

RAP - PCR 技术及其应用

李 智¹, 李 强¹, 孙春晓¹, 于常海^{1,2}

(1 中国科学院上海生命科学研究中心, 上海 200031; 2 香港科技大学生物系, 香港)

摘要: RAP - PCR 是以 PCR 为基础构建 RNA 指纹图谱, 研究基因差异表达的有效方法。所显示的种系特异性差异可用于对基因的遗传作图; 所揭示的组织特异性差异可用于研究特异基因的表达。该法可检测各种情形下 RNA 群体间的差异。本文简介其基本原理及在基因差异表达研究领域的最新应用。

关键词: RAP - PCR; 基因差异表达; 基因克隆

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 0253 - 9772(2001)04 - 0381 - 03

RAP - PCR, from Theory to Applications

LI Zhi¹, LI Qiang¹, SUN Chunxiao¹, Albert C. H. Yu^{1,2}

(1 Laboratory of Neuronal Injury and Regeneration, Shanghai Research Center of Life Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

2 Department of Biology, Hong Kong University of Sciences and Technology, Hong Kong, China)

Abstract: RAP - PCR is a useful method based on PCR to display fingerprint of RNA populations and to study differential gene expression. The strain - specific differences revealed should be useful for genetic mapping of genes. The tissue - specific differences revealed might be useful for studying differential gene expression. In this review, we introduce the theory of RAP - PCR and its recent applications.

Key words: RAP - PCR; differential gene expression; gene cloning

细胞的生长、分化和发育, 细胞周期的调控以及细胞的衰老、死亡等等, 都是基因选择性表达的过程。进行基因转录、表达的研究, 以表达基因为研究客体, 是直接有效的方法。研究基因差异表达的主要方法有双向蛋白质电泳指纹图谱 (two-dimensional protein fingerprint)、依赖杂交的筛选技术 (hybridization-based screening)、mRNA 差异显示技术 (differential display of mRNA) 以及 RAP2PCR 技术 (arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA) 等, 它们都有各自的特点及适用范围。本文只介绍 RAP2PCR 技术的基本原理及最新应用。

1 RAP2PCR 技术的基本原理

1992 年, Welsh J 等提出 RAP2PCR 技术^[1], 以 PCR 为基础构建 RNA 指纹图谱, 是研究基因差异表达的有效方法。该技术基于任意寡核苷酸引物与 RNA 之间可能的配对。这样的相互作用在低严谨度条件下经聚合酶催化使链延伸。

PCR 是该技术的主要步骤。细胞总 RNA 或 mRNA 作为反转录反应的模板。1 微克或更少的 RNA 即可进行反应, 并且不受少量基因组双链 DNA 污染的影响。用于合成 cDNA 第一链的引物为任意寡核苷酸引物, 其长度一般 6 至 25 个核苷酸。以 RNA 为模板在低严谨度条件下反转录产生 cDNA 第一链和第二链, 其序列与 RNA 互补。随后用 PCR 扩增来富集产物, 引物与反转录所用引物相同, 同时在反应体系中用³⁵S - dATP、³²P - dCTP 或³³P2dCTP 代替 dATP 或 dCTP, 进行放射性标记。经扩增后的产物可以在 4% 的测序胶上电泳, 然后放射自显影。也可用非放射性标记如荧光标记、银染等方法。如果将不同样品, 如同一品系不同组织的细胞或不同品系同一组织细胞的扩增产物作对照, 就可以将差异表达的微量 mRNA 放大, 建立 RNA 群体的指纹图谱, 在凝胶或 X 光片上显示出 cDNA 带谱的表型差异, 进而鉴定出不同细胞或同一细胞在不同条件下基因表达的差异。

收稿日期: 2000 - 04 - 17; 修回日期: 2000 - 05 - 29

基金项目: 上海市科委基金资助(99JC14024)

作者简介: 李 智(1972 -), 男, 博士研究生, 专业: 神经生物学。电话: 021 - 64748700 - 148, E-mail: lizhi57li@yahoo.com or bolizhi@ust.hk

从凝胶中回收差异条带,经纯化后进行 PCR 扩增(可同时进行放射性标记),扩增产物与适当载体连接,分析其核苷酸序列,与数据库资料(如 GenBank、GenEMBL 和 DDBJ)进行比较,若与已知序列同源性很低,则为潜在的新基因。或用作探针进行 Northern blot 杂交,也可从 cDNA 文库中筛选全长 cDNA。RAP2PCR 实验设计如图 1 所示。

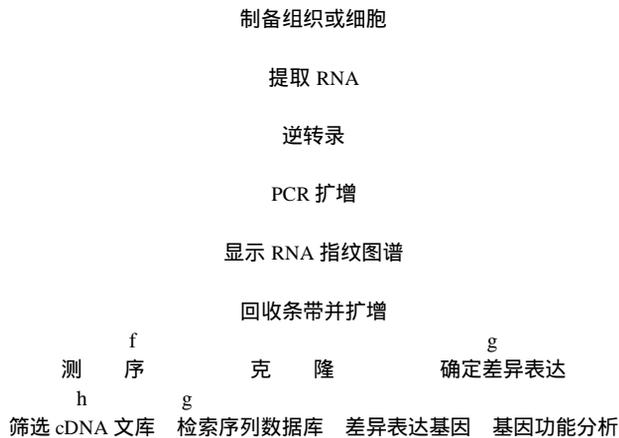


图 1 RNA 指纹图谱技术原理图

由于该法所需的总 RNA 很少,可从任何组织中获得 10 - 20 个清晰可见的 PCR 产物条带,而且是可重复的图谱。从不同小鼠系的相同组织中分离的 RNA 和从同种小鼠的不同组织中分离的 RNA 在 PCR 指纹图谱上可以检测出是有差异的。结合该技术的靶定 RNA 指纹图谱(targeted RNA fingerprinting, TRF)技术,用随机引物反转录 mRNA,随后用一套对应于特定基因家族编码区序列的简并引物进行扩增。鉴于数据库中已知的多基因家族序列资料,以 TRF 可对特定的多基因家族进行研究。许多实验表明,RAP2PCR 技术在一定条件下有较好的重复性,并且 RNA 浓度和 DNA 污染对结果无明显影响。但该法需要较高的变性温度和较低的离子强度;并且随机引物有可能于某一类基因的保守区或分散的基因重复区复性,因而只须选择性扩增这一类基因。

2 最新应用

视黄酸(retinoic acid, RA)在大脑发育过程中有重要作用,但其诱导神经元分化的分子机制不甚明了。Cheung WM 等(1997)在培养基中加入 10 μ mol/L all-trans RA,对培养的 NT2/D1(Ntera 2 cl. D1)细胞进行分化诱导,用 RAP2PCR 分析 NT2/D1 细胞在 RA 诱导的分化过程中基因转录及表达的差异^[2]。RA 诱导的时间分别为 1、2、3、7 天,对照组无 RA 诱导。结果表明 11 个基因的转录受 RA 调节。特异片段扩增后克隆在 pCRScript SK+ 载体上,测序并检索。其中 7 个为已知基因(如克隆 12.33,与人 CD59 序列有 100%同源性,克隆 32.2 与人 cadherin-6 序列有 95%同源性)。RA 诱导后,能加强或减弱它们的表达。而另外 4 个片段的核苷酸序列经检索与数据库存入序列无同源性,表明它们是 RA 诱导

后特异表达的新基因。如克隆 1.31,其表达水平很低,在 RA 诱导后的第 7 天,表达量达到最大,表明 RA 诱导能加强其表达。可能由于与大鼠基因序列同源性较低,经 Northern 印迹分析,该片段作探针与大鼠大脑和肝脏总 RNA 无杂交反应。Schweitzer B 等(1998)对 RAP2PCR 技术作适当改进并结合单链构象多态性(single strand conformation polymorphism, SSCP),分离了在大鼠坐骨神经发育过程中特异表达的 NMP35(neural membrane protein 35)蛋白的 cDNA^[3]。实验材料分别为出生后第 3 天(p3)、第 14 天(p14)和第 60 天(p60)坐骨神经细胞总 RNA。反转录 cDNA 第一链,引物 OPN24 长 10 个核苷酸,用于扩增的引物 Kin A1+、Kin A2+ 和 Kin A-,分别长 11、11 和 17 核苷酸。经扩增的 cDNA 在 SSCP 凝胶上分离,得到一特异的 209bp 片段 RAP-6B,在成年大鼠坐骨神经细胞中特异表达。用 RAP-6B 片段作探针,筛选 6 周龄大鼠 Zap cDNA 文库,得到一插入 1291bp cDNA 的阳性克隆,测序并推测出编码 316 个氨基酸的多肽,分子量约为 35 kDa。氨基酸序列与大鼠 GBP(glutamate-binding protein)有 42%同源性,与果蝇 NMDARA1 有 40%同源性。Northern 印迹能检测到该基因在 p60 坐骨神经细胞中特异表达,而在较年幼大鼠中结果呈阴性。NMP35 与 GBP 的表达均呈增量调节。但不同的是,NMP35 只在大脑和脊髓中有较高的表达,而 GBP 除在神经组织中大量表达外,在其他组织如肾脏、大肠中仍有一定量的表达,而且在发育早期其表达量比 NMP35 高。Schweitzer 认为 NMP35 和 GBP 属同一基因家族,在神经系统的发育中起重要作用。节段性回肠炎(Crohn's disease)是一种慢性肠炎,其病因不甚了解。Lafontaine DA 等(1998)用节段性回肠炎患者不同程度的炎症组织(如溃疡性结肠炎)和非炎症组织细胞总 RNA 为模板,随机六核苷酸为引物,经反转录和扩增反应得到一 1065bp 的特异片段,和载体 pCR 连接,双向测序,结果与序列数据库比较无明显同源性^[4]。经 Northern 印迹分析,探针能与一长 3.1kb 的 mRNA 结合。由于该序列含有几个回框,且与完整 mRNA 不完全对应,故对其编码的蛋白质尚需进一步研究。经 Dot 印迹杂交进一步证实此 3.1kb mRNA 为诊断节段性回肠炎的特异标记。

Sokolov BP 等(1994)报道^[5],用 RAP2PCR 方法简单地分离差异表达基因的 cDNA。所用反转录引物为六聚体核苷酸,扩增 cDNA 引物长 10 至 23 核苷酸(GC 含量为 60%~70%)。分离的 cDNA 长达 3.0kb,且量足够用于 Northern 印迹、克隆和测序分析,而不需作进一步放射性标记扩增。Nagase M(1999)以 0.3%和 8%饮食饲喂大鼠,用该技术分离了在大鼠肾小管特异表达的新基因^[6],其序列与尼古丁乙酰胆碱受体 7 亚基基因有 90%同源性,分离的全长 cDNA 含有与反转录基因 *pol* 同源的元件,属于一个新的转座子家族。差异片段回收时常会出现分子量相同的杂带混合。Gromova I(1999)等报道^[7],利用 Resolver Gold(bisbenzimidazole)

衍生物)与富含 A/T 序列优先结合的特点,回收片段经扩增后再用含 Resolver Gold 的胶进一步分离,则可以保证回收产物为均一所需差异片段。本实验室建立了神经元体外培养模型,用该技术克隆神经元在不同生理阶段特异表达的新基因,旨在进一步阐明神经元发育、分化和衰老的分子机制。图 2 为银染后的 RNA 指纹图谱。P1、P2、P3 和 P4 分别代表 RAP2PCR 扩增用的不同引物组合。D2、D4、D7 为不同生长阶段的样品。

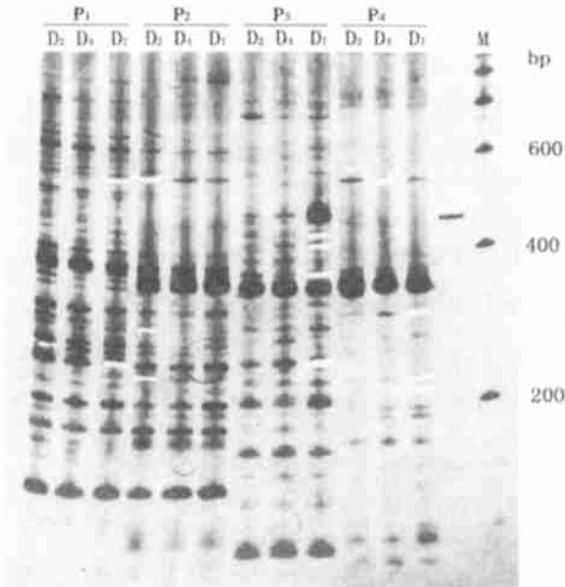


图 2 银染后的神经元 RNA 指纹图谱,空白处 DNA 已回收

3 展 望

RAP2PCR 是研究基因差异表达的有效工具,可用于快速分析细胞在不同条件下基因的表达差异,以及克隆有表达差异的基因。该技术经改进,如:(1)胶分离后经银染显示片段或直接荧光标记;(2)用不同的染料标记不同样本后在同一泳道分离片段;(3)扫描仪定量分析差异表达片段;(4)结合 SSCP,用非变性胶分辨大小相同而构象不同的片段,以及点突变的检测。以 RAP2PCR 为基础的基因组指纹图谱分析方法,可应用于序列多态性遗传作图、菌株鉴定和种群特性分析。随着这一技术的不断完善和应用,它在生物发育、细胞周期调控、信号传导、遗传突变诊断、肿瘤的诊断及治疗等领域会有更广阔的应用前景。

参 考 文 献(References):

[1] Welsh J, Chada K, Dalal S S, *et al.* Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA[J]. *Nucleic Acids Res.* 1992, 20:4965 ~ 4970.
 [2] Cheung W M, Chu A H, Ip N Y. Identification of candidate genes induced by retinoic acid in embryonal carcinoma cells[J]. *J Neurochem.* 1997, 68:1882 ~ 1888.
 [3] Schweitzer B, Taylor V, Welcher A A. Neural membrane protein

35 (NMP35): a novel member of a gene family which is highly expressed in the adult nervous system[J]. *Mol Cell Neurosci*, 1998, 11:260 ~ 273.
 [4] Lafontaine D A, Mercure S, Perreault J P. Identification of a Crohn's disease specific transcript with potential as a diagnostic marker[J]. *Gut*, 1998, 42:878 ~ 882.
 [5] Sokolov B P, Prockop DJ. A rapid and simple PCR - based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes[J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22:4009 ~ 4015.
 [6] Nagase M, Kato A, Ono T, *et al.* Retrotransposons transcribed preferentially in proximal tubules of salt - hypertensive rats[J]. *Kidney Int*, 1999, 55:995 ~ 1004.
 [7] Gromova I, Gromov P, Celis J E. Identification of true differentially expressed mRNAs in a pair of human bladder transitional cell carcinomas using an improved differential display procedure [J]. *Electrophoresis*, 1999, 20:241 ~ 248.
 [8] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. *Science*, 1992, 257:967 ~ 971.
 [9] Melia M J, Bofill N, Hubank M, *et al.* Identification of androgen - regulated genes in mouse kidney by representational difference analysis and random arbitrarily primed polymerase chain reaction [J]. *Endocrinology*, 1998, 139:688 ~ 695.
 [10] Kociok N, Unfried K, Esser P, *et al.* The nonradioisotopic representation of differentially expressed mRNA by a combination of RNA fingerprinting and differential display [J]. *Mol Biotechnol*, 1998, 9:25 ~ 33.
 [11] Rothschild C B, Brewer C S, Offden D W. DD/AP - PCR: combination of differential display and arbitrarily primed PCR of oligo (dT) cDNA[J]. *Anal Biochem*, 1997, 245:48 ~ 54.
 [12] Neto E D, Harrop R, Correa Oliveira R. Minilibraries constructed from cDNA generated by arbitrarily primed RT - PCR: an alternative to normalized libraries for the generation of ESTs from nanogram quantities of mRNA[J]. *Gene*, 1997, 186:135 ~ 142.
 [13] Ricote M, Geller P, Perucho M. Frequent alterations in gene expression in colon tumor cells of the microsatellite mutator phenotype[J]. *Mutat Res*, 1997, 374:153 ~ 167.
 [14] Muller Ladner U, Judex M, Justen H P, *et al.* Analysis of gene expression patterns in rheumatoid synovial fibroblasts using RAP - PCR for differential display[J]. *Med Klin*, 1999, 94:228 ~ 232.
 [15] Heaton M P, Laegreid W W, Beattie C W, *et al.* Identification and genetic mapping of bovine chemokine genes expressed in epithelial cells[J]. *Mamm Genome*, 1999, 10:128 ~ 133.
 [16] Navarro J M, Jorcano J L. The use of arbitrarily primed polymerase chain reaction in cancer research [J]. *Electrophoresis*, 1999, 20:283 ~ 290.
 [17] 鲁林荣, 郑仲承. mRNA 差异显示技术——一种鉴别差异表达基因的新方法[J]. *生命的化学*, 1994, 14:40 ~ 42.
 [18] 王尧河, 王 宏, 夏贞彪, 等. 用银染 mRNA 差异显示进行基因筛选[J]. *生物技术通讯*, 1998, 9:115 ~ 117.