

功能基因的分离新方法专栏

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:自1992年一种针对从特定细胞和组织类型的 mRNA 来源样品用 PCR 技术对其中的大量 cDNA 同时进行扩增和显示的实验方法,即差异显示(DDRT-PCR)被报道以来,尽管取得了不少成功的实例,但还是一个存在许多问题有待完善的实验方法;假阳性的问题便首当其冲。在前面的文章中,我们重点讨论了引物的选择、PCR 条件的改进、凝胶电泳的条件、再扩增引物的选择等避免假阳性条带的产生,不容忽视地是在标记问题上也是避免假阳性的关键一环。

关键词:同位素, 荧光

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 04-0123-03

差异显示技术是一项既有很高理论期望值又有许多问题尚未解决的技术方法。应用差异显示技术的目标在于显示细胞的全部的 mRNA。但目前存在的问题的本质和范围尚未完全界定。因此,在过去几年中,已有许多对于过去最初方法的技术改进被报道,技术改进的重点在于增加对于差异表达基因鉴定的效率和降低对于基因鉴定的工作量两方面 (Sompayrac et al. 1995; Zhao et al. 1995; Liang and Pardee 1997), 如对于 DDRT-PCR 技术的扩增效率和引物配对的特异性的疑问等。而同时在另一个方面导致差异显示技术止步不前的因素正被忽略,或是一直就没有被得到重视,这就是从 mRNA 到 cDNA 到最后的扩增产物的标记的问题,自该项技术发明以来,同位素或放射自显影的应用一直伴随着 DDRT-PCR 的成长;当然,EB 染色、银染等方法的使用也成功的分离出有意义的基因片段,但作为与聚丙烯酰胺、非聚丙烯酰胺凝胶电泳相配合使用来说,放射自显影比起 EB 染色、银染等方法要准确、方便、灵敏的多。

Liang 和 Pardee 以及 Oh 用 α - ^{35}S -dATP 标记,引放射性强度太弱,故需要较长的曝光时间(通常是几天),而且, ^{35}S 容易挥发并污染 PCR 仪,尤其当用薄壁管扩增时。用 α - ^{32}P -dCTP 标记则显著缩短曝光时间,增加条带的强度,遗憾的是条带太粗,以至于与相邻的条带合在一起难以分辨,同时 α - ^{32}P -dCTP 的操作需要严密的防护。 ^{32}P -dATP 的灵敏度很高,但同样存在 ^{32}P -dCTP 的其他缺点。事实证明,以 $5\mu\text{Ci}$ 的 α - ^{32}P -dATP 标记,比用 $10\mu\text{Ci}$ 的 α - ^{35}S -dATP 显著缩短曝光时间(16~24h),而且灵敏度和分辨率亦显著提高。

具体的操作如下:PCR 扩增时将标记物与反应液一起混匀,为方便起见,可将除任意引物之外的其他成分集中在一个管中制备,混合均匀后再分装到各个反应管中,然后再分别加引物,这样能够避免加样过程中带来的误差,使差显结果能更加地反映

* 联系人 Tel: 020-84113799, E-mail: ls30@zsu.edu.cn

收稿日期: 2003-03-11, 修回日期: 2002-04-30

客观存在的基因表达。取 PCR Products 与上样缓冲液混合,在真空条件下加热浓缩 10min,至体积 3~4 μ L,于冰上骤冷,准备上样;加样前用注射器将凝胶孔中的尿素及碎胶冲洗干净,以利于得到高分辨率的差异显示 cDNA 电泳图。3,000 V、100W、52 $^{\circ}$ C 电泳 4.5h;小心的取走硅化的玻璃板,再胶上铺一张 Whatman 3mm 滤纸,小心在滤纸和胶之间不能夹入气泡。室温干燥 1h。将干燥的胶夹在两张 Whatman 3mm 滤纸之间保存;用放射性墨水或在 X 光胶片和干燥的胶上做记号以便确定方向,将胶与底片置 X 光片盒内,室温下曝光 24~48h;冲洗胶片,寻找差异显示的条带,做记号标记,并在胶上标出相应的位置;将差异显示的条带所对应的胶条及滤纸用一次性无菌刀片切下,至于微量离心管中,加 100 μ L 0.1 \times TE 室温孵育 30min;将管置沸水中煮 15min,最好将盖子与管子用封口膜固定好,以免煮沸时崩开;高速离心 2min 以沉淀胶块和纸屑,将上清移入一新管中,加醋酸钠和 100%乙醇沉淀过夜;用冷的 75%的乙醇洗两次,室温干燥,最后溶于 10 μ L 0.1 \times TE 中,备用。

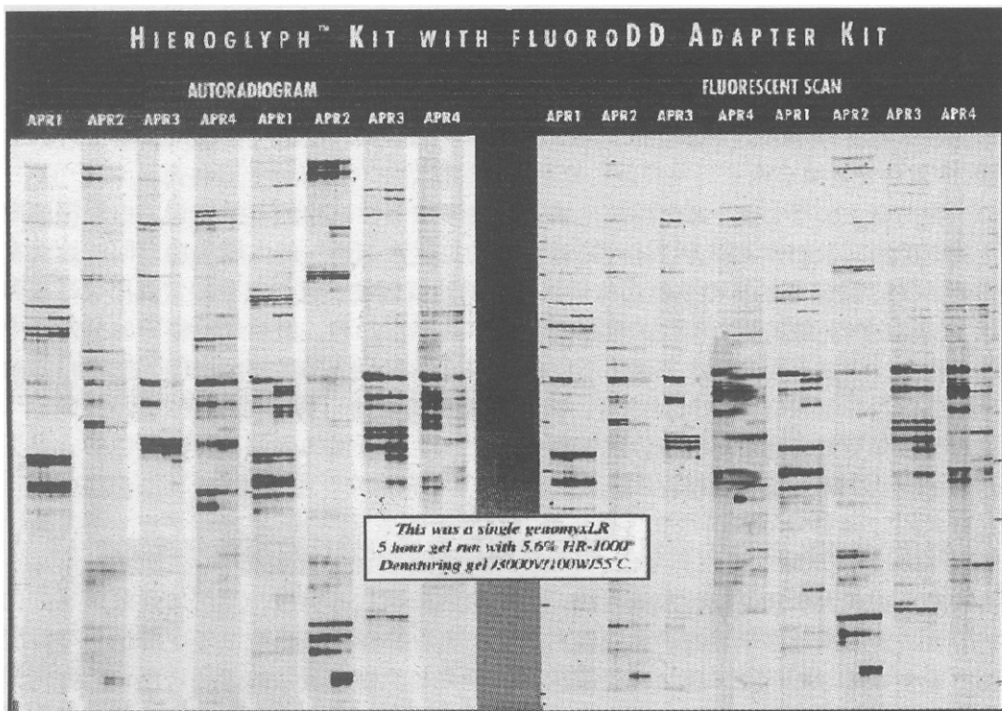
不难发现,用同位素标记后的差异显示条带的定位与切割步骤相当繁琐,且因为同位素在显色过程中自身的掺入,使得有些清晰的差异显示条带变得不容易辨认,导致最终阳性率的下降。荧光标记在差异显示技术中的应用在保证灵敏度的同时,很好的解决了同位素标记所带来的种种不便,并且具备下述的 6 种优点:(1)快速,电泳后立即得到结果;(2)灵敏度高,结果中背景干扰降低;(3)准确,结果中无假阳性干扰;(4)方便,切胶能快速准确完成;(5)安全紧凑,能较随意安排实验;(6)极低的成本,同位素的 1/4。下面是具体的实验:

实验材料是人胎肝 (HFL) 和成人肝 (HAL) 总 RNA。RNA 经过 DNA 酶 I 处理,酚/氯仿抽提,氯化锂乙醇沉淀。按照第二篇文献报道进行反转录。开始差异显示反应时,用标记着荧光尾端 tetramethylrhodamine (TMR) 的 fluoroDD 锚定引物(随机引物没有标记)。经过 DD-PCR 扩增,fluoroDD 样品变性后,在 GenomxLR 仪器上用 5.6%的 HR-1000 变性胶,3000V,52 $^{\circ}$ C,100W 电泳 5h,立即上 GenomxSC 观察差异显示,不用等待漫长的放射自显影过程。为了比较荧光扫描和放射自显影, [32 P] dATP 在扩增的同时掺入到 DD-PCR 产物中。如图所示,两者非常相似,都显示出极好的泳道重复性,极强的信号,大片段 DNA 好的再现。但两种方法还是有一些差别。差别来自标记物掺入方法的不同。 [32 P] dATP 掺入标记 DNA,引起所有在 DD-PCR 中扩增的 cDNA 在放射自显影时都是可见的,包括从随机-随机引物中产生的。但在 fluoroDD 系统中由于荧光标记锚定引物的使用,只有从带 poly (A) 尾部的 mRNA 转录的 cDNA 才能在扫描时可见。

另外,荧光标记的结果比同位素标记的结果更加简明易读;当时用同位素掺入时,HR-1000 变性胶上链分开使得放射自显影结果中条带成为两条甚至更多。测序结果表明它们是同一 cDNA 的互补链。荧光标记在锚定引物上,所以只有一条 cDNA 链被标记上并能在扫描图像中可见。这样能减少浪费在确认 cDNA 上的时间和试剂。

差异显示后可以用 Genomx Virtual Grid 系统从 fluoroDD 胶中取出感兴趣的 cDNA,极细的 Grid 能准确的定位 cDNA,使其在干胶中被切出。切完胶后可以立即在 Genomx-SC 中再扫描仪检查切带的准确性,不必再等待漫长的放射自显影。

fluoroDD 系统能提供一个快速安全的程序得到差异显示结果,而同位素 DD-PCR 必须在半衰期内及时电泳,要求在下一步反应之前必须选择跑胶还是单(下转第 122 页)



个胶的反应。有了荧光标记，就可以在两天之内完成逆转录、DD-PCR 反应、聚丙烯酰胺变性凝胶电泳、扫描成像、切带、再扩增等一系列实验。

总之，fluoroDD 是目前检测特定细胞表达的几乎所有基因，及鉴定不同细胞类型种基因表达差异的最灵活和最完善的方法。该方法目前在许多的基础实验室已经建立，不久的将来该方法能在应用研究及实验室诊断研究中得到更加广泛应用。

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，特致衷心感谢。