DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.20.033

技术方法

文章编号:1000-5404(2004)20-1878-03

应用随机PCR技术制备靶基因文库随机片段

Preparation of the random fragments of target gene library using random PCR technology

吕永强,杜桂鑫,童贻刚 (军事医学科学院微生物流行病研究所二室,北京 100071)

提 要:目的 用随机PCR技术制备构建靶基因文库的随机基因片段。方法 先扩出靶基因(HIV$_1$Envgp160)片段,然后设计两条引物,1条为锚定随机引物用于扩出靶基因的随机片段,另1条为锚定特异引物用于对随机片段进行扩增,得到大量的随机片段;优化模板量、dNTP浓度、反应时间、温度和DNA聚合酶等反应条件,扩出靶基因的随机片段。结果 得到用于建库的理想靶基因随机片段。结论 随机PCR是制备靶基因文库随机片段的一个简便有效方法。

靶基因文库是以改构的噬菌体为载体,把特定基因的随机片段克隆到噬菌体编码外壳蛋白的基因中,使外源蛋白融合表达于噬菌体表面,众多的重组噬菌体构成了靶基因文库;它是噬菌体展示技术[1,2]的一个很好应用,实现了基因型和表现型的转换。通过亲和—筛选—富集,可得到表达特异肽的噬菌体,为抗原表位的研究提供了有力的工具[3]。一个完善的靶基因文库,要求库内基因具有良好的随机性、多样性,而靶基因随机片段的生成是实现这一要求的关键。以HIV$_1$Envgp160基因为例,这段基因编码了HIV$_1$病毒的包膜蛋白[4],大小为2.5 kb,要用噬菌体展示技术研究它的抗原表位,需要构建片段大小50~250 bp的gp160基因文库。我们通过研究HIV$_1$Envgp160基因的50~250 bp随机片段的产生,探索了产生理想的构建靶基因文库的随机片段最佳条件。

1 材料与方法

1.1 质粒

HIV$_1$ PNL4-3,质粒中带有HIV$_1$的全部DNA序列,由本室保存。

1.2 引物

靶基因HIV$_1$gp160扩增引物 A_1:5′-CTTGTGGAGATGGGGGTGGAAATGG-3′,A_2:5′-TCCAAGCCCTGTCTTATTCTTCTAGGTATG-3′;

随机片段扩增引物锚定随机引物 P_1:5′-GCCCGGAGCTCTGCACTCGAGNNNNNNNNN-3′(GAGCTC为*Sac*Ⅰ酶切位点,CTCGAG为*Xho*Ⅰ酶切位点),锚定特异引物 P_2:5′-GCCCGGAGCTCTG-CACTC GAG-3′[5]。

1.3 试剂、仪器

ExTaq DNA聚合酶、*Taq* DNA聚合酶购自大连宝生物公司,Deep Vent DNA聚合酶购自Biolabs公司,Pfu DNA聚合酶购自上海生工公司,DNA回收试剂盒购自北京博大公司;PCR扩增仪为GeneAmp2400。

1.4 靶基因的扩增

以HIV$_1$ PNL4-3质粒为模板,使用A_1、A_2引物,94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s,52 ℃ 20 s,72 ℃ 150 s,30个循环。PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,切下2.5 kb的gp160基因片段用玻璃奶回收,见图1。



M:DNA分子量标准;1:gp160基因

图1 gp160基因的扩增

1.5 靶基因随机片段的扩增

反应分两步进行,第一步用锚定随机引物P_1扩出靶基因随机片段。20 μl PCR反应体积中加2 μl dNTP,2 μl引物P_1(20 μmol/L)、DNA聚合酶1 μl、模板HIV$_1$gp160基因片段6 μl,反应程序为94 ℃ 3 min,94 ℃ 15 s,退火时间和温度根据随机片段的大小进行调节,15个循环。第二步用锚定特异引物P_2以第一步产生的随机片段为模板,对其进行扩增。20 μl PCR反应体积中加1.5 μl dNTP(2.5 mmol/L)、1 μl引物P_2(20 μmol/L)、DNA聚合酶1 μl、1 μl模板(第一步PCR产物),反应程序为94 ℃ 3 min,94 ℃ 15 s,60 ℃ 0 s,30个循环。

2 结果

2.1 反应时间、温度对随机片段的影响

在第一步PCR中dNTP浓度为2.5 mmol/L,用*Taq* DNA聚合酶,模板gp160基因片段6 μl浓度为50 ng/μl,退火温度、时间

作者简介:吕永强(1973—),男,辽宁省丹东市人,硕士,主治医师,主要从事分子生物学方面的研究,现在解放军210医院医务处,大连 116021。电话:(010)66948580

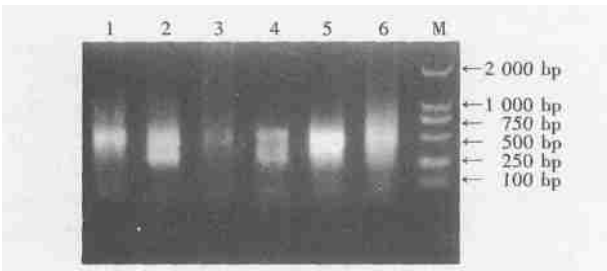
收稿日期:2003-05-01;修回日期:2003-08-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分别设为 42 ℃ 5 s、46 ℃ 0 s、50 ℃ 0 s。结果见图 2, 在此条件下, 42 ℃ 5 s 时扩增产物主要集中于 500 bp 附近。50 ℃ 0 s 时, PCR 产物泳带在 200～500 bp 之间, 但主要集中在 200 与 500 这两长度上。46 ℃ 0 s 时 PCR 产物泳带在 200～500 bp 之间, 产物分布较 50 ℃ 0 s 时理想; 对此温度下的反应条件进一步进行优化, 第 1 个循环条件改为 94 ℃变性 3 min 后, 快速降温至 0 ℃, 加入引物 P_1 和 *Taq* 酶, 逐渐升温; 后 14 个循环反应条件为 94 ℃ 15 s、46 ℃ 0 s。结果, 电泳带主体在 200～500 bp 之间, 但带型分布更合理, 出现类似彗星尾部的拖带— smear, 见图 2 的 6 泳道。

2.2　模板量对随机片段的影响

第一步 PCR 中, dNTP 浓度为 2.5 mmol/L, 模板 gp160 基因片段浓度为分别用 0.5、5、50 ng/μl, 退火反应 46 ℃ 0 s。结果, 见图 2 的 3、4、5 泳道。可见, 在一定范围内, PCR 产物量随模板量的加大而增加。



M: DNA 分子量标准; 1: 42 ℃退火扩增的随机片段; 2: 50 ℃退炎扩增的随机片段; 3: 模板浓度 0.5 ng/μl 46 ℃退火扩增的随机片段; 4: 模板浓度 5 ng/μl, 46 ℃退火扩增的随机片段; 5: 模板浓度 50 ng/μl, 46 ℃退火扩增的随机片段; 6: smear 状的随机片段

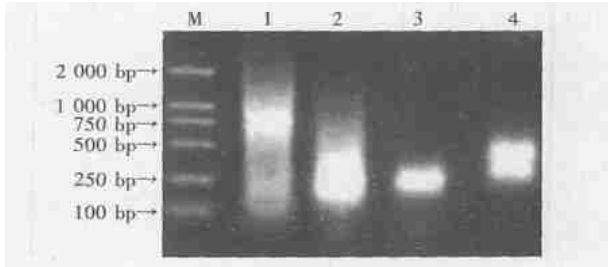
图 2　第一轮 **PCR** 中反应时间、温度和模板量对随机片段的影响

2.3　DNA 聚合酶对随机片段的影响

在 PCR 反应中分别使用 *Taq* 酶、Deep Vent 酶、Pfu 酶等 3 种 DNA 聚合酶。模板浓度为 50 ng/μl, 反应程序为 94 ℃ 3 min 变性, 第 1 个循环中快速降温至 0 ℃, 加入引物 P1 和 DNA 聚合酶, 逐渐升温, 后 14 个循环反应条件为 94 ℃ 15 s、46 ℃ 0 s。在其它反应条件一致的情况下, 使用不同的 DNA 聚合酶可得到不同大小的随机片段(图 3)。*Taq* 酶产生的 smear 主体在 200～500 bp 之间, Deep Vent 酶产生的 smear 在 150～400 bp 之间, 而 Pfu 酶产生的 smear 在 100～500 bp 之间。

2.4　dNTP 浓度对随机片段的影响

经过以上对 PCR 反应条件的优化, 通过 PCR 所产生随机片段的大小达到 100～500 bp, 为达到产生 50～250 bp 片段目的, 进一步优化反应条件, 改变第一步反应中使用的 dNTP 浓度, 对其进行 100 倍稀释, 浓度为 25 μmol/L。其电泳结果见图 3 的 1 泳道, 产生一个长的 smear, 在 50～250 bp 之间有较强分布, 从产物的大小和带型分布来看, 完全符合构建 gp160 靶基因文库的要求。对 50～250 bp 范围内的 PCR 产物切胶回收, 可用于建库使用。



M: DNA 分子量标准; 1: dNTP 浓度 25 μmol/L 扩增随机片; 2: 加入 Pfu 酶扩增的片段; 3: 加入 Deep Vent 酶扩增时的片段; 4: 加入 *Taq* 酶扩增时的片段

图 3　**DNA** 聚合酶和 **dNTP** 浓度对随机片段的影响

3　讨论

目前, 用噬菌体展示技术建立靶基因文库已成为研究抗原、抗体结构与性质的一个重要的手段。为研究 HIV_1gp160 基因的抗原表位, 需利用这段基因的随机片段建立相应的 HIV_1gp160 靶基因文库。一个好的基因文库要求库容基因有足够的随机性、多样性。建库基因随机片段的获得有几种方法: ①人工合成: 根据建库要求, 人工随机合成一定大小的 DNA 片段。这种方法虽然可达到基因的多样化、随机化, 但成本太高。②*DNase* Ⅰ 酶切: 用 *DNase* Ⅰ 酶切靶基因, 使其形成一定长短的随机片段[6]。这种方法虽然操作简便, 成本低, 但由于是酶切获得, 片段两端为平端或粘端, 到后期进行噬菌粒载体克隆阶段将很困难。③随机 PCR[5,7]: 用 5′ 端带有酶切位点、3′ 端带有随机序列的锚定随机引物对目的基因进行扩增, 退火过程中, 由于引物中的随机序列可与靶基因中任意特异性高的部位形成配对延伸, 因此可看作是对全长靶基因序列任意部位的扩增。再用只带有 5′ 端酶切位点序列的锚定特异引物对得到的随机片段进行特异扩增, 得到大量的两端带酶切位点的靶基因随机片段。

建立 HIV_1gp160 基因文库, 随机片段需随机分布在 50～250 bp 之间, 为达到这一目的, 我们对 PCR 条件进行一系列优化。随机 PCR 分两步进行: 扩出随机片段和对随机片段进行扩增。第一步尤其重要, PCR 需要由热循环仪来实现温度的迅速变化, 较小体积的样品加热和冷却效率都比较高; DNA 聚合酶具有很高的持续合成能力, 反应体系在变性与退火温度之间过渡时, 引物与模板结合延伸, 温度的设置实际上也影响了延伸的时间, 因此, 我们选择双温 PCR。本研究中, 反应体积为 20 μl, 温度为变性 94 ℃ 15 s、退火 46 ℃ 0 s。由于在第 1 个循环中, 94 ℃降温到 46 ℃过程中, 引物与模板间特异性高的优先配对结合延伸, 经过若干轮扩增会严重干扰低特异性引物与模板的结合, 因此, 在第 1 个循环中, 94 ℃变性后快速降至 0 ℃, 加入

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

引物 P_1 和 DNA 聚合酶，缓慢升温至退火温度，使特异性低的引物先与模板结合，采用较低的循环次数（15次），避免优势扩增，保证了扩增片段的随机性；大量的模板（300 ng）增加了扩增片段的产量。在第二步 PCR 中，用较高的退火温度（60 ℃）和循环次数（30 次），提高对第一步产生的随机片段扩增的特异性，增加了随机片段的产量。

在对反应时间、温度条件进行优化后，为进一步减小随机片段的长度，我们考虑优化所用的 DNA 聚合酶。DNA 聚合酶的活性也是 PCR 产物长度的影响因素：*Taq* 酶 DNA 聚合能力强（30～60 bp/s）；Pfu 酶具有 3′～5′外切酶活性，通过“校读”功能纠正错配的碱基[8]，扩增效率降低为 10 bp/s；Deep Vent 酶也具有 3′～5′外切酶活性，DNA 聚合能力在 *Taq* 酶与 Pfu 酶之间。在其它反应条件一致的情况下，DNA 聚合酶的活性还受到 dNTP 浓度的影响。对比发现，在 dNTP 100 倍稀释（25 μmol/L）条件下，明显抑制了酶的聚合活性，从而减小扩增片段的长度。在此条件下，使用 Pfu 酶，PCR 随机产物大小达到 50～250 bp。经过对时间、温度、模板量、DNA 聚合酶、dNTP 浓度等反应条件的优化，通过随机 PCR 可得到用于建库的理想靶基因随机片段。

与其他构建靶基因文库技术相比，随机 PCR 技术操作简单、得到的随机片段分布合理、扩增效率高；在设计锚定引物时带上需要的酶切位点，可大大提高后期的克隆效率，增加库容；是进行建库随机片段准备工作的一个有效方法。

关键词：靶基因；随机 PCR；随机片段
中图法分类号：Q785 文献标识码：B

参考文献：

[1] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vector that display cloned antigen on the virion surface[J]. Science, 1985, 228(4705): 1315－1317.
[2] Parmley S F, Smith G P. Antibody-selectable filamentous fusion phage vectors: affinity purification of target genes[J]. Gene, 1988, 73(2): 305－318.
[3] Perham R N, Terry T D, Willis A E, *et al*. Engineering a peptide epitope display system on filamentous bacteriophage[J]. FEMS Microbiol Rev, 1995, 17(1－2): 25－31.
[4] Wierzbicki A, Kiszka I, Kaneko H, *et al*. Immunization strategies to augment oral vaccination with DNA and viral vectors expressing HIV envelope glycoprotein[J]. Vaccine, 2002, 20(9－10): 1295－1307.
[5] 杜桂鑫，潘文胜，陈万荣，等. 应用随机 PCR 方法鉴定一株肠道病毒[J]. 中华实验和临床病毒学杂志，2001，15(3)：242－244.
[6] Anderson S. Shotgun DNA sequencing using cloned Dnase I-generated fragments[J]. Nucleic Acids Res, 1981, 9(13): 3015－3027.
[7] Froussard P. A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA[J]. Nucleic Acids Res, 1992, 20(11): 2900.
[8] Lundberg K S, Shoemaker D D, Adams M W, *et al*. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from pyrococcus furiosus[J]. Gene, 1991, 108(1): 1－6.

（编辑 陈聪连）

（上接 1874 页）

表 1 60 例病毒性心肌炎患儿 **cTnI** 与 **CK-MB** 动态测定阳性数

项目	≤3 d	7 d	14 d
cTnI	45	30	24
CK-MB	34	8	2

3 讨论

病毒性心肌炎的发病机制尚未完全清楚，目前的研究认为其与病毒及毒素直接损害心肌、免疫机制参与和自由基作用等因素有关。多年来血清 CK-MB 一直被公认为诊断小儿病毒性心肌炎的重要手段，但 CK-MB 不仅存在于心肌组织中，正常人骨骼肌也少量存在。当骨骼肌损伤、溶血、肾脏病变及甲状腺功能减低时均可引起 CK-MB 升高，故 CK-MB 不具有完全的特异性[2]。尽管 CK-MB 是判断心肌损伤的重要标志之一，但存在灵敏度低，特异性差及阳性时间窗短等不足。自从 1987 年 Cummins 等首先应用 cTnI 诊断急性心肌梗死后，国内外学者相继研究证实 cTnI 是仅定位于心肌的特异性抗原，是心肌细胞损伤的高度敏感和特异性指标，对小儿心肌炎的诊断、预后和疗效判断等具有重要意义[3]。本研究观察到 60 例病毒性心肌炎患儿血清 cTnI 阳性率达 75%，远较 CK-MB 阳性率（56.7%）为高，差异显著（$P<0.05$），提示 cTnI 对于诊断病毒性心肌炎有高度的敏感性。而非心肌炎组 CK-MB 阳性率为 25%（8/32），明显高于 cTnI 阳性率 3.13%（1/32）。

cTnI 大部分以结构蛋白形式固定于肌原纤维上，约 30% 以游离子形式存在于胞浆中[4]。疾病早期游离 cTnI 进入血中，后期结合 cTnI 被降解，不断释放入血中，使血清中 cTnI 浓度升高，持续时间较长，达 1 周以上，而 CK-MB 升高仅维持 2～3 d[2]。本结果显示病毒性心肌炎组在发病 2 周时 cTnI 阳性数仍明显高于 CK-MB 阳性数，因此考虑 cTnI 对病毒性心肌炎的诊断窗口时间长于 CK-MB。

总之，血清 cTnI 检测可弥补 CK-MB 的不足，其具有高度的敏感性和特异性及诊断窗口宽等优点，可作为病毒性心肌炎诊断及病情观察的重要指标。

关键词：儿童；心肌炎；病毒性；心肌钙蛋白 I
中图法分类号：R725.422.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] 李家宜. 小儿病毒性心肌炎诊断标准（修订草案）[J]. 中国实用小儿科杂志，1996，11(5)：316.
[2] 杨振东，王匡涛，李永昶. 心脏肌钙蛋白 I：儿童心脏损伤新的诊断金标准[J]. 国外医学儿科学分册，1998，25(6)：324.
[3] 周海鹰，刘忠良，韩秀珍. 心肌肌钙蛋白 I 在儿科心血管疾病中的应用[J]. 国外医学儿科学分册，2000，27(3)：153－155.
[4] Falahati A, Sharkey S W, Christensen D, *et al*. Implementation of serum cardiac troponin I as marker for detection of acute myocardial infraction[J]. Am Heart J, 1999, 137(2): 332－334.

（编辑 汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net