

不易感动脉粥样硬化动物北京鸭肝 cDNA 文库的快速构建

吕新跃 陈保生 王克勤 薛红

(中国医学科学院 中国协和医科大学基础医学院生物化学室, 北京 100005)

Construction of Liver Cells cDNA Libraries of Beijing Duck Insusceptible to Atherosclerosis

LU Xin-Yue, CHEN Bao-Sheng, WANG Ke-Qin and XUE Hong

(Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China)

ABSTRACT

Aim To study the gene structures of apolipoproteins of Beijing duck insusceptible to atherosclerosis, the cDNA libraries of duck liver cells were quickly constructed at the first time.

Methods With single-step method, total RNA was isolated from duck liver tissue, following purification of mRNA which passed through oligo dT cellulose chromatography. Using mRNA as the template, the first and second strands of the cDNAs were synthesized in Time Saver cDNA synthesis Kit. After been ligated with EcoRI/NotI adaptors, the cDNAs were cloned into the arms of λ gt10 or λ gt11 vectors. Then the recombinants of λ DNA were packed to infect E. coli Y1090 strain.

Results Duck liver cDNA libraries with high titer were obtained and rate of positive recombinants was over 98.5%. Autoradiography showed that sizes of cDNA products were in 400~5 000 bp. Each clear plaque DNA which was identified by endorestriction enzyme digestion contained the cDNA insert. Full length cDNA sequence of duck apoAI was cloned and sequenced from the cDNA library constructed.

Conclusion Compared with conventional method of constructing cDNA library the present one is simple,

time-saving and easy to be used. Some problems of using the method to construct cDNA library were discussed in detail.

KEY WORDS cDNA library; Construction; Beijing duck; Apolipoprotein AI

摘要 为了研究不易感动脉粥样硬化动物北京鸭多种载脂蛋白的基因分子结构,在国内外首次快速构建了鸭肝细胞 cDNA 文库。采用一步法提取鸭肝细胞总 RNA;寡核核苷酸为吸附介质,柱层析法进一步提取 mRNA。以此为模板,利用改良的 cDNA 合成方法,反转录合成鸭肝细胞 cDNA 的第一、二链。经 cDNA 双链末端修饰,连接含双酶切位点的连接子后重组于噬菌体载体,包装后获得高滴度的鸭肝细胞 cDNA 文库,放射自显影显示合成的 cDNA 产物大小在 400~5000 个核苷酸之间,该文库的克隆重组率 98.5% 以上,随机提取白色噬菌斑 DNA,酶切鉴定均有 cDNA 插入片段。以制备的兔抗鸭 apoAI 多抗为探针,从构建的 cDNA 文库中克隆出鸭 apoAI cDNA 核苷酸序列,与常规方法比较,本法简便、快速,易于操作和掌握。本研究还对应用此方法构建 cDNA 文库的某些环节进行了讨论。

关键词 cDNA 文库; 构建; 北京鸭; 载脂蛋白 AI

北京鸭为王克勤等^[1]发现并建立的不易感动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)动物模型。一系列实验表明^[1~3]该动物血清中高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)约占总胆固醇的 65%;除高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)中有大量的载脂蛋白 AI(apolipoprotein AI)分布外,低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)组份中也有载脂蛋白 AI 的活性。血浆胆固醇主要由 HDL 携带,且主要通过 HDL 受体途径进行代谢。为了进一步从基因分子水平对这种独特的抗 As 动物体内各种载脂蛋白及脂蛋白受体结

构特点和功能进行研究,我们利用 Pharmcia 公司生产的 Time Saver cDNA 合成试剂盒,结合使用简便的 RNA 分离技术,快速构建了多个高滴度的北京鸭肝细胞 cDNA 文库,使整个建库周期由原来常规方法所需的 1~2 周短缩为 2 天。并从构建的表达文库中克隆出完整的鸭载脂蛋白 AI cDNA 序列^[4]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性成年北京鸭,购自北京海淀肖家河养鸭场。

1.1.2 试剂 cDNA 合成试剂盒(Time saver cDNA synthesiskit),Pharmcia 公司产品;寡脱氧胸苷酸纤维素(Oligo-dT cellulose),购自德国 Boehringer mannheim 公司;异硫氰酸胍(guanidine isothiocyanate),GIBCO 公司产品;3-(N-吗啉代)丙磺酸、焦磷酸二乙酯(DEPC)及十二烷基肌氨酸钠均为美国 Sigma 公司生产;包装蛋白及噬菌体载体(λ gt 10 和 λ gt 11)及 EcoRI 限制性内切酶均购自 Promega 公司;其余试剂为国产分析纯。

1.1.3 仪器 UV-120-02 型紫外分光光度计,日本岛津产品。

1.2 方法

1.2.1 鸭肝组织总 RNA 的分离提取 手术取出鸭肝组织,立即置于液氮冷冻。称取 1 g 鸭肝,快速在含液氮的研钵内研碎肝组织,将已研碎的肝组织加入到预冷的 10 mL 溶液 D 中(4 mol 异硫氰酸胍;25 mmol 柠檬酸钠,pH 7.5,0.5%十二烷基肌氨酸钠及 0.1 mol β -巯基乙醇),用 polytry 匀浆器匀浆约 30 s,再加等体积的抽提溶液[2 mol/L 乙酸钠 pH 4.0;水平衡的酚及氯仿-异戊醇(49:1)]混合后,按一步法^[5]提取鸭肝组织 RNA,将 RNA 沉淀溶于焦磷酸二乙酯处理的水后,在紫外分光光度计上测定波长为 260 nm 和 280 nm 的光密度值(OD_{260} 和 OD_{280}),以确定所提取的 RNA 浓度及含量。取 5 μ L 样品行 RNA 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,以鉴定 RNA 的质量。

1.2.2 鸭肝细胞 mRNA 的纯化 取 0.35 μ g Oligo-dT 纤维素,用 10 mL 0.1 mol/L 的 NaOH 悬浮后,装柱,计算柱床体积约为 1 mL。然后按文献^[6]报道的方法提取 polyA⁺RNA,洗脱后的溶液经酒精沉淀及洗盐后,溶于 DEPC 处理的双蒸水中,分别在 280、260 和 230 nm 波长下进行紫外分光光度测定,以计算 mRNA

的浓度。

1.2.3 cDNA 又链合成 取含 3 μ g mRNA 的水溶液稀释至 20 μ L,65 C 保温 10 min,迅速放置冰上。在 5 min 内先后加入 1 μ L 200 mmol/L 的 DTT 溶液和 1 μ L oligo(dT)_{12~18} 引物(0.5 μ g)及一链反应混合液(鼠源性逆转录酶,RNA guard, dATP, dCTP, dTTP 及 dGTP,及不含 RNase 的小牛血清白蛋白),轻轻混匀,37 C 孵育 1~1.5 h,反转录合成 cDNA 的一链。同时进行一链合成反应的同位素掺入和检测。取 1 μ L(10 μ ci) α -³²P dCTP,加入一链反应平行管中进行同位素掺入。

将内含 RNase H、大肠杆菌 DNA 聚合酶和四种核苷酸的二链反应混合液加至上述反应管,轻轻混匀,并加入 10 μ ci(α -³²P) dCTP,在 12 C 条件孵育 30 min,然后放置 22 C 反应 1 h,65 C 孵育 10 min,终止二链合成。

取一、二链合成的示踪产物(经酚抽提、乙醇沉淀和去离子水溶解后)各 10 μ L,加入等体积的 2 \times 样品缓冲液(20 mmol NaOH,20%甘油及适量溴酚兰),进行 1.2% 碱变性凝胶电泳,用(α -³²P)dATP 标记的 λ DNA Hind III 为分子量标准。待溴酚兰移至凝胶全长的 2/3 时,停止电泳。将凝胶置于 7% 的三氯乙酸浸泡 30 min,滤纸吸附多余水份,置暗盒中压片,-70 C 曝光。

1.2.4 cDNA 的分级分离 室温下对合成的 cDNA 的双链产物进行酚/氯仿抽提一次,离心 1 min,取上清液约 100 μ L 加入事先已用连接缓冲液(66 mmol Tris, pH 7.6, 0.1 mmol 精胺,6.6 mmol MgCl₂, 10 mmol DTT, 150 mmol NaCl)平衡好的 Sepharos CL-4B 离心柱顶端,以 1 500 r/min 速度离心 2 min,去除小的 cDNA 碎片,收集离心后纯化的二链 cDNA。

1.2.5 双链 cDNA 末端连接 EcoRI、NotI 接头 向上述离心洗脱液中(约 80~100 μ L)中依次加入 3 μ L CcoRI/NotI 接头、30 μ L PEG 缓冲液、1 μ L(1:4 稀释)ATP 稀释溶液及 1 μ L T4 连接酶,混匀后 16 C 孵育 1 h,65 C 变性 10 min 以终止反应。

加入 1 μ L T4 多核苷酸激酶,对 5'端连接于磷酸化(37 C 30 min),于 65 C 加热 10 min,在室温下重复以上酚/氯仿抽提过程及离心柱层析,以去除未连接的衔接子,收集洗脱液。

1.2.6 双链 cDNA 的重组与包装 各取 1 μ g 已线性化的 λ gt-11 两臂为载体,洗脱液(双链 cDNA)以三种比例(10 μ L、20 μ L、30 μ L)与载体进行连接,以选择合适的连接浓度。

将三种体积的双链 cDNA 与 1 μ g(2 μ L) λ gt-11 臂混合后,加 0.1 体积的 3 mol/L 乙酸钠及 2.5 倍体积的无水乙醇共沉淀后,再溶于 8 μ L 的连接缓冲液中,加入

1 μL T4 连接酶和 1 μL 稀释的 ATP, 混匀后 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。

将连接体系中加入 2.5 倍的乙醇, 以 12 000 r/min 离心沉淀, 干燥后溶于 5 μL 的连接缓冲液中。取 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冻存的包装蛋白 (50 μL) 放置冰上, 待其刚溶化, 立即吸出 25 μL 加入一个 5 μL 的连接体系中, 同时将另一个连接体系加入剩余的包装蛋白溶液中, 轻弹管底部混匀, 放置于 22 $^{\circ}\text{C}$ 约 3 h。然后分别加入 223 μL 的 phage buffer (20 mmol/L Tris pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgSO_4) 和 13 μL 的氯仿于包装后的 $\lambda\text{gt-11}$ 噬菌体溶液中。

1.2.7 cDNA 文库的滴度测定 按 1:100、1:1 000、1:10 000 比例稀释噬菌体包装混合物, 分别取 100 μL 不同比例稀释物加至等体积的 Y1090 大肠杆菌菌液 (细菌最适浓度为 $\text{OD}_{600}=0.6\sim0.8$)。37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min, 使噬菌体吸附细菌。然后加 3~5 mL 溶化的 TB 顶层凝胶 (45 $^{\circ}\text{C}$), 快速上下颠倒混匀, 倾至 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 LB 培养板, 待室温下顶层凝胶凝固后, 反转放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养约 6~8 h。计数噬菌斑生成数目, 并按下式计算噬菌体 cDNA 文库滴度:

$$\frac{\text{所有噬菌斑数目} \times \text{稀释倍数}}{\text{所有菌体包装混合物的量}} = \text{噬菌斑形成单位}$$

1.2.8 cDNA 文库的重组率及插入片段大小分析

按上述方法稀释噬菌体包装混合物, 并与等体积 Y1090 菌株在 37 $^{\circ}\text{C}$ 共孵育 30 min。在顶层凝胶中加入 0.7 mL 的 IPTG (20 g/L 储存液) 和 0.7 mL 的 X-Gal (50 g/L 储存液), 顶层凝胶间细菌与噬菌体包装混合物快速混匀后, 铺板。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6~8 h, 观察蓝、白噬菌斑的形成, 计算 cDNA 文库的重组率。

随机从文库中挑选六个克隆 (白斑), 按平板裂解物法提取 $\lambda\text{gt-11}$ 噬菌体 DNA, EcoRI 酶切后, 进行 1% 琼脂糖电泳, 观察随机插入的 cDNA 片段的大小。

1.2.9 鸭载脂蛋白 AI cDNA 阳性克隆的筛选 应用制备的兔抗鸭载脂蛋白 AI 多抗血清, 参照免疫学方法^[6]对表达型 cDNA 文库进行筛选。

凝胶层析两次后, 紫外分光光度计检测 mRNA 约占总 RNA 的 1.5% 左右, 从 2 mg 鸭肝总 RNA 中纯化出 30 μg mRNA。测得 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 和 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 的比值均为 2, 提示分离的 mRNA 组份不含蛋白质及过多的盐, 适宜作为 cDNA 合成的模板。

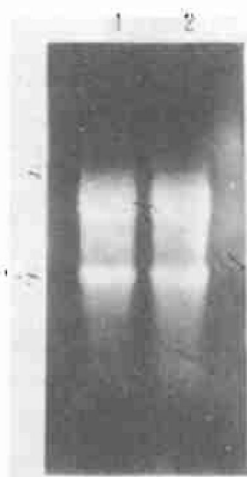


Figure 1. Analysis of total RNA of duck liver cells with 1% Formaldehyde agarose electrophoresis.

Lane 1 and Lane 2: total RNA

2.3 cDNA 双链的合成及鉴定

由图 2 (Figure 2) 可见, 本实验合成的 cDNA 产物大小在 400~5 000 bp 之间。该文库的滴度为 5.6×10^6 pfu/L。蓝白斑实验显示该文库的重组率为 98.5% 以上, 可见该文库的内容量及克隆效率均较高, 可以从中筛选到所需要的 cDNA。

提取 6 个随机挑取的白色噬菌斑 DNA, 经 EcoRI 酶切鉴定, 其插入片段在 0.7~1.8 kb 之间。个别插入片段切出两条带, 示 cDNA 插入子含 EcoRI 酶切位点 (图 3, Figure 3)。

2.4 鸭载脂蛋白 AI cDNA 克隆的筛选

利用免疫学方法, 对该文库进行表达筛选, 我们得到 10 个载脂蛋白 AI cDNA 的重组克隆。经亚克隆测序, 获得完整的鸭载脂蛋白 AI cDNA 序列, 这一新基因已被 Genbank 接收。该序列将另文报道。

2 结果

2.1 鸭肝总 RNA 的提取

提取的鸭肝细胞总 RNA 经甲醛变性凝胶电泳鉴定, 总 RNA 28S:18S 组份为 2:1。表明提取的 RNA 完整, 无明显降解 (图 1, Figure 1)。

2.2 Poly A⁺RNA 的纯化

鸭肝细胞总 RNA (2 mg) 经 Oligo dT-纤维

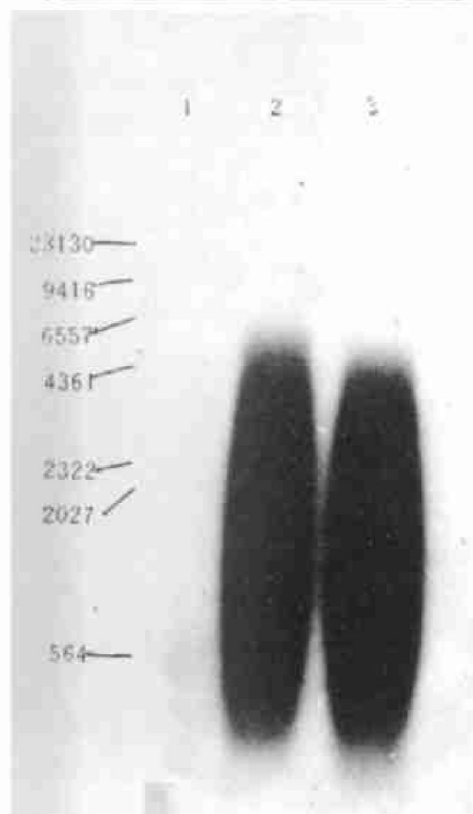


Figure 2. Autoradiography analysis of the size of cDNA synthesized with 1, 2% alkaline agarose gel electrophoresis. Lane 1: λ DNA/Hind III; Lane 2: the second strand; Lane 3: the first strand of the cDNA

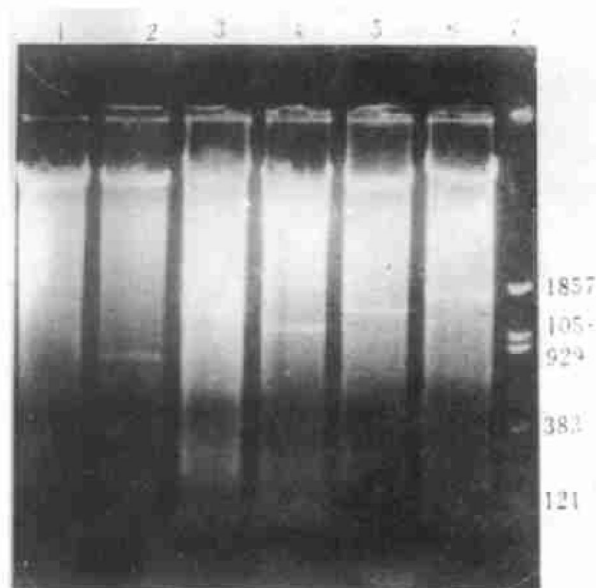


Figure 3. Insert size analysis of the recombinants in duck liver cDNA library. Lane 1-6: inserts of the recombinants; Lane 7: pBR322/BstNI

3 讨论

利用分子克隆技术,建立 cDNA 文库,然后

用适当的探针从中筛选和分离目的基因,是获取新基因的有效手段。同基因组文库比较,cDNA 文库具有可获得基因的连续编码顺序,容易在宿主细胞中表达,筛选效率高等优点。cDNA 文库的全员性与其模板 mRNA 的完整性密切相关,RNA 的质量高低是构建高滴度 cDNA 文库的重要前提。因此,在制备总 RNA 时,我们采用一步法来缩短提取步骤和时间,严格操作,最大限度地避免总 RNA 的降解。分离总 RNA 在三小时之内即可完成。经 Oligo dT-纤维素柱层析,洗脱后得到纯化的 mRNA。在 cDNA-链合成前对 mRNA 的变性时间要充分,65°C 10 min 以上。根据经验,冰上放置不应超过 5 分钟,以免核酸的二级结构恢复,不能使一链反应液与其充分反应。

以往 cDNA 一链合成多使用鸟源性反转录酶(AMV),它含部分 RNaseH 活性,会导致 cDNA 合成过程中 mRNA 模板的水解。此法则使用无 RNase 活性的鼠源性反转录酶(M-MLV),因而能保证合成的 cDNA 一链片段长度。

合成后的双链 cDNA 两端连上双酶切位点的接头,其优点在于:①带有这种接头的 cDNA 可直接与含 EcoRI 粘性末端的载体相连,而不必按常规 cDNA 文库构建过程中进行甲基化及 EcoRI 酶切;②当 cDNA 插入片段中有 EcoRI 位点时,可利用接头上 NotI 另一位点,进行酶切或克隆完整的目的 cDNA。

实验中发现,以合适比例的双链 cDNA 与载体 λ gt 噬菌体进行连接,是获得高滴度 cDNA 文库的另一关键。这在操作说明中并无明确说明,而要求实验者进行多种比例的摸索配对。根据我们多次建库的经验,以 1/4 体积的双链 cDNA 洗脱液与 1 μ g 载体(λ gt10 或 gt11)进行共沉淀后连接,都能得到 10^6 pfu/mL 高滴度的 cDNA 文库。依据建库要求^[6],一个可容纳任一低丰度 mRNA,并以 99% 的概率获得其克隆的 cDNA 文库的重组子应为 1.7×10^5 ,我们按此法构建的 cDNA 文库均在此标准以上。

总之,我们结合使用一步法提取总 RNA

并经 OligodT-纤维素柱层析分离 mRNA, 并以此为模板, 在国内外首次构建了不易感 As 动物北京鸭肝细胞 cDNA 文库, 并从中筛选出鸭 apoAI 的完整 cDNA。实践证明, 这种改良的快速 cDNA 合成法省时、高效、易于操作和掌握。这就为我们进一步深入研究不易感 As 动物的基因分子结构提供了有力的工具。

参考文献

- 1 王克勤, 李志高, 郝扞林, 等. 血清脂蛋白运转胆固醇的特点及其在抗鸭动脉粥样硬化中的作用. 中国医学科学院学报, 1986, 8(2): 88~93.
- 2 Wang KQ, Chen BS, Xie YH, et al. Are tree shrews and Beijing ducks good models for the study of the anti-atherogeniety HDL? *Atherosclerosis X*, 1995, 126~131.
- 3 武须军, 李志高, 王克勤. 北京鸭血清低密度脂蛋白-载脂蛋白 AI 及其性质的初步研究. 生物化学与生物物理进展, 1991, 8(4): 305.
- 4 吕新跃, 陈保生, 王克勤. 北京鸭肝组织 cDNA 文库的构建及载脂蛋白 AI cDNA 克隆的筛选和测序. 中国医学科学院学报, 1997, 19(1): 5.
- 5 Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytic Biochem*, 1987, 162: 156~159.
- 6 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 7.26~8.80.
- 7 Pharmacia Biotech. Instructions of time saver cDNA synthesis kit. 1995, 1~35.
- 8 Young RA, Davis RW. Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80: 1194~201.

(1997-09-09 收到)