文章编号:1000-5404(2008)14-1393-02

技术方法

银染mRNA差异显示方法的改进与优化

杨荣华,黄其林 (第三军医大学新桥医院神经外科,重庆 400037)

摘 要:目的 对银染mRNA差异显示方法进行改进与优化,建立具有良好重复性和稳定性的银染mRNA差异显示新方法。**方法** 通过对银染mRNA差异显示方法中的PCR参数进行优化以及凝胶电泳和加样方式进行改进。**结果** 经改进与优化的银染mRNA差异显示方法具有良好的重复性、稳定性,差异条带清晰易辨。**结论** 经改进和优化的银染mRNA差异显示方法具有良好的重复性、稳定性,可以代替传统的放射性同位素方法,应用于基因差异表达的研究。

传统的mRNA差异显示多采用放射性同位素标记的方法进行,虽然具有灵敏度高的特点,但此方法费时费力,易导致假阳性、污染环境,对人体有害。因此建立非放射性同位素的mRNA差异显示方法受到了重视。由于银染方法的敏感性与放射性同位素标记方法相当,因此备受关注。然而,银染mRNA差异显示方法目前还不完善。为此,作者对银染mRNA差异显示方法进行改进与优化,新方法具有良好的重复性和稳定性,效果满意。

1 材料与方法

1.1 主要材料

转染了野生型和突变型早老素-1(presenilin 1, PS-1)经RA诱导的PC12细胞,细胞总RNA提取试剂盒(Promega公司),MMLV诱导cDNA第1链合成试剂盒,PCR扩增试剂盒,第3代差异显示引物(上海生工生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞总RNA的提取及cDNA第1链合成 细胞总RNA提取及cDNA第1链合成均按相应的试剂盒说明书进行。

1.2.2 PCR反应参数不同对差异显示的影响 PCR反应参数采用2种程序,程序1为传统的、放射性同位素标记方法所采用的参数:94 ℃ 1 min→(94 ℃ 30 s→40 ℃ 1.5 min→72 ℃ 1 min,40个循环)→72 ℃ 6 min。程序2为新建的、适用于银染方法的参数:94 ℃ 1 min→(94 ℃ 30 s→40 ℃ 1.5 min→72 ℃ 1 min,5个循环)→(94 ℃ 30 s→55 ℃ 1.5 min→72 ℃ 1 min,共35个循环)→72 ℃ 6 min。将PCR产物通过电泳分离,银染进行差异显示。

1.2.3 凝胶聚合时间不同对差异显示的影响 配制6%变性聚丙烯酰胺凝胶,灌胶后置于室温下聚合,采用2种不同聚合程度的凝胶进行电泳:一是凝胶聚合至其顶部出现折光线即开始电泳;二是当顶部折光线出现30 min后再进行电泳。电泳后银染显示。

1.2.4 上样方法不同对差异显示的影响 凝胶聚合至其顶部折光线出现30 min后,采用不同的加样顺序进行加样:①将DNA混合液用微量加样器缓缓加入加样孔内,再将1×TBE缓冲液用细针头贴着玻璃板缓缓加入到加样孔内,继续添加1×TBE缓冲液灌满垂直电泳槽;②先灌满垂直电泳槽,再将DNA混合液用微量加样器缓缓加入加样孔内。电泳后银染显示。

DNA条带的银染显示、差异条带的切取回收、二次PCR扩增、TA克隆、细菌转化、质粒酶切鉴定、测序、反向Northern杂交验证等均按常规方法和试剂盒说明书进行。

2 结果

2.1 不同PCR扩增参数对差异显示的影响

从图1可见程序1扩增的条带明显多于程序2,但背景不清楚,差异条带不好分辨;程序2扩增的条带背景清楚,差异条带明显可辨。可见PCR反应参数对差异显示有明显影响。

2.2 不同聚合时间对差异显示的影响

如凝胶聚合至顶部出现折光线即进行电泳,所显示的DNA条带不均一,呈波浪扭曲形;如凝胶聚合至折光线出现30 min后再进行电泳,整个凝胶的DNA条带都比较均一平直。可见凝胶聚合程度不同会对差异显示产生影响。

2.3 不同上样方法进行凝胶电泳对差异显示的影响

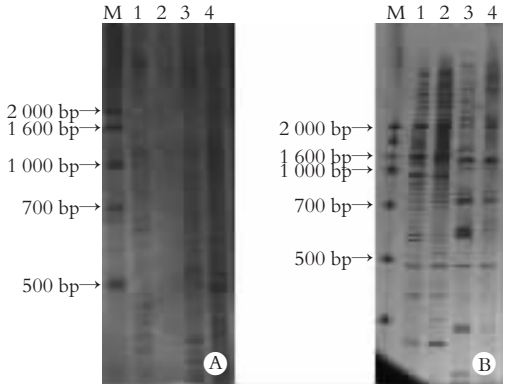
先加缓冲液再上样进行电泳,结果电泳条带较窄,且条带之间宽窄不一,形状各异,差异条带不易分辨;而先加样再加入缓冲液进行电泳,结果电泳条带比较均一,差异条带清晰可辨。可见不同加样方法也会对差异显示产生影响。

基金项目:国家自然科学基金(30070274)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070274)

作者简介:杨荣华,男,云南省昆明市人,硕士,主治医师,主要从事神经退行性疾病方面的研究,现在昆明第533医院外一科。电话:(0871)5627647,E-mail:yangrhcctv@163.com

通信作者:黄其林,电话:(023)68774410,E-mail:hqlxqmd@163.com

收稿日期:2007-10-30;**修回日期**:2008-03-24



A:程序1;B:程序2

M:标准;1-4:相同引物不同PCR参数下扩增产物

图1 不同PCR参数下扩增产物的凝胶电泳图

3 讨论

传统的mRNA差异显示技术[1](mRNA differential display)多采用放射性同位素标记的方法进行,虽然具有灵敏度高的特点,但其缺陷也是显见的:①在切取差异条带时需比照放射性自显影的X线片进行,具有一定盲目性;且放射性自显影需长时间曝光(48~72 h),其间凝胶易收缩变形,在差异条带切取时易致假阳性。②为了提高放射性同位素标记脱氧核苷酸(多采用^{32}S-dTAP)的掺入比例,往往降低其他种类脱氧核苷酸的浓度,进行PCR反应的dNTPs浓度往往低于标准PCR反应推荐的浓度,一些低拷贝数的基因不能被展示出来,造成低拷贝基因的遗漏。③使用放射性同位素污染环境,对人体有害。对此,非同位素的差异显示方法受到重视,其中银染方法的敏感性与放射性同位素标记方法相当,可以达到与放射性同位素类似的效果,且不需要特殊的仪器设备,为许多学者所推崇。Lohmann等[2]首先报道应用银染方法来显示差异条带,取得了成功。但总体上看,银染mRNA差异显示方法没有得到很好应用,主要是银染方法还不完善,一些成熟的用于放射性同位素的方法不适用于银染差异显示,如Lohmann等[2]将同位素的方法用于银染差异显示不能得到任何条带。Doss等[3]研究认为银染差异显示必须将dNTPs浓度提高至200 μmol/L方能产生清晰的条带。但据我们的经验,除了需注意上述问题外,调整Mg^{2+}的浓度和PCR参数也很重要,因为dNTPs是反应中磷酸基团的主要来源,其浓度改变后会影响有效Mg^{2+}的浓度。当dNTPs浓度改变时,必须调整Mg^{2+}的浓度,作者认为采用200 μmol/L dNTPs,1.5 mmol/L Mg^{2+}是适宜的浓度;而对于PCR反应参数,采用程序2的参数可以很好的进行银染差异显示,重复性好,同时条带清晰、背景清楚。

此外,凝胶聚合程度是进行差异显示容易忽视的问题。一般认为只要凝胶顶部出现比较明显的折光线就可开始电泳,但作者认为在进行差异显示时最好在折光线出现30 min后再进行电泳,以保证凝胶聚合完全,增加可比性和稳定性。此外我们先加样再加缓冲液的方法可以利用DNA混合液密度高于缓冲液的特点,使DNA混合液自然沉积在加样孔底部,保证了样品之间电泳起始位置的均一性;有效避免了先加缓冲液后加样导致的样品弥散,这种方法可以有效减少差异显示的假阳性。此外,作者还注意了以下方面:①每次染色采用新配制的溶液,因为硝酸银溶液容易分解、甲醛容易发生氧化还原反应,存放过长的银染溶液易失效。②使用洁净的容器进行凝胶染色和盛放溶液,减少杂质干扰。③整个银染过程在摇床上进行,以保证染色均匀。应用上述改进与优化的银染mRNA差异显示方法,作者成功地寻找到一些RA诱导PC12细胞转染突变型PS-1后出现的差异表达基因。我们认为改良与优化的银染差异显示方法作为一种非同位素的mRNA差异显示方法,具有简便、直观、准确等优点,实验过程中不需要特殊的仪器设备,是一项十分有益、有用、值得推广的技术方法。

关键词:mRNA差异显示;银染;非放射性同位素

中图法分类号:R394-33 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction[J]. Science, 1992, 257(5072): 967-971.

[2] Lohmann J, Schickle H, Bosch T C. REN display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation[J]. Biotechniques, 1995, 18(2): 200-202.

[3] Doss R P. Differential display without radioactivity——a modified procedure[J]. Biotechniques, 1996, 21(3): 410-412.

(编辑 王小寒)