

应用改进的 SSP-抑制 PCR 技术扩增 cDNA 片段旁侧序列

陈渝萍 薛社普

(中国医学科学院基础医学研究所 中国协和医科大学基础医学院细胞生物室, 北京 100005)

摘要 结合抑制 PCR 和单链特异引物 PCR 技术, 降低 RACE 过程中由公用引物引发的非特异扩增、增加目的 cDNA 在原始模板中的相对比例, 从而提高 RACE 特异性, 有效地扩增靶序列。

关键词 RACE 抑制 PCR 单链特异引物 PCR

RACE 是指应用特异引物与公用引物快速扩增已知 cDNA 片段旁侧序列的技术, 具有快捷、方便、省事等优点, 可同时获得多个转录本, 已逐渐取代经典的 cDNA 文库筛选技术, 成为克隆全长 cDNA 序列的常用手段^[1]。但是, 反应中普遍存在的非特异扩增, 尤其是由公用引物引发的线性化非特异扩增常导致 RACE 失败^[2]。由于初始模板中每个 DNA 分子的末端均含有公用引物结合的位点, 这种非特异扩增经常造成严重的拖影, 特别是在扩增低拷贝的靶基因时更为突出。1996 年, Chenchik, A 等人利用 Vectorrete PCR 和抑制 PCR (Suppression PCR) 技术改进传统的 RACE 程序, 大大减少了非特异的线性化扩增^[3]。但这种方法需要合成特殊的寡核苷酸,

且不能完全消除线性化扩增; 当以总 RNA 为模板扩增低拷贝靶序列时, 仍会产生严重的非特异产物。为了进一步提高特异性, 我们尝试着将单链特异引物 PCR (SSP) 引入 Chenchik 等人的方法, 在抑制 PCR 之前先进行一轮以单链特异引物引发的特异性线性化扩增富集靶片段, 提高它们的相对比例, 从而减少非特异产物。应用这种改进的 SSP-抑制 PCR 技术, 我们成功地克隆了一个长 115bp 的已知 cDNA 片段的旁侧序列。

1 材料和方法

1.1 寡核苷酸

所有寡核苷酸均由赛百盛公司合成, 再经聚丙烯酰胺凝胶电泳手工纯化。其序列如下:

衔接子: 长链 5' gcgtgaagac gacagaaaggcggtgtacg gagggcggt 3'

短链 5' accgccctcc gc3'

衔接子的长短链经 95℃ 5min、70℃ 5min、再缓慢降至 4℃ 退火形成双链的假衔接子。

cDNA 第一链合成引物 (T): 5' gcgagtcgac cg(t)₁₃ 3'

公用引物 (Ad): 5' tgtagcgtga agacgacaga a 3'

特异引物 1 (GSP1): 5' ggccaccgga ctctttt3'

特异引物 2 (GSP2): 5' cggactcttt tagggactc 3' (GSP2 较 GSP1 靠近 5' 端)

特异引物 3 (GSP3): 5' agataacaaa aggggtgcta 3' (GSP3 为 3' RACE 引物)

1.2 制备衔接子连接的双链 cDNA:

以 Hemin 和 DMSO 联合诱导 MEL 细胞,

五天后收集细胞, 依 TRIZOL 试剂盒说明提取细胞总 RNA。取 1μg 总 RNA 与 T 引物于 42℃

退火合成 cDNA 第一链,再以 Klenow 酶合成双链 cDNA,酚/氯仿抽提,乙醇沉淀,重溶于 10 μ L 高压去离子水。取 6 μ L ds cDNA 和 20pmol 衔接子与 2 单位 T4 接酶 (MBI) 混合,在 16 $^{\circ}$ C 连接 24h; 1:100 稀释连接产物,94 $^{\circ}$ C 温育 2min,冰上冷却。分装后储存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.3 5'、3'RACE:

1.3.1 5'RACE: 先进行 SSP (20 μ L 反应体系): 将 1 μ L dsDNA 加入 PCR 混合液 (1 $\times$ PCR 缓冲液, 200 μ mol/L dNTP, 0.2 μ mol/L GSP1, 5% 甲酰胺), 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min 后, 加入 0.2 单位 Ex-Taq 酶进行热启动。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min 共 15 个循环; 然后加入 Ad/GSP1 引物 (Ad 终浓度 0.2 μ mol/L, Ad/GSP=1:2) 继续 10 个循环, 在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min 后完成第一轮 PCR。为了比较 SSP 引入前后的差异, 设置了一个反应, 在 SSP 初始就加入 Ad; 另外还设置了一个反应, 在抑制 PCR 开始时仅加入 Ad。将第一轮 PCR 产物 1:500 稀释, 取 1 μ L 进行第二轮巢式 PCR, 反应体系仍为 20 μ L, 以 GSP2/Ad 作为引物, 循环条件同第一轮 PCR, 共 30~40 个循环。

1.3.2 3'RACE: 鉴定 3' 序列较 5' 序列较为单一, 我们仅以一条特异引物 GSP3 进行一轮 SSP-抑制 PCR 完成靶序列扩增, 20 μ L 反应体系中 Ex-Taq 酶量增至一倍, 抑制 PCR 循环数增至 30~40 次。

2 结果和讨论

2.1 改进的 RACE 扩增

起始的已知序列是我们应用差示技术筛选得到的一个 cDNA 片段, 长仅 115bp, 由于来源于 mRNA 3' 端, AT 含量丰富, 这样的序列不适合设计引物。借助 oligo 5.0 软件设计了三个特异引物, 它们的 T_m 值均较公用引物低 10 $^{\circ}$ C 左右, 难以选定一个合适的 PCR 退火温度。依照 Chenchilk 等人的建议进行扩增只得到严重的拖影, 即使应用 TDPCR 也未有明

显改变 (见图 1 泳道 1); 引入 SSP 后, 拖影显著减弱; 若抑制 PCR 中加入 GSP (1:2), 可进一步加强后续循环的特异性, 得到特异的条带 (泳道 2、3)。这一结果表明改进的 SSP-抑制 PCR 技术能有效地提高 RACE 的特异性和效率。我们还发现改进的 SSP-抑制 PCR 在扩增长的产物时尤为有效。在 3' RACE 时, 若仅加入公用引物, 不能得到长为 1.1kb 和 600bp 左右的产物 (见图 2)。这是因为经 SSP 后 GSP 有所消耗, 如不补加, 在后续的抑制 PCR 中公用引物浓度高于特异引物, 容易引起非特异扩增; 适当提高 PCR 反应中 GSP/Ad 的比例将有助于加强特异性, 保证了长片段的有效扩增^[4]。

5'、3'RACE 均产生了短片段产物, 它们的扩增效率高于长片段。这种起始模板中短片段的优势扩增常造成 RACE 失败, 当靶序列为低拷贝时这一问题更为突出。短片段模板的产生多源于反转录反应中反转录酶提前终止; cDNA 第二链合成时引物与模板中间部分互补时也会产生。针对这一问题目前已发展了多种改进技术, 但这些方法多以 RNA 连接酶连接为基础, 操作复杂, 连接效率低^[5]。抑制 PCR 虽然可消除 cDNA 第二链合成过程中产生短片段, 却无法排除它们在 RT 中的产生。改进的 SSP-抑制 PCR 虽然也未能解开这一难题, 但由于在 SSP-PCR 中短片段优势扩增明显低于指数扩增, 长片段模板得到一定富集, 它们在模板中的相对比例也相应提高, 从而削弱了短片段优势扩增的影响。实验中我们发现当再增加一轮 SSP 后长片段的扩增效率大为提高, 进一步证实了这一可能 (资料未显示)。

2.2 5'、3' cDNA 片段

Northern 杂交表明原始片段所对应的 mRNA 转录本长度在 1.5~2.0kb 之间。5'、3' RACE 所得到的最长的特异片段分别为 900bp 和 1kb 左右, 表明我们基本上获得了全长 cDNA。图 3 显示了长度为 900bp 和 1000bp 左

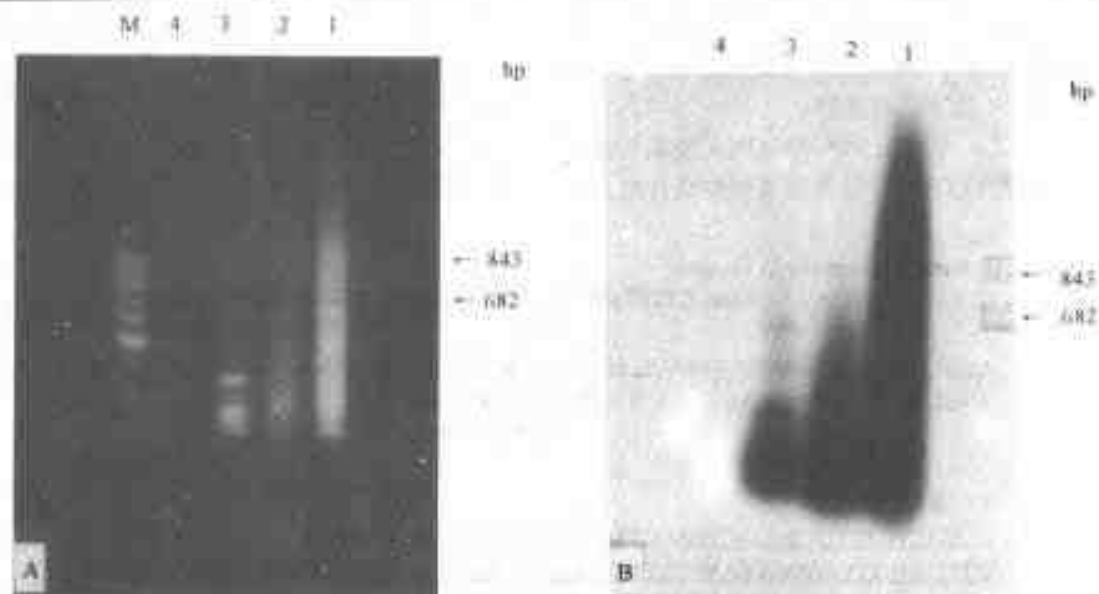


图1 5'RACE扩增。(A)琼脂糖电泳。(B) Southern 杂交

Fig 1 5'RACE amplification (A)Agarose electrophoresis;(B)Southern hybridization

M:100 bp ladder; Lane 1, No-SSP; Lane 2, Suppression PCR with only Ad; Lane 3, Modified SSP-suppression PCR; Lane 4, Negative water control

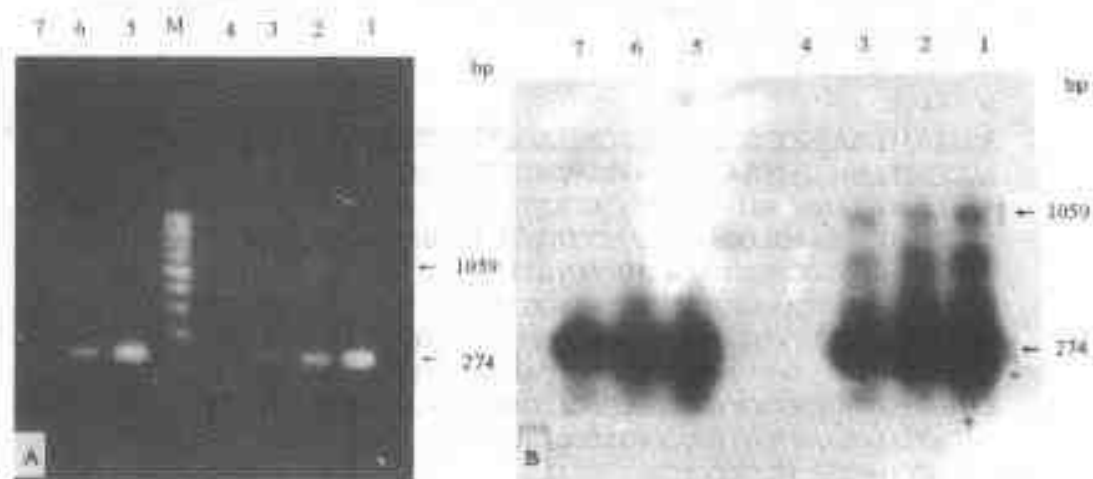


图2 3'RACE扩增。(A)琼脂糖电泳;(B) Southern 杂交

Fig 1 3'RACE amplification (A)Agarose electrophoresis;(B)Southern hybridization

M: 200 bp ladder; Lane 1-3, ModifiedSSP-suppression PCR(Template Dilution); Lane 5-7, Suppression PCR with only Ad (Template Dilution:1:1, 1:2, 1:10); Lane 4, Negative water control

右的片段一侧的测序结果, 下划线标出了原始的 cDNA 片段的序列。它的存在证明了 SSP 抑制 PCR 技术的可靠性。

总之, 改进的 SSP-抑制 PCR 技术不仅无需合成特殊 DNA、昂贵的试剂盒或分离 poly

(A), 而且操作简单、方便, 显著减少了线性化非特异扩增。尤其是 SSP 的参与使得选用 T_m 值较公用引物相差较多的特异引物成为可能。这正是许多只知 cDNA 3' 端部分序列而要克隆全长 cDNA 的工作者所需要的。

1. Primary known cDNA fragment

CCCGGCAACAAAAGAAAGCTTTTGGCTGAAGATCAACGTGTTTGAGAGATAACAAA

5' AGATAACAAA

AGGGGTGCTAACACAGAAGCTGAGTCCCTAAAAGAGTCCGGTGGCCTACCTGTTAA

AGGGGTGCTA 3' (GSP3) 3' CTCAGGGATTTTCTCAGGC 5' (GSP2)

3' TTTTCTCAGGCCACCGG 5' (GSP1)

5' RACE:

CGGACTCTTTTAGGGACTCAGCTTCTGTGTTAGCACCCCTTTTGTATCTCTTAAACAC
GTGATCTTCAGCCAAAAGCTTTCTTTTGTGTCGGGACTATCTAAGTTTTCTAGTTTT
CTGACTTTTGTGGCCAGCATTTCATTTTTTTTATCTTTCTGTCTCACAGCACAGCTCTGA
TTCTGACTCTGGTCTCTGTCTTTGTCTTAACCTTCCTGTTACCTTGGTCAGATTGTTGGGA
CACTTTTTAGTCCCACAGAGACGAGACCCCATCAGAGCCTGGCAGTTAGACTCACAG
GTGCTCCTTACCTTGGACAGAAGCCCCAAGTGGGCGGATGCCTCCCTCACTGGAACCT
GGAACAGACTCACTGCCAGCAACTAAGGGTGGTGCCACCTTCTGAGAAGAGGGAACCT
TTAGAGCAGAGACGGGGAGTGCAGCTCTACAGCTGGCTGCAACGGGCACCTTATTTNA
AAGTGAAGCAGTTTTTCTGGTTAACAAGAAACGGGATGGGAGGGGACAGGGGGGAA
TGAAGAAAGCTGGCTGGGGAACCTGCAGCGGCTCTTGGGCCGGGTCTTGAACAGGC
CTCCTCTTCTTTTTTAATT

3' RACE

AGATAACAAAAGGGGTGCTAACACAGAAGCTGAGTCCCTAAAAGAGTCCGGTGGCCT
ACCTGTTAAAGCAGCTAAAAAAGAGACTGTGTTTCATACTCTCCACCGACCACTGCA
AAACAAGCTAAAAAGTTCTTGGGCACTGCGGGCTTTTGCAGATTGTGGATTCCAGGTT
TTGCTGAGTTAAAGAGGTAAACAGCCCTTCGTATAGAAAAATAAAGAACAATCTTAGA
TGGCCTTGGATGCTCTTGAGACTGCCCTGATGTTATCCCAGCTTTGGGACTCCTAGAT
GTGACTGAGAACAAAGGTATTGCCAAAGGAAGTTCTTACTCAGAGATTGGGACCCTGA
AAAAGACCTGTGGCATACTTGTAAGAAATTAGACCTGGGTGGCTGTAAGATGGCCTGC
TTGTCTGCACAATAGTGGGCTTCTGGGTCAAGGGACGCAGATAAATTGACTCTGGAGC
TAGAAAGNGGTGGGGTTCAAGCCCCCATGACCCGATGGCTGGACTAACGCTCTTAAA
AGCATTATCCAAGTGTTCCTTGACCGATGGACACATTGGCAGAACTTTGACGAACC
CAAGTGGACCTTGGTTCCCCCG

图3 RACE 片段序列

Fig 3 RACE fragment sequences

参 考 文 献

- 1 Frohman MA, Dush MK, Martin GR. MR. Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc natl Acad. Sci USA*, 1988, 85: 8998
- 2 Frohman MA. On beyond RACE. *PCR Methods Appl*, 1994, 4: S40
- 3 Chenchik A, Diachenko L, Moquadam F et al. Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA. *Biotechniques*, 1996, 21 (3):526
- 4 Bespalova IN, Adkins S, Burmeister M. 3'RACE: Skewed ratio of specific to general PCR primers improves yield and specificity. *Biotechniques*, 1998, 24 (4):153
- 5 Schaefer, BC. Resolution in rapid amplification of cDNA ends: New strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Analytical Biochemistry*, 1995, 227:225

Amplification of Flanking Sequence of cDNA Fragment by the Modified SSP-Suppression PCR

Chen Yuping Xue Shepu

(Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences Peking
Union Medical College, Beijing, China, 10005)

The single-strand-specific PCR and the suppression PCR are combined to decrease nonspecific linear amplifications primed with general primer and increase the relative ratio of targeted cDNA in primary templates. The improved specificity of RACE results in the efficient amplification of targeted sequence.

Key words RACE Suppression PCR Single-strand-specific PCR

(上接第86页)

望在消除完整E6蛋白潜在致癌性的前提下研究其杀伤肿瘤细胞的特异免疫反应。此设计方案对于进一步研制安全有效的HPV疫苗是一有益的尝试。

Yamada T(1997)对来自世界各地的432例宫颈癌标本中HPV 16E6、L1、L2和LCR进行序列分析。发现在宫颈癌组织中HPV基因可有一定变异性,而且此种变异具有地域及种系发生的特点。基因变异与病毒的持续性感染有关,变异株可能逃避机体体液和细胞

免疫的攻击,给相应疫苗的设计和研制带来问题。为明确HPV16E6基因在中国妇女宫颈癌组织中的存在状态,排除基因变异对疫苗研究的影响,我们对本研究选择的疫苗候选基因E6C进行了基因分析。结果表明,E6羧基端基因序列比较稳定,未发现基因变异现象存在。Yamada T(1995)研究表明E6氨基端尤其是10~14位氨基酸变异常见,E6羧基端DNA的存在状态尚未见报道。

人外周血及脐血树突状细胞的体外分离培养

苏 华¹ 郑秋红² 何 维¹

(1 中国医学科学院基础医学研究所 中国协和医科大学基础医学院免疫学室, 北京 10005)

(2 福建省肿瘤医院, 福州 350014)

摘要 取正常人外周血或脐血, 经淋巴细胞分离液分离, 取中间白膜层, 培养板中进行粘附, 粘附细胞加培养液和细胞因子(外周血加 GM-CSF 和 IL-4, 脐血加 GM-CSF 和 TNF- α) 培养, 对其形态、表型和功能分别进行鉴定和测定。结果表明约经过1周左右培养, 悬浮细胞表现为典型的 DC 形态, 带有毛刺样凸起, 经 DC 单克隆抗体染色后用流式细胞仪测定脐血 72% 为 DC, 外周血 93% 为 DC, 并且可以刺激同种异体淋巴细胞的增殖反应。所以通过这样的不同细胞因子组合可以从人外周血和脐血中诱导培养出大量的 DC 细胞, 为其进一步的研究奠定了基础。

关键词 树突状细胞 单个核细胞 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 白细胞介素-4 肿瘤坏死因子- α

树突状细胞是已知的功能最强的抗原呈递细胞, 它可以直接激活纯真T细胞, 在诱导T细胞免疫应答及T细胞依赖性抗体生成中起重要作用^[1, 2]。近年来对于DC的生物学特点及参与免疫应答的机制研究较多, 特别是它在肿瘤免疫中的重要地位越来越受到重视^[3]。但是DC在外周血中的含量极低, 尚不足白细胞总量的1%, 这给对于DC的研究造成了困难。另外, 关于DC的来源, 一般认为, 它来源于骨髓的CD₃₄⁺前体细胞, 与单核巨噬细胞、粒细胞具有共同的前体; 但也有发现它具有单独的前体存在^[4]; 还有资料显示它与T细胞、NK细胞具有共同的前体^[5]。所以, DC的分化发育可能是多种途径的。本研究用不同细胞因子的组合, 分别从正常人外周血或脐血中获取粘附细胞, 在不同组合细胞因子的刺激下, 可获得具有一定形态学和功能特征的DC, 为DC的进一步研究奠定了重要基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF), 重组人白细胞介素4(rhIL-4)

购自北京岳泰试剂公司; 人肿瘤坏死因子(hTNF) α , CD16-异硫氰酸荧光素(FITC), CD-14购自邦定生物医学公司; 鼠抗人IgG购自Jackson Immuno Research Laboratories; streptavidin/R-藻红素(PE), streptavidin/FITC购自Immunotech公司; RPMI 1640培养基购自GIBCO公司; 鼠抗人DC单克隆购自Immunotech公司; 淋巴细胞分离液(Ficoll)购自上海试剂二厂; 小牛血清购自江西; 正常人AB血清自产; 正常人外周血购自北京协和医院; 脐血购自北京妇产医院。

1.2 正常人外周血和脐血DC体外培养

新鲜分离的正常人抗凝外周全血或脐血, 稀释后以2:1的比例加于淋巴细胞分离液上(500g, 16min), 取界面白膜层细胞, 置于50mL离心管中, 用Hank's溶液悬浮细胞并洗涤2~3次, 再用RPMI 1640完全培养基悬浮细胞, 放培养皿中, 37℃, 5% CO₂ 孵箱培养2h, 吸掉上清, 用培养液洗去非粘附细胞, 即获得贴壁的细胞, 人外周粘附细胞按 rhGM-CSF 1000U/mL, rhIL-4 500U/mL 终浓度加入细胞因子; 人脐血粘附细胞按 rhGM-CSF 1000U/mL, hTNF- α 50U/mL 加入细胞因子, 培养7~15d可用于FACS分析及MLR反应。