDNA 片段的混合体。而且,  $T_{12}MT$  的使用仍难免 Smear 状态。在 4 种简并引物的基础上, 改用单碱基锚定引物  $T_{12}M$  (M = A/C/G) (Liang, *et al.* 1994), 该引物将总 RNA 群体分为 3 个亚群体, 即用 3 种  $T_{12}M$  将总 RNA 群体全部反转录为 cDNA。这不仅大大减少了 DDRT-PCR 的工作量、避免 Smear 状态, 而且能检测出用两个简并碱基时检测不到的 mRNA 亚群体。此外, 该引物大大增加了重复性, 提高了分辨率。这里特地补充一种锚定引物, 它基本上属于双简并碱基的锚定引物, 但它不同的地方在于在  $T_{12}MN$  之前加上了一段 T 7 Promoter sequence, 使整个锚定引物由原来的 12~14 个碱基延长到 29~31 个碱基, 不仅增加了位点, 同时为后面的 PCR 条件的严谨性提供了依据和保证。

## 2 5'端引物 (随机引物) 的改进 DDRT-PCR 的专用引物

在 PCR 中尽可能多的扩增 cDNA 的种类是 5'-端引物改进的关键。用于反转录的锚定引物作为这一步的下游引物。上游引物是 10-mer 随机序列寡核苷酸; 并非每一个 10-mer 均是合适的, 必须通过实验加以证实。各种引物不具有自我互补功能及相同的 GC 含量 (50%), 确保不含自身复性或者形成茎-环结构, 而且 3' 端以 G 或 C 结尾, 是至关重要的因素 (Bauer, *et al.* 1993)。为在随后的电泳分离中获得最多数量的片段, 需要最佳引物退火条件。Bauer 等<sup>[7]</sup> 设计了如下 26 个 DDRT-PCR 专用引物: 1 TACAACGAGG, 2 TGGATTGGTC, 3 CTTTCTACCC, 4 TTTTGGCTCC, 5 GGAACCAATC, 6 AAACCTCCGTC, 7 TCGATACAGG, 8 TGGTAAAGGG, 9 TCGGTCATAG, 10 GGTACTAAGG, 11 TACCTAAGCG, 12 CTGCTTGATG, 13 GTTTTCGCAG, 14 GATCAAGTCC, 15 GATCCAGTAC, 16 GATCACGTAC, 17 GATCTGACAC, 18 GATCTCAGAC, 19 GATCATAGCC, 20 GATCAATCCG, 21 GATCTAACCG, 22 GATCGCATTG, 23 GATCTGACTG, 24 GATCATGGTC, 25 GATCATAGCG, 26 GATCTAAGGC。

### 3 特异引物

针对特定基因的差显,以特异引物作为5'-端引物将会带来满意的效果。Joshi等利用热激蛋白HSP70多基因家族专一性引物作为5'-端引物进行扩增,并用6%的PAGE变性胶进行DDRT分析,结果表明特异性扩增效果良好,在短时间内便分离得到了因热激诱导而特异性表达的3个cDNA片段。Ping Song等以棉花胚珠和纤维为材料,用两种特异引物进行扩增,一种引物是植物蛋白中富有的谷氨酸、亮氨酸和丝氨酸的三种密码子随机排列而设计的引物,另一种是克隆的纤维单一性cDNA片段,利用特异性扩增,迅速而有效的分离了与纤维发育有关的特异性cDNA片段,并继之克隆了全基因。在医学和肿瘤发生及某些遗传疾病有关的基因的鉴定与克隆中起到了重要作用。

### 4 含次黄嘌呤碱基的通用引物

该引物能扩增出更多的带且很少产生错配(Rohrwild *et al.* Unpublished)。

### 5 较长的随机引物(长序列( $\geq 20\text{bp}$ )专一性引物)

以长序列( $\geq 20\text{bp}$ )专一性引物作为5'-端引物进行扩增,结果表明该方法灵敏而又可靠的同时迅速检测基因在转录水平的加强或减弱(关闭)。较长的随机引物指长度在25~28mer之间的引物,它能大大增加DDRT-PCR试验结果的可重复性(Zhao *et al.* 1995)。由于引物的长度增加,随机引物的复性温度也升高,引物复性的严谨性相对增强,用相对较少的cDNA亚组份即能扩增出特异性高和可重复性好的扩增产物(Malhotra *et al.* 1998)。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。然而,它也能使DDRT-PCR扩增条带明显减少(Zhao *et al.* 1998)。

和锚定引物一样,这里也特地提一下一种随机引物,它是由M13 Reverse Sequence和Arbitrary Sequence组成,也就是在前面提到的26种5'-端引物前加上一段通用引物序列,使得PCR中的复性温度与上述提及的加了T7 Promoter sequence的锚定引物的复性温度一致,使整个DDRT-PCR的体系日趋严谨。而且T7和M13均来自噬菌体,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。

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,特致衷心感谢。

### 参考文献

- [1] Zegzouti H. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1997, 15: 236~245
- [2] Liu C, Raghobama K G. *Biotechniques*, 1996, 20: 576~580.
- [3] Callard D. *Biotechniques*, 1994, 16: 1096~1103.
- [4] Li F. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 1764~1765.
- [5] Sager R A. *FASEB J*, 1993, 7: 964~970.
- [6] Shoham N G. *Biotechniques*, 1996, 20 (2): 182~184.
- [7] Bauer D. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21 (18): 4272~4280.