文章编号:0253－3626(2003)01－0014－03

未知 KL 基因 cDNA 片段的末端快速扩增

刘北忠[1]，蒋纪恺[1]，何於娟[1]，张　彦[1]，刘小珊[2]

(1.重庆医科大学临床生化教研室；2.重庆医科大学临床学院血液科,重庆　400016)

【摘　要】目的:为研究白血病 K562 细胞中未知 KL 基因的结构与功能,对其 cDNA 片段进行全长克隆。方法:采用 3 种 RACE 策略,对未知 KL 基因的 cDNA 片段进行末端的快速扩增。结果:网上 LabOnWeb 的 instant RACE 与传统的 3′－RACE 使未知 KL 基因的 cDNA 片段向 5′末端与 3′末端各自延伸了 156bp 与 350bp。结论:通过末端快速扩增,表明白血病 K562 细胞中未知 KL 基因的全长 cDNA 大小约为 1Kb,这为我们进行该基因的全长克隆,进而研究其结构与功能奠定了基础。

【关键词】苦参碱;K562 细胞;RACE;新基因

【中国图书分类法分类号】R730.21　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－04－22

Rapid amplification of the ends of cDNA fragment from an unknown KL gene

LIU Beizhong, et al

(*Department of Clinical Biochemistry, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To do the full－length cloning of the cDNA fragment of an unknown KL gene in leukemia K562 cell for study of its structure and function. *Methods*: The ends of the cDNA fragment of the unknown KL gene were amplified using three strategies of RACE. *Results*: 5′－end of the cDNA fragment of the unknown KL gene was extended 156 base pairs by LabonWeb instance RACE online and 3′－end was extended 350 base pairs by traditional 3′－RACE. *Conclusion*: It suggests that the full length of the cDNA of the unknown KL gene in leukemia K562 cell is approximately composed of one kilo－base by RACE. It is helpful to full－length cloning of the unknown gene, also to its structure and function study.

【Key words】Matrine; K562 cell; RACE; New gene

苦参碱是中国传统中药苦参中的主要活性成分,具有多种生物学功能。在用 mRNA 差异显示逆转录 PCR 技术(DDRT－PCR)研究苦参碱对白血病 K562 细胞的诱导分化实验中,我们发现并克隆了一个新基因的 cDNA 片段[1]。提交 GenBank 数据库,获登录号为 BF154397,并将该新基因暂时命名为 KL 基因。本研究拟采用多种 cDNA 片段的末端快速扩增 rapid amplification of cDNA end, RACE)技术[2]对其进行全长克隆,以研究未知 KL 基因全长 cDNA 的一级结构,从而为新基因结构与功能的研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　K562 细胞株

由日本神户大学国际交流中心的 Eiji Tatsumi 教授惠赠。RPMI－1640(含双抗与 10% 的新生小牛血清)常规培养。

1.2　主要试剂

1.2.1　5′－Full RACE kit　购自日本 TaKaRa 公司。

1.2.2　3′－race 的引物　共 3 条(Eco－T 与两条特异性引物),Williamstone Inc. 的 Primers! For the World Wide Web 在线设计,上海生工生物工程公司合成。

1.2.3　5′－race 的引物　共 3 条(Eco－C 与两条特异性引物),设计与合成同上。

1.2.4　特异性的 5′磷酸化逆转录引物　设计与合成同上。

1.3　其它试剂

1.3.1　Taq DNA polymerase　购自上海生工、加拿大生工、Promega 及上海复华。

1.3.2　TaKaRa Ex Taq　宝生物工程大连有限公司(日本独资)。

1.3.3　M－MLV Reverse transcriptase　Promega。

1.3.4　AMV Reverse transcriptase　TakaRa。

1.3.5　Terminal Deoxynucleotidyl Transferase(TdT)　Promega 与 TakaRa。

作者介绍:刘北忠(1970－　),男,讲师,博士,主要研究方向:中药抗肿瘤的分子机制研究。

基金项目:国家自然科学基金项目(39670881 与 30171150),重庆市科委科研基金项目(02－1809)。

1.3.6 Ribonuclease H(RNase H) TakaRa。

1.3.7 dGTP,dNTP 等购自加拿大 Sangong 与 Promega。

1.4 实验方法[3~5]

1.4.1 网上 instant RACE 通过网上 LabOnWeb instant RACE,使片段迅速得到延长。

1.4.2 传统的快速扩增 cDNA 末端的 RACE 策略 对 3′-RACE,为获得特异性 PCR 产物,作者在 Frohman 报道的改进方案[3]基础上,以半巢式 PCR 进行特异性扩增。即在第一轮以 adapter-多聚 dT 引物与特异性引物 1 仅扩增 10 个循环的基础上,取部分稀释的第一轮 PCR 纯化产物(柱离心法纯化)为模板,退火温度提高 10℃,以特异性引物 2(更接近 3′末端)与同一 adapter-多聚 dT 引物进行 20 个循环的半巢式 PCR 扩增。

对 5′-RACE,在通过末端转移酶给 cDNA5′末端加上同聚 dG 的基础上,作者采用了两种方案进行 5′-RACE。一种以 Oligo$(dT)_{18}$逆转录 mRNA,然后以 adapter-同聚 C 引物分别与特异性的引物 1 及引物 2 进行半巢式 PCR 扩增。另一种则以特异性的引物 1 进行逆转录,然后再以 adapter-同聚 C 引物与特异性的引物 2 进行 PCR 扩增。

基于末端转移酶(TdT)对 DNA 单链的 3′-OH 末端加上同聚 dNTP 的催化活性高于 DNA 双链,作者又以 RNase H 特异性分解 RNA-DNA 杂交体中的 RNA 链,以求获得更高的 SScDNA 3′-OH 末端加上同聚 G 的效果,然后再分别按上述两种方法进行 5′-RACE。

1.4.3 环形 5′-RACE 按日本 TakaRa 公司开发的 5′-Full RACE kit 的有关说明进行 5′-RACE。

2 结 果

2.1 通过网上 instant RACE,使片段迅速得到延长

报告(见下)显示片段向 5′末端延长了 156bp(下划线部分),达到 656bp。

InstantRACE results:

Your sequence was extended in the 5′ end by 156 bp.

The final length of the Instant RACE result of your sequence is 656 bp.

>LabOnWeb

CCCTAAGCCTAACACCTGGATGTACATCCAATGACATGCCTTTAACAAAGCCATGTCACT

ATGATACGATGGAACACAGCAAACATATCCCCACGGTCCTTAGTTTAGTGAAGGAACTCA

GATTCTTTCCTTTCAGAAACATAAATGGATTTTAGC TTTCTTTTTCTTTTTTGCTTCCAC

ATAGATACAGGGAAAGAGCTTTATCTTTACAGAGCTTGGTTGGATTCTAGGGCCTTAGGC

AAGTATTTTACCTTCTCTAACACAGTTCCCTCATCTATGAAATGTGGTTAATAACAACCT

CTCAAGATTGTCTGCCATGAGATAACTACTGCAAATTACCTTGCACAGGTCCTGATCAAT

AGCAGGCATTAAACAATTCAGTTTCCTTAATCATATCAATACATTAAAGTTAAGAAGGCA

ATGCAAAAGAATGGAAAGAACACTGAACTTGAAGTCAAAAGACTTGGGTTCAAATTCCAG

CTGTTACTTACTCTCTTAAGCAACTATTACTTATTAACCTCCCTACCTCTGAGAATTACA

AAATGGGTATAGTAATTCCTCTATCCCAGGATTATAAGAATTAAATCATATAGATAAGTG

CTTTAAAGTGTGAAGTTCCATAAAAAAATCACTCATCGACCAGTTGCGCACCGTTG

2.2 传统 3′-RACE 经半巢式 PCR,得到一大约 500 多 bp 的扩增条带(见图 1)。通过另一对照实验(见图 2),表明该扩增产物确为半巢式 PCR 产物。

3 讨 论

新基因 KL 是在用 DDRT-PCR 技术研究苦参碱对白血病 K562 细胞的诱导分化实验中发现的,由于其在苦参碱作用 K562 细胞 2h 后表达下调,估计它的抑制与细胞分化相关,可能是一个结构未知的功能基因。该新基因潜在的功能和其 cDNA 片段的成功克隆,为研究其结构与功能提供了基础。

要理解新基因的结构与功能,仅有不完整的 cDNA 片段是不够的。通过制备特异性探针,从 K562 细胞的 cDNA 文库中钓取全长克隆或采用一定的方法将获得的 cDNA 片段向两个末端延伸是获得全长 cDNA 的两个主要策略。两种策略的适用性有所不同,后者更适合小片段的快速延长。未知 KL 基因的 cDNA 片段经 Northern blot 分析,推测其长度仅为 1kb~1.2kb 左右,故采用 RACE 策略对其进行全长克隆应更为经济有效。

通过对文库的筛选或使用简并引物进行 PCR 反应常常只能获得不完整的 cDNA 序列,为得到 cDNA 的全长,尚需克隆出其余部分。快速扩增 cDNA 末端法(rapid amplification of cDNA end, RACE)便为此而设计。运用此策略,只需知道 mRNA 内很短的一段序列即可扩增出该 cDNA 片段的 5′末端(5′-RACE)与 3′末端(3′-RACE)。

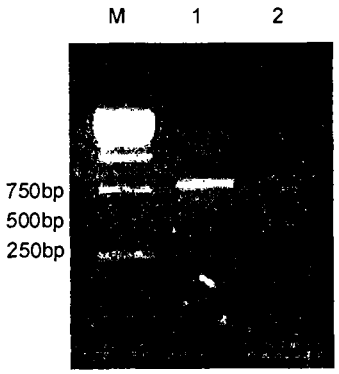


图 1　3′－RACE 及对照 1

M:DNA marker

1:result of the semi－nest PCR

2:result of the second PCR

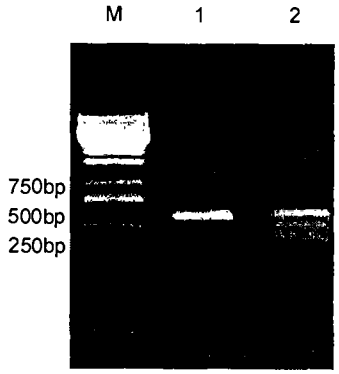


图 2　3′－RACE 及对照 2

M:DNA marker

1:result of the semi－nest PCR

2:result of the primary PCR

网上 LabOnWeb 的 instant RACE 是最快速的 RACE 策略，目前国内尚未见相关报道。为尽快得到未知基因 cDNA 的全长序列，首先进行了网上 LabOnWeb 的 instant RACE。该策略通过统计学 SAS 算法及同源性比较能较迅速(大约 1h～3h)地使目的片段向 5′与 3′末端得到延长。报告显示该未知基因的 cDNA 片段向 5′端延长了 156bp，而 3′端未获延长。

通过数学统计的算法与序列同源性的比较，进行网上自动的延长，显然比手工拼接明显地提高了速度和准确性。但由于受同源性比较数据库完整性与准确性的影响，包括重复性同源序列的影响，网上 instant RACE 的结果需要通过传统的 5′－RACE 或 TakaRa 的环形 5′－RACE 的进一步证实。要从 mRNA 获得全长的 cDNA 有许多实际的困难，为更好地扩增出 cDNA 片段的 5′末端序列，作者同时采用了传统的 5′－RACE 与日本 TakaRa 公司的 5′－Full RACE 策略进行未知 KL 基因 5′末端的快速扩增。其中，5′－Full RACE 策略由于它的试剂盒开发不久，国内还很少人运用。该策略主要是回避了传统的 5′－RACE 在单链或双链 DNA 的 3′－OH 末端加上同聚 G 比较困难的矛盾，以 5′－磷酸化修饰的引物进行特异性逆转录，经 RNase H 水解掉杂合体中的 RNA 链后，再以 T_4 RNA 连接酶将逆转录合成的 SScDNA 连接成一环状的单链结构，然后在已知的 cDNA 片段内设计两对反向的特异性引物，进行巢式 PCR，以延长 5′未知区域。

在传统的 3′－RACE 基础上，为提高 PCR 的特异性，以半巢式 PCR 进行 3′－RACE，获得了 500 多个 bp 长度的扩增引物。结合自行设计的两个对照实验，即经第一次 PCR 扩增后的产物，经纯化去引物，再以 TE 稀释 10 倍液为模板与直接以第一次 PCR 的 TE 溶 cDNA 为模板，在相同的条件下(退火温度比第一次 PCR 提高 10℃)进行 PCR 扩增，扩增的结果是经两次 PCR 扩增的条带远较只经一次 PCR 扩增的条带亮(见图 1)，表明第二次 PCR 扩增的条带是以第一次 PCR 扩增的条带为模板进行扩增的。另一个对照实验是在不改变 PCR 条件的情况下进行第一次 PCR 和低严格性的半巢式 PCR。结果低严格性半巢式 PCR 从第一次 PCR 的三条带中特异性地扩增出了一条带(见图 2)。以上两个对照实验表明了半巢式 PCR 的成功。由于 PCR 产物为 500 多 bp，扣除与原未知 cDNA 片段的重叠部分(141bp)及引物的接头部分(15bp)，3′－RACE 大约延长了 350bp。

本文以 3 种不同的 RACE 策略同时对未知 cDNA 片段进行了 3′与 5′末端的快速扩增，3 种方法互相补充，互相验证。最终，未知 KL 基因的 cDNA 片段延长为大约 1kb(500 bp＋350 bp＋156 bp)大小的完整 cDNA 片段。其大小与 Northern blot 分析结果显示的 mRNA 的估计分子量 1.0kb～1.2kb(其中含完整的多聚 A 尾巴)相符。未知 cDNA 片段的末端快速扩增是对新基因一级结构的初步研究，它为我们着手未知 KL 基因 cDNA 的全长克隆与表达，进一步研究该新基因的结构与功 (下转第 28 页)

高脂不同时间兔的血管内皮功能动态变化的报道很少。本实验结果表明,高胆固醇高脂喂养 1 周后,兔 EDD 即已发生障碍,以后随着喂养的继续,EDD 进一步加重,到 14 周时 EDD 几乎为 0。这较晏沐阳等[4]报道的兔进食高脂 2 周后 EDD 出现损害更早。而 NEDD 在高脂喂养后期才开始减退,到 8 周时与 NC 组比较有显著性差异。以上说明内皮功能失调在高脂血症早期表现为 EDD 的损害,到后期才合并 NEDD 的损害。结合髂外动脉离体实验结果、髂外动脉病理学切片动脉粥样硬化斑块积分结果,说明以在体髂外动脉血管超声评估高脂血症 AS 病变和血管功能包括 EDD 和 NEDD 是切实可靠的。

虽然该方法简便易行,但有一些方法学的问题尚急待解决,如一天中何时做更好,阻断血流的部位、压力及时间如何等。上述问题如得到了解决,该方法值得推广应用。

参 考 文 献

[1] 张湘瑜,赵水平.内皮功能失调与动脉粥样硬化[J].心血管病学进展,1999;2(4):241-244.

[2] Celermajer JS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non—invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis [J]. Lancet, 1992;340:1111-1115.

[3] Anderson TJ, Uehata A, Gerbard MD, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations [J]. J Am Coll Cardiol, 1995;26:1235.

[4] 晏沐阳,段云友,曹铁生,等.高胆固醇血症兔髂外动脉内皮依赖性舒张功能的在体、离体研究[J].中国超声医学杂志,2000;16(9):648-651.

(上接第 16 页)能奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

[1] 刘北忠.K562 细胞增殖抑制与诱导分化的分子机制研究[D].重庆医科大学博士学位论文,2001.

[2] 张学敏,王宜强.靶向新基因的分子克隆策略——理论与方法[M].军事医学科学出版社,1999;7:237.

[3] Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells [J]. J Immunol, 1992;148(1):267-271.

[4] Frohman MA, Dush MK, Martin GR. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988;85(23):8998-9002.

[5] Maruyama IN, Rakow TL, Maruyama HI. cRACE: a simple method for identification of the 5′ end of mRNAs [J]. Nucleic Acids Res, 1995;23(18):3796-3797.