

相异物种同源基因 cDNA 的快速克隆

赵同标^{1,2} 赵新全¹ 常智杰³ 赵伟^{1,2} 孙平^{1,2} 徐世晓^{1,2} 宋娅莉^{1,2}¹中国科学院西北高原生物研究所,西宁 810001;²中国科学院研究生院,北京 100039;
³清华大学生物科学与技术系基因组研究所,北京 100084)

摘要: 介绍了一种结合生物信息学数据库的比较分析,在系统发生相近物种的核酸保守区设计 PCR 引物,通过 RT-PCR 和 RACE 方法,在相异物种中快速克隆同源基因 cDNA 的一种简捷方法。

关键词: 克隆 cDNA 核酸保守区 RT-PCR RACE

Rapid Cloning Homologous cDNA from Different Species

Zhao Tongbiao^{1,2} Zhao Xinquan¹ Chang Zhijie³ Zhao Wei^{1,2}
Sun Ping^{1,2} Xu Shixiao^{1,2} Song Yali^{1,2}¹ Northwest Plateau Institute of Biology CAS, Xining 810001;² Graduated School of the Chinese Academy Sciences, Beijing 100039;³ Tsing Hua Institute of Genome Research, Beijing 100084)

Abstract: A rapid and concise method for homologous cDNA cloning from different species was recommended. Designing the primers in the conserved domains according to the relative species, homologous cDNA from different species can be rapidly cloned by RT-PCR and RACE.

Key words: Clone cDNA Nucleic acid conserved domains RT-PCR RACE

随着人类基因组计划的完成,各种生物信息学数据库的迅速完善,尤其是表达序列标签(Expressed Sequence Tags, EST)数据库和基因组数据库的不断扩充^[1,2],使得寻找并克隆感兴趣基因的工作变得越来越容易。然而,某些情况下,为了特殊的研究目的,我们要在特有实验材料中克隆感兴趣基因 cDNA 研究其功能,这种基因克隆的策略和通常在人或小鼠等具有基因组数据库的物种中寻找并克隆新基因有较大的差别。本文介绍了一种在不具有基因组数据库的特有物种中克隆同源基因 cDNA 的快速而简捷的方法。

1 目的基因生物信息学分析与引物设计

首先,在 NCBI 核酸数据库中找到感兴趣基因的 cDNA 全序列。由于核酸数据库中的许多基因 cDNA 片段并非全长,因而,要想找到该基因 cDNA 的全长,可选取同待克隆物种亲缘关系相近物种的序列,在 NCBI 的 BLAST 中,执行 BLAST 同源搜

索,找到目的基因的 cDNA 全长,同时可获得该基因在哪些物种中已经被克隆。

选取数据库中该基因 cDNA 序列和蛋白序列(一般可选 2~7 种亲缘关系相近物种的序列),输入到 Bioedit 或其他序列分析软件上,通过蛋白质和核酸序列的同源比对(Clustalw Multiple Alignment),找到该基因氨基酸序列的高度保守区,确定并标出与之相对应的核酸序列的确切位置(为进一步确认所找到的高度保守区序列,可选取其中一条氨基酸序列,NCBI 中执行蛋白质 EST 的 BLAST 同源搜索并进行 CD-Search,分析对比,若所找到的保守序列恰好是蛋白序列的某些同源功能区,则可进一步验证所找到的高度保守区的准确性,当然,也可直接先进行 CD-Search,再确定核酸的确切位置)。

选取与目的物种亲缘关系上最相近的物种的核酸序列的保守区片段,在此范围内设计 PCR 上游引物和下游引物。若目的基因核酸片段序列过长,可

在不同的保守区内设计多对引物,采用分段 PCR 技术。为确保试验的成功率,可以在每个相应的保守区内设计两对 PCR 引物,进行巢式 PCR^[3]。同时,若保守区内几种系统发生相近物种的核酸序列也不完全相同,可根据具体情况设计兼并引物来增加试验的成功率。

引物的设计及评价可用 Bioedit、DNAclub 等软件辅助进行。

2 物种组织或细胞总 RNA 的提取

采用 Trizol reagent 一步抽提法,提取总 RNA。要保证 RNA 的完整性,且无 DNA 污染。

3 RT-PCR 扩增目的基因 cDNA 片段

用以上保守区内设计的引物,参照 Promega 公司 RT-PCR 试剂盒说明在 PCR 管中,建立 50 μ l 反应体系,按照计算出的退火温度,进行 RT-PCR 扩增。可通过多次试验优化 PCR 扩增的最佳条件。若目的基因 cDNA 片段较长,可采用分段 PCR 扩增的策略。

4 RACE(Rapid amplification of cDNA ends) 克隆目的基因 cDNA 末端

获得了目的基因 cDNA 部分片段后,可采用 RACE 方法扩增末端序列^[4,5]。参照 Clontech 公司 RACE 试剂盒的说明,先合成 cDNA 第一链,再分别进行 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增目的基因的 5 端和 3 端。同样通过巢式 RACE 技术可大大增加扩增的效率^[6]。

5 TA 克隆

对 3,4 的 PCR 产物目的片段进行回收纯化,参照 Promega 公司 TA 克隆试剂盒的说明,进行连接、转化、挑单克隆、接种完成其亚克隆过程。提取质粒,选取合适的酶切位点进行酶切初步鉴定,对目的片段进行测序分析进一步验证片段的正确性,得到序列信息。

若 cDNA 片段较长,分段克隆出各个片段之后(包括 5 末端和 3 末端),利用相邻片段间的重叠区可拼接出 cDNA 全长。

6 综合分析确定全长 cDNA

通过必要的生物信息学分析和相应的实验,验证所得基因 cDNA 的完整性和准确性。生物信息学

的分析主要是指在克隆出的目的片段的 5 端区域找到核糖体结合位点,这一标志性序列在真核生物中被称为 KOZAK 序列,其序列一般为 A/GCCA/GCCATGG,在原核生物中被称为 Shine-Dalgarno 序列,其序列为 AGGAGGACAGCTATG^[7],在 3 末端区域找到终止密码子并且具有多聚 A 尾巴^[8]。当然,对所得的核酸序列应用生物学软件进行翻译验证是必不可缺的步骤。此后再同亲缘关系相近的已知同源基因 cDNA 片段进行同源比对分析,若同源性较高同时不存在片段长度上的显著差别,则可初步确定目的基因的完整性;若存在片段长度上的显著差别,则有以下几种可能:其一,所克隆的目的基因与已知的同源基因在片段长度上就存在着事实上差别,其二,所要克隆的目的基因在转录水平上存在着多种 RNA 剪接方式。随后的一系列基因功能研究可进一步确定所克隆基因应该属于何种情况。其中 Northern 杂交实验可快速确定所克隆到的 cDNA 是否为全长。

7 结语

成功克隆相异物种同源新基因 cDNA,PCR 引物的准确设计是最关键之处。物种中蛋白和核苷酸序列进化上的保守区往往是其行使功能的区域,而不同物种的同源基因的功能会有很大的相似性,因而在核酸同源保守区设计 PCR 引物具有可靠的理论基础;而不同物种的同源基因在长期分子进化过程中经过自然选择的作用,其核苷酸序列有可能发生突变,因而设计兼并引物是保证快速克隆目的基因的可行的简捷的策略。

核苷酸序列较长的基因 cDNA 在采取分段克隆策略时,相邻片段引物的设计一定要使得相邻片段之间有一个至少 100bp 到 200bp 的重叠区,同时确保此片段范围内具有合适的酶切位点,以便能准确地把各个亚克隆片段拼接起来。

由于有些物种 mRNA 在翻译成蛋白质时存在多种剪接方式,因而通过分段克隆所得到的较长基因 cDNA 核苷酸序列,理论上讲存在着不确定性,即通过分段扩增所拼接出的 cDNA 全长并不一定是真正的目的基因 cDNA 的全长,有可能是该物种 mRNA 的不同的剪接方式,所以结合生物信息学知识分

(下转第 18 页)

7 其它功能

Ross G. [19]研究了转基因苹果中 *PG* 过量表达时,苹果树发育的状况。研究表明转基因苹果叶片色泽发生较大变化。与对照野生型苹果相比,叶片颜色表型发生明显的改变;在成熟叶片中 *PG* 过量表达;另外还影响胞间果胶含量和气孔功能。由此可进一步看出 *PG* 功能的多样性。说明 *PG* 的功能比我们目前掌握的要广泛的多,研究 *PG* 在植物发育过程中的功能切入点也多。

结束语

多聚半乳糖醛酸酶的发现已有近 40 的历史了,但它在果实成熟软化中的确切功能以及在植物发育过程中的广泛作用至今仍不十分清楚。孤立的研究 *PG* 功能已不能阐明果实软化机理,也不利于全面揭示 *PG* 的多功能本质。我们的实验表明,*PG* 对果实的成熟软化起着重要作用,改变 *PG* 基因的表达水平会影响果实的品质(如质地、光泽等)和贮藏加工性能。另外,我们用 NaCl 和 PEG 处理番茄幼苗,发现 *PG* 表达量增强,同时 LOX 表达水平也提高,说明胁迫诱导 *PG* 基因表达,*PG* 有可能作为一种信号分子参与植物防御系统(待发表)。因此,我们应该利用分子生物学理论技术结合细胞壁水解相关因子——伸展蛋白(EXP)、木葡聚糖内糖基转移酶(XET)、-半乳糖苷酶、纤维素酶等;结合乙烯、脱落酸、茉莉酮酸、水杨酸等信号分子进行更深入的研究,系统阐明 *PG* 的功能多样性。

参考文献

- 1 Sheehy RE, Kramer MK, Hiatt WR. Proc Natl Acad Sci USA, 1988,85(8): 805~809.
- 2 Smith CJS, Watson CF, Morris PC, et al. Plant Mol Biol, 1990, 14:369~379.
- 3 Smith CJS, Watson CF, Ray J, et al. Nature, 1988, 34:724~727.
- 4 Bird CR, Smith CJS, Ray JA, et al. Plant Mol Biol, 1988, 11:651~652.
- 5 Jocel YN KC, Rose, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 5955~5960.
- 6 David A. Brummell, et al. The Plant Cell, 1999, 11:2203~2216.
- 7 Tebbutt S J, Roger H J. Plant Mol Biol, 1994, 25:283~297.
- 8 Mascarenhas J P. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1990, 41: 317~318
- 9 Taylor J E, Tucker GA, Lasslet Y, et al. Planta, 1990, 183:133~138.
- 10 Kalaitzis P, Solomos T, Tucker ML. Plant Physiology, 1997, 2: 263~274.
- 11 DellaPenna D, Lincoln J E, Fishher R L. Plant Physiology, 1989, 90:1372~1377.
- 12 Hadfield KA, Jocelyn K, C Rose, et al. Plant Physiology, 1998, 117:363~373.
- 13 Sitrit Y, Bennett AB, 1998, 116:1145~1150.
- 14 Wang ZY, Macrae EA, Wright MA, et al. Plant Mol Biol, 2000, 42: 317~328.
- 15 Begey DR, Orozco-Cardenas ML, Moura DS, Ryan CA. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 1756~1760.
- 16 Orozco-Cardenas ML, Narvaez-Vasquez J, Ryan CA. The Plant Cell, 2001, 13:179~191.
- 17 Atkinson RG, Bolitho KM, Wright MA, et al. Plant Mol Biol, 1998, 38:449~460.
- 18 KA, Bennett AB. Plant Physiol, 1998, 117:337~343.
- 19 Atkinson RG. Plant Physiology, 2002, 129:122~133.

(上接第 14 页)

析并对所克隆的同源基因 cDNA 进行完整性与准确性的实验验证是必不可少的步骤。随着基因组学及现代生物技术的飞速发展,特殊实验材料中寻找特定的基因,并研究其功能的工作越来越重要。这种简捷而有效的快速克隆策略必将成为特殊物种基因功能研究的强有力的基础性工具。

参考文献

- 1 Pennisi E. Science, 2000, 288(5475): 2304~2307.
- 2 Howard K. Sci Am, 2000, 283(1): 58~63.

- 3 Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. Mol Biochem Parasitol, 1993, 10, 61(2): 315~320.
- 4 Frohman MA, Dush, GR Martin. Proc Natl Acad Sci, 1988, 85: 8998~9002.
- 5 Ohara O, RI Dorit, W Gilbert. Proc Natl Acad Sci, 1989, 86: 5673~5677.
- 6 Frohman MA, GR Martin. Technique 1, 1989, 165~173.
- 7 Kozak M. The Journal of Cell Biology, 1989, 108: 229~241.
- 8 朱玉贤, 李毅. 现代分子生物学, 北京:高等教育出版社, 1997, 170~235.