

# 抑制性差减杂交方法克隆重力适应相关基因

胡晓旻<sup>1</sup> 孙晓文<sup>2</sup> 李喜文<sup>3</sup> 刘丽<sup>4</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

(2. 山东大学附属第二医院泌尿外科, 济南 250033)

(3. 东北师范大学细胞与遗传研究所, 长春 130024)

(4. 北京空军总医院分子生物学研究中心, 北京 100036)

**[摘要]** 采用抑制性差减杂交方法, 分别从经重力环境改变适应性锻炼(实验组)和未经重力环境改变适应性锻炼(驱动组)的两组 SD 大鼠的淋巴细胞中分别提取 RNA 和 mRNA, 并经逆转录酶合成 cDNA, 经 *Rsa* I 酶切后将实验组 cDNA 分为 2 组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与驱动组 cDNA 进行 2 次消减杂交及 2 次抑制性 PCR, 将产物与 T/A 载体连接构建 cDNA 消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增. 随机挑选 80 个克隆, 通过斑点杂交, 初步筛选出 20 个阳性克隆.

**[关键词]** 抑制性差减杂交; 重力环境; 基因克隆

**[中图分类号]** Q785; **[文献标识码]** A; **[文章编号]** 1001-4616(2001)04-0082-06

## 0 引言

重力既是人类在地球表面生活与劳动过程中无时不在、而又无法摆脱的力学环境, 也是迄今人类尚不够了解的一种环境因素. 长期在太空中飞行的人员, 其组织、器官、生理及功能在不同程度上均发生了一定的改变. 模拟失重实验显示, 心脏尺寸减小, 心肌有明显的萎缩性改变, 心率失常<sup>[1]</sup>, 血液流变性降低<sup>[2]</sup>. 重力环境的改变可使细胞基质之间及相邻细胞之间粘附的力量发生改变, 并导致细胞内骨架的改变和重塑, 从而使细胞形态、骨架和基质的机械性能发生相应的变化<sup>[3]</sup>.

Lewis 等<sup>[4]</sup>通过对在失重环境中培养的淋巴细胞进行观察, 发现在此环境中生长 4 h 后, 即有 DNA 聚集等细胞凋亡的表现, 且随着时间的延长, 与凋亡有关的 Fas/APO-1 蛋白表达增高, 推测淋巴细胞在失重环境下的增殖延缓与凋亡, 是由于细胞内微管结构异常与某些基因的异常表达所导致的. Han 等<sup>[5]</sup>通过 PCR 法检测微卫星 DNA 序列时发现, 当重力环境的改变超过 72 h, 就可检测出基因突变的发生, 而且在 +18G 环境下, 这种改变就变得非常明显. Boonstra<sup>[6]</sup>对内皮细胞 A431 进行观察, 发现在失重环境下, 表皮生长因子(EGF)诱导的 c-fos 和 c-jun 基因表达量明显降低; Esser 等<sup>[7]</sup>研究表明, 在异常重力环境条件下, 肌肉中某些基因在 mRNA 水平有变化. 在 0G 值暴露 9 d 之后, 在指长伸肌和比目鱼肌中检测到有 6 种基因, 其 mRNA 水平均发生了不同程度的变化, 其增长幅度从 23% ~ 1100% 不等. 这说明, 重力环境的改变对某些基因的表达有影响.

收稿日期 2001-04-20

作者简介 胡晓旻, 1974—, 女, 硕士, 南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所助教, 主要从事动物分子遗传的教学与研究.

# 1 材料与方法

## 1.1 实验材料

### 1.1.1 菌株

*E. Coli* JM109 空军总医院分子生物学研究中心自藏.

### 1.1.2 限制酶、工具酶、DNA 相对分子量标准及试剂盒

Taq DNA polymerase、 $\lambda$  DNA/*Hind* III Marker 等购自华美公司. PolyAtract System 1000 试剂盒购自 Promega 公司. 抑制性差减杂交试剂盒购自 Clontech 公司. DL2000、 $\phi$ X174/*Hae* III、pGEM-T 载体克隆试剂盒购自 TaKaRa 公司.

### 1.1.3 引物

实验中所用引物均为试剂盒所提供(引物序列略),包括 cDNA 合成引物、两个接头 Adaptor 1 和 Adaptor 2 两个接头外侧 22 个碱基序列一样,内侧序列不一样,两套巢式 PCR 引物(PCR 引物 1 与两个接头的外侧 22 个碱基序列一致,nested 引物 1、2 分别与两个接头的内侧序列一样)接头效率鉴定引物 G3PDH 5'引物、G3PDH 3'引物、PCR 引物 1(G3PDH 5'和 G3PDH 3'两条引物是根据管家基因 G3PDH 的序列设计的特异性引物,PCR 引物 1 为两个接头引物的外侧同源区域).

### 1.1.4 药品及主要试剂

淋巴细胞分离液购自经科公司,TRIZOL、DEPC 购自 Sigma 公司,IPTG、X-Gal 购自 GIBCO 公司,其它试剂均为进口或国产分析纯试剂.

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 样本的处理

将健康成年雄性的 SD 大鼠 20 只体质量为( $200 \pm 20$ )g,随机分为 2 组,一组为实验组,另一组为驱动组.将实验组大鼠在 +8G 的状态下(实验用航空离心机),每天曝露 30 min,期间每隔 10 min 休息 3 min.驱动组正常饲养.实验期间所有动物置同一室内饲养,每日进食量 20 g 左右,自由饮水,室温( $21 \pm 4$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,光照 12 h(7:00~19:00).实验共进行 10 d,挑选实验组中 4 个适应状态较好的个体,驱动组中随机挑选 4 个个体,活体静脉取血 5~10 mL.

### 1.2.2 淋巴细胞的分离

采用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞.

### 1.2.3 细胞总 RNA 的提取

采用 TRIZOL 试剂从淋巴细胞中提取 RNA.紫外分光光度计上测定核酸 260 nm 和 280 nm 处的吸收值, $OD_{260}/OD_{280} > 1.8$ ,可以认为样品较纯,没有蛋白质的污染.根据  $1 OD_{260} = 40 \mu\text{g}/\text{mL}$  计算核酸浓度.

### 1.2.4 mRNA 的分离

分别混合实验组和驱动组的 RNA,参照 Promega 公司 PolyAtract System 1000 试剂盒说明书进行.紫外分光光度计上测定核酸 260 nm 和 280 nm 处的吸收值, $OD_{260}/OD_{280} > 1.8$ ,可以认为样品较纯,没有蛋白质的污染.根据  $1 OD_{260} = 40 \mu\text{g}/\text{mL}$  计算核酸浓度.

### 1.2.5 抑制性差减杂交

按 Clontech 公司的抑制性差减杂交试剂盒说明书推荐的条件进行逆转录反应.

万方数据

### 1.2.5.1 双链 cDNA( dscDNA )合成

取将实验组和驱动组个体的 Poly( A )<sup>+</sup> RNA 4  $\mu$ L ( 2  $\mu$ g )和 cDNA 合成引物 1  $\mu$ L ,在 AMV 逆转录酶( 200U )及 dNTP 作用下 42℃ 延伸 90 min 后立即加入 DNA 聚合酶 I、RNase H、E. coli-DNA 连接酶、dNTP 组成总体积为 80  $\mu$ L 的反应体系 ,16℃ 孵育 2 h 后加入 6U T<sub>4</sub> DNA 聚合酶 ,16℃ 再反应 30 min 后合成 dscDNA.

### 1.2.5.2 接头的连接

将合成的 dscDNA 43.5  $\mu$ L 经 15U Rsa I 在 37℃ 酶切反应 5 h. 以实验组为试验方 ,驱动组为参照方 ,试验方 dscDNA 以 1:6 稀释后 ,分为 2 组 ,各 2  $\mu$ L ,分别与 adaptor 1、 $\alpha$  接头 1、2 连接 ,16℃ 反应 12 h 后进行连接效率检测.

### 1.2.5.3 两次消减杂交及两次抑制性 PCR

在鉴定连接效率满意( > 25% )后 ,将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的试验方 ds cDNA 1.5  $\mu$ L 分别与 1.5  $\mu$ L 参照方 ds cDNA 在 68℃ 下杂交 8 h 后 ,立即将经过第一次消减杂交的两组体系混合 ,另加新变性的参照方 cDNA ,68℃ 杂交 12 h 稀释. 取 1  $\mu$ L 稀释( 1:200 )后的第二次杂交后产物 ,在 50  $\times$  advantage klen Taq 聚合酶作用下 ,以 adaptor 1 及 adaptor 2 的外侧序列分别为 5' 及 3' 引物 ,进行第 1 次 PCR 扩增 ,取第一次 PCR 产物 1  $\mu$ L ,以 adaptor 1 及 adaptor 2 的内侧序列分别为 5' 及 3' 的巢式 PCR 引物 ,进行第二次 PCR 扩增 ,并进行 PCR 产物消减效率检测( 将未经抑制消减的实验组 cDNA 同时进行 PCR 对照 ).

### 1.2.5.4 消减产物克隆至 pGEM-T 载体

为了使 PCR 产物具有更多的 A 尾 ,提高效率 ,采用聚合反应. 首先 95℃ 加热上述 25  $\mu$ L 的二次 PCR 产物 20 min ,然后向其内加入 7.5  $\mu$ L 20  $\mu$ mol/L 的 dATP 贮存液和 5U 的 Taq 酶 ,于 70℃ 温育 15 min. 将添加 A 尾的 PCR 产物与 pGEM-T 载体 4℃ 过夜连接 ,连接产物转化入 E. Coli DH5 $\alpha$  ,37℃ 培养过夜.

### 1.2.5.5 $\alpha$ 互补现象鉴定重组子转化

将长有菌落的平板于 4℃ 放置 2 h ,利用  $\alpha$  互补现象挑选阳性克隆. 选取白色阳性重组子菌落 ,用无菌牙签分别挑取 ,画线接种于固体培养基上 ,37℃ 培养过夜 ,保存菌种.

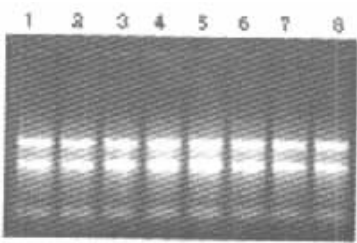
### 1.2.5.6 斑点杂交鉴定

扩增后 cDNA 消减文库包含约数千个白色克隆和蓝色克隆. 随机挑取 80 个白色克隆 ,用 pGEM - T 载体的通用引物 SP6 和 T7 为引物 ,进行阳性重组子菌落 PCR 扩增. 将 PCR 扩增片段经碱变性处理后 ,取 50 ~ 100 ng 点于尼龙膜上 ,将膜进行变性 & 复性后 ,室温晾干 ,80℃ 烘烤 2 h ,室温真空保存备用. 将 2 组 mRNA 经反转录 ,分别获得的 cDNA 作为探针 ,分别进行斑点杂交. 采用随机引物标记法对探针进行同位素  $\alpha$  - <sup>32</sup>P 进行标记. 滤膜按 0.2 mL/cm<sup>2</sup> 的量加入杂交液 ,置于 65℃ 水浴预杂交 30 min. 将 <sup>32</sup>P 标记的双链 cDNA 探针经变性后 ,加入到预杂交液中 ,置 65℃ 水浴轻摇杂交过夜( 16 ~ 24 个 h ). - 70℃ 显影 48 h.

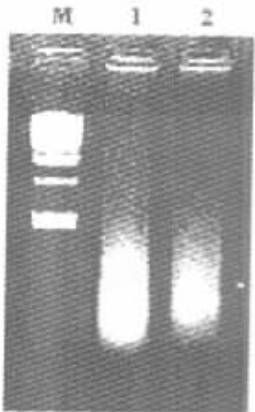
## 2 结果

### 2.1 总 RNA 与 mRNA 的定性定量分析

紫外分光检测显示提取 2 组总 RNA 和 poly( A )<sup>+</sup> RNA 吸光度 A<sub>260</sub>/吸光度 A<sub>280</sub> > 1.90 , 1.0% 琼脂糖凝胶电泳见 :总 RNA 可清晰见 28s、18s 和 5s 三条带 ,且中间可清晰见弥散的 mRNA ;mRNA 为 > 0.5kb 清晰慧尾片状条带. 结果见图 1、图 2. 证明总 RNA 和 mRNA 质优量足.



1—4 实验组； 5—8 驱动组  
图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图



M  $\lambda$  DNA / *Hind* III； 1 实验组； 2 驱动组  
图 2 mRNA 琼脂糖凝胶电泳图

2.2 ds cDNA 两端连接效率检测

将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的两组 ds cDNA 分别用 G3PDH3'、G3PDH 5' 引物及以 G3PDH3' 引物和接头部分序列为 5' 引物的 PCR 引物 1 进行 30 个循环的 PCR 扩增,产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定.结果见图 3.显示两组 ds cDNA 连接效率均 > 50%,即 50% 以上 ds cDNA 已与接头连接.

2.3 差异片段的克隆

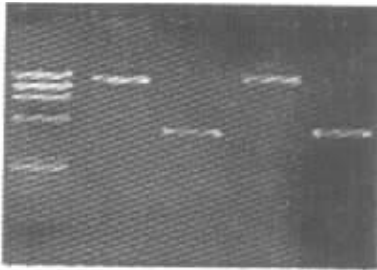
将 PCR 二次反应产物,经  $T_4$  连接酶的作用下,克隆至 pGEM-T 载体中.通过转化至 *E. Coli* DH5 $\alpha$ ,过夜培养后,可见培养基上,生长的菌落很多,可见转化效率很高,从而可以保证较多的 cDNA 差异库克隆至载体中了.通过  $\alpha$  互补现象,初步进行阳性克隆的鉴定,发现白色菌落斑较多,达到 60% 以上,说明连接效率较高.

2.4 差异片段阳性克隆的鉴定

随机挑取 80 个白色克隆,经 PCR 鉴定后,每个克隆均载有单一片段,平均 200 ~ 500 bp.进一步进行阳性克隆的鉴定.

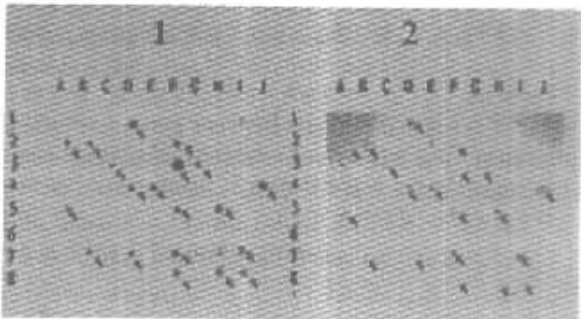
2.5 克隆的斑点杂交鉴定

在白色克隆中随机挑选 80 个克隆,以通用引物 SP6 和 T7 为引物,经过 PCR,将 PCR 产物与实验组和驱动组的 cDNA 分别进行杂交.找出 20 个阳性克隆,结果见图 4.



M  $\lambda$  X 174 *Hae* III； 1: 连有接头 1 的 cDNA (引物:G3PDH3'引物和 RCR 引物 1)；2: 连有接头 1 的 cDNA (引物:G3PDH3'引物和 G3PDH5'引物)；3: 连有接头 2 的 cDNA (引物:G3PDH3'引物和 RCR 引物 1)；4: 连有接头 2 的 cDNA (引物:G3PDH3'引物和 G3PDH5'引物)

图 3 接头连接效率分析



1: 以实验组 cDNA 为探针进行的斑点杂交；  
2: 以驱动组 cDNA 为探针进行的斑点杂交

图 4 斑点杂交结果

### 3 讨论

1996 年 6 月, Clontech 公司、加州大学旧金山分校和俄罗斯科学院合作研究提出了一种简便而高效的寻找差异基因的新方法, 即抑制性差减杂交法(Suppression subtractive hybridization, SSH)<sup>[8]</sup>, 它是继 DD 法和 RDA 法之后, 又一新的表型克隆方法. 该方法是以抑制 PCR 为基础的 cDNA 消减杂交方法. SSH 与以往寻找新基因的方法相比较具有很大的优势: ①因其两步杂交和两步 PCR, 最大的限度的降低了假阳性率; ②具有高度敏感性的特点, 它的均等化和目的片段的富集, 保证了低丰度的 mRNA 也有被检测到的可能; ③在一次 SSH 反应中, 就可以同时分离出成百个差异表达的基因, 远胜于 DD 法或 RDA 法. 因此, 尽管 SSH 法产生时间较晚, 但已获得了广泛的应用. Diatchenko 等<sup>[9]</sup>用此法建立了一个人的睾丸特异性 cDNA 文库, 并筛选了人类 Y 染色体的粘粒文库并寻找同源序列. Von 等<sup>[9]</sup>利用该法比较了两个高、低转移癌细胞系 Bsp73-ASML 和 Bsp73-1AS, 并分离出与转移表型相关的基因.

重力环境的改变对人体组织结构、细胞功能有着诸多影响, 而个体对重力环境改变的适应能力也各不相同. 一般人持续暴露在 +4~5Gz 环境达到 15~20s 时, 即可出现心率失常、黑视、晕厥等表现, 而经过适应性强化训练的飞行员, 最高可耐受高达 +9~10Gz 的过载. 这种个体间的差异可能与基因结构或基因选择性表达相关, 结果造成了个体对重力环境改变的适应能力及耐受限度的不同.

我们应用抑制性消减杂交方法, 经严格检验成功地用 SD 大鼠的淋巴细胞构建了高特异性的重力相关 cDNA 消减文库. 随机挑选 80 个克隆, 通过斑点杂交, 初步筛选出 20 个阳性克隆.

很多证据均表明, 重力环境的改变对基因的表达具有影响作用是显而易见的, 同时认为, 基因表达的改变可能是机体对重力环境改变的一种适应性反应. 因此, 寻找与此相关的基因, 探明其作用机理, 就可探究造成个体间表型差异的遗传原因, 从分子水平研究如何提高人体对非正常重力环境的适应能力, 将成为航空医学领域的新突破, 可为航空生物动力学及航空医学的研究及发展提供一种新的研究途径.

### [参考文献]

- [1] 陆霞, 初旭, 周杰, 等. 离心机高 G 训练中的心电图改变[J]. 航天医学与医学工程, 1997, 10(1): 62—64.
- [2] 沈美云, 陈建和. 模拟失重对兔血液系统影响的研究[J]. 航空医学与医学工程, 1996, 9(3): 198—203.
- [3] Ingber D. How cells( might ) sense microgravity[J]. FASEB J, 1999, Suppl S3—15.
- [4] Lewis ML, Reynolds JL, Cubano LA, et al. Space flight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes( Jurkat ) [J]. FASEB J, 1998, 12( 11 ): 1007—1018.
- [5] Carmeliet G, Nys G, Stockmans I, et al. Gene expression related to the differentiation of osteoblastic cells is altered by microgravity[J]. Bone, 1998, Suppl 22: 139S—143S.
- [6] Seitzer U, Bodo M, Muller PK, et al. Microgravity and hypergravity effects on collagen biosynthesis of human dermal fibroblast[J]. Cell Tissue Res, 1995, 282( 3 ): 513—517.
- [7] Esser K A, Hardeman E C. Changes in contractile protein mRNA accumulation in response to space-flight[J]. Am J Physiol, 1995, 268: C466—471.
- [8] Lisityn N. Representational difference analysis: finding the differences between genomes[J]. Trends Genet, 1995, 11



( 8 ) 303—308.

- [ 9 ] Diatchenko L. Suppression subtractive hybridization :A method for generating differ-entially regulating or tissue-specific cDNA probes and libraries[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA ,1996 ,93 :6025—6031.

## Cloning Genes Associated with Adaptability to Changing Gravity Environment Using Suppression Subtractive Hybridization

Hu Xiaomin<sup>2</sup> ,Sun Xiaowen<sup>2</sup> ,Li Xiwen<sup>4</sup> ,Liu Li<sup>4</sup>

( 1 . College of Life Science ,Nanjing Normal University ,Nanjing 210097 ,PRC )

( 2 . Department of Urology ,The second hospital of Shandong University ,Jinan 250033 ,PRC )

( 3 . Institute of Cell and Genetics ,Northeast Normal University ,Changchun ,130024 ,PRC )

( 4 . Institute of Medical Molecular Biology ,Airforce General Hospital ,Beijing ,100036 ,PRC )

**Abstract** Suppression subtractive hybridization ( SSH ) technique was applied to isolate gravity-sensitive genes. Firstly , lymphocytes were separated from blood of tester and driver ,and their mRNAs were extracted and reverse transcribed to cDNAs. After digestion with *Rsa* I and ligation with two different adaptors ,the tester cDNA was denatured and hybridized with driver cDNA. Unusual gravity endurance related cDNA library was cloned into pGEM-T vector. Using cDNA of the tester group and the driver group as probe ,80 clones picked out randomly were northern-blotted. The result shows that 20 clones are positive.

**Key words** suppression subtractive hybridization( SSH ) ;gravity environment ;gene cloning

[ 责任编辑 孙德泉 ]

---

( 上接 81 页 )

### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Pen-Shing Eugene Dai. Zeolite catalysis for a better enviornmen[ J ]. Catalysis Today ,1995 ,26 :3.
- [ 2 ] Kozhevnikov I V ,Sinnema A , Jansen B J J ,et al. New acid catalyst comprising heteropoly acid on a mesoporous molecular sieve MCM-41[ J ]. Catal Lett ,1995 ,30 :241.
- [ 3 ] Liu C B ,Ye X K ,Wu Y. Hydroxylation of phenol by iron( II )-phenanthroline ( Phen )/MCM-41 zeolite[ J ]. Catal Lett ,1996 ,36 :263.
- [ 4 ] Duncan J M. Direct preparation of organically modified MCM-type materials. Preparation and characterisation of aminopropyl-MCM and 2-cyanoethyl-MCM[ J ]. Chem Commun ,1996 ,1961.
- [ 5 ] Christabel E F , Sandra L B ,Stephen Mann. Synthesis and characterization of ordered organo-silica-surfactant mesophases with functionalized MCM-41-type architecture[ J ]. Chem Commun ,1997 ,1769.

[ 责任编辑 孙德泉 ]