

# 185-187 用定量 PCR 从杂交阳性融合噬菌斑中 分离候选插入片段 $\triangle$ $\text{Q78}$

范玉新 余龙<sup>✓</sup> 江莹 戴方彦 崔映宇 陈驰原 董长宇 赵寿元

**【摘要】** 目的 为了在 cDNA 文库杂交筛选目的基因过程中,当复筛的杂交信号对应于 1 个多克隆融合噬菌斑时,能够快速、准确地分离出特异克隆的插入片段。方法 依据定量 PCR 扩增的原理,利用初始模板量的不同,通过两次 PCR 反应,鉴定和分离出所需 cDNA 片段。结果 利用这一方法,在  $\beta$ -1,4-半乳糖苷转移酶 cDNA 的“步移”复筛中,从一个双克隆融合斑中,得到了特异性克隆的插入片段,经测序证实为  $\beta$ -1,4-半乳糖苷转移酶的 5'cDNA 序列,长 1.9kb,从而完成了全长 cDNA 的克隆,节省了进行再次复筛的时间和材料。结论 该方法简便、快捷,可以显著地节省时间和实验材料,在新基因克隆中有一定的实用价值。

**【关键词】** 定量聚合酶链反应 杂交筛选 融合噬菌斑 基因克隆 **定量 PCR**

**Isolating candidate inserted fragment from positive fused phage clones using quantitative PCR** FAN Yuzin, YU Long\*, JIANG Ying, DAI Fangyan, CUI Yingyu, CHEN Chiyuan, DONG Changyu, ZHAO Shouyuan. \* Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai, 200433 P. R. China. E-mail: Longyu@fudan.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To isolate quickly and exactly the specific inserted fragment from fused phage clones which were obtained from cDNA library by hybridization. **Methods** According to the amplification principle of quantitative polymerase chain reaction (PCR) and based on the difference of original template quantity, target cDNA fragment was isolated and identified by two PCRs. **Results** A positive clone with specific cDNA fragment of HumGT-H1 gene was obtained from a two-phage fused clone by using this method, and the inserted fragment was verified to be the 5'cDNA sequence of HumGT-H1. 1.9kb in length. So another hybridization screening is not necessary. **Conclusion** The method presented is effective and rapid in gene cloning and can greatly save time and materials.

**【Key words】** Quantitative polymerase chain reaction Hybridization screening Fused phage clones Gene cloning

在基因克隆的过程中,常需进行杂交筛选<sup>[1]</sup>。这一方法在从数十万个克隆中寻找所需的少数克隆是行之有效的。在进行了 2 轮或 3 轮杂交筛选后,一般可得到单个克隆。但在某些情况下,产生阳性杂交信号的噬菌斑与无关的噬菌斑发生融合而无法获得单克隆时,通常需再进行一次复筛。限于同位素定期供应等条件的限制,有时不得不多用 10~30 天的时间,才能获得目的克隆的插入片段。为此,我们设想此时如能用定量 PCR 鉴定和分离出目的克隆的插入片段<sup>[2]</sup>,则可以有效节省时间和材料。我们在分离和克隆新基因  $\beta$ -1,4-半乳糖苷转移酶(HumGT-H1)全长 cDNA 的过程中,运用了定量 PCR 扩增策略,从两个克隆的融合噬菌斑中得到了所需步移克隆的插入片段,从而证实这一设想是可行的。

## 1 材料和方法

**1.1 实验材料** 本实验室杂交筛选 HumGT-H1 全长 cDNA 过程中获得的有阳性杂交信号的融合噬菌斑,它由两个克隆的噬菌斑彼此融合形成。人睾丸 cDNA 分子库购自 Clontech 公司。Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司。

PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成,其中依据 HumGT-H1 的 EST 序列设计的特异引物两条:GTH1-A: 5'-ACTCTTGAATGTGGGCTATCT-AG-3' 和 GTH1-B: 5'-CAAACCAGAAATCCAC-TGTGATG-3'; $\lambda$ gt10 载体上克隆位点两侧各 1 个引物:EF: 5'-AGCAGCCAGTCAACACTTACG-3' 和 ER: 5'-GAGTTTGCATATCGCCTCCATC-3'。

**1.2 实验方法**<sup>[3]</sup> (1)分离噬菌体插入片段:融合噬菌斑稀释液为模板,以 EF、ER 为引物,4 种 dNTP 各 200 $\mu$ mol/L,引物各 0.5 $\mu$ mol/L, Tris. HCl 20mmol/L

本课题受国家 863 高技术项目资助

作者单位:200433 上海,复旦大学遗传学研究所,\* 通信联系人

L, KCl 50mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 3mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1.5U, PCR 反应体积为 50 $\mu$ l。反应条件为 93 $^{\circ}$ C 预变性 4 分钟, 93 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分 30 秒, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 分钟。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 以低熔点琼脂糖凝胶分离两条条带, EB 染色后在长波紫外灯下切割 DNA 条带, 65 $^{\circ}$ C 恒温槽上保温 10 分钟以融化胶块并灭活可能污染的 DNA 酶, 4 $^{\circ}$ C 冰箱存放备用。(2) 定量 PCR 鉴别候选插入片段: 以含回收 DNA 片段的低熔点琼脂糖凝胶液为模板, 用特异引物进行扩增鉴别候选插入片段, 退火温度改为 54 $^{\circ}$ C, 其它条件同前。在反应进行至 5、10、15、20、25 个循环时间点分别取出 10 $\mu$ l 进行电泳检测, 首先出现 512bp 特异片段的 DNA 模板样品即视为来自候选克隆的插入片段。(3) 测序: 用 PCR 循环测序法进行 DNA 手工测序, SequiTherm EXCEL<sup>TM</sup> DNA 测序试剂盒购自 Epicentre Techonologies 公司, 具体操作按试剂盒说明书进行。

## 2 结果

用 GTH1-A 和 GTH1-B 引物从人睾丸 cDNA 分子库中扩增的 PCR 产物为杂交探针杂交筛选人睾丸 cDNA 分子库。经两次杂交筛选, 得到若干阳性克隆, 其中一强阳性杂交信号来自一个融合噬菌斑, 仔细观察发现该斑由两个紧密相邻噬菌斑融合而成, 此时如对该噬菌斑再次进行复筛鉴定, 则还需 10 天以上才能作出鉴定, 因急于得到正确候选克隆的插入片段, 我们试用了 PCR 方法来分离正确候选克隆的插入片段。首先, 用  $\lambda$ gt10 载体两臂上的引物 (EF 和 ER) 扩增这个融合噬菌斑的稀释液, PCR 产物显示为两条电泳带, 长度分别约为 1.9kb (a) 和 0.6kb (b)。为确定哪一条电泳带是我们所需的插入片段, 我们用特异 PCR 引物 (GTH1-A 和 GTH1-B) 分别扩增这两个条带, 但两个条带都能扩增出我们所预期的 512bp 长度片段, 推测

这一现象可能与 DNA 分子在电场迁移中的相互携带有关, 即长片段电泳带中含有少量的短片段, 短片段电泳带中亦含有少量的长片段。为此, 我们继而采用了定量 PCR 的策略, 在 PCR 进行至第 5、10、15、20、25 个循环时, 分别取出 10 $\mu$ l 反应产物进行电泳鉴定。以 a 为模板的反应在 5 个循环后可见有 512bp 特异片段出现, 而以 b 为模板的反应则无可见条带。由此鉴别出 1.9kb 的 a 条带即是我们所需克隆的插入片段。后来对 1.9kb 片段的测序结果 (测序结果未示出) 证实, 这一基于定量 PCR 的推断是正确的, 该片段是我们所需的 HumGT-H1 5' cDNA 序列, 该基因已在 GenBank 登录, 注册号为 AF020920。然后在 10 个循环后, a 反应特异条带更加明显而 b 反应也可见特异条带出现; 至 20 个循环后, 两反应产物量的差别已无法区别 (图 1)。在第 5、10、15、20、25 个循环时 b 反应产物与 a 反应产物面积扫描 (分析软件: Smart View 3.0) 比值分别为 0、0.47、0.91、0.96、0.98。

## 3 讨论

本实验的依据是, 第 1 次 PCR 后, 产物虽经电泳分离, 但由于分子携带现象, 在同一电泳样品含有两个以上长度不同的 DNA 片段时, 从凝胶上回收某一长度 DNA 片段, 该回收 DNA 片段中都不可避免地含有另一长度片段的很少量分子, 其携带量的多少与总的 DNA 加样量成正比。就我们这个实验而言, 即 a 带中可能含有少量的 b 片段分子, b 带中可能含有少量的 a 片段分子。第 2 次 PCR 反应时, 由于引物是特异的, 因此对作为扩增模板的 a 片段或 b 片段而言, 它们中只有一种长度的 DNA 片段是对应于特异引物的特异 DNA 模板, 可以扩增出 PCR 产物。然而由于 a、b 两个电泳条带的彼此微量携带掺杂, 尽管特异模板量在两条电泳带中相差悬殊, 但在进行了常规的 PCR 循环扩增之后, 二者所有产生的特异扩增产物量仍难以区分。

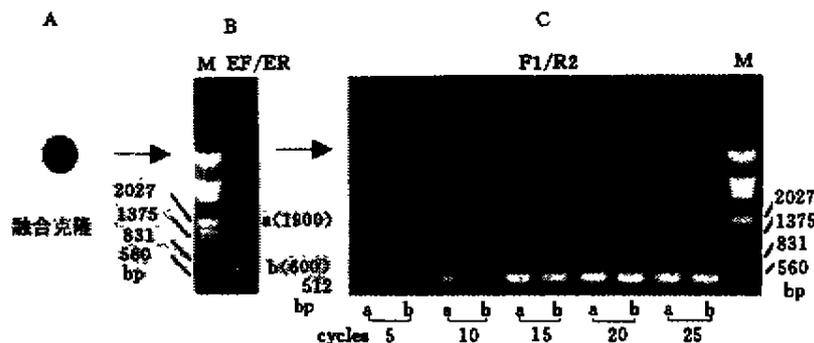


图 1 定量 PCR 产物电泳结果 A: 融合克隆示意图; B: 以  $\lambda$ gt10EF/ER 为引物扩增融合克隆, 产物电泳显示为 1.9kb (a) 和 0.6kb (b) 两条带; C: 以 HumGT-H1 特异引物 GTH1-A/GTH1-B 分别对 a、b 两带进行定量 PCR

Fig 1 Electrophoresis photograph of quantitative PCR A: Shown fused phage clone; B: Amplification of fused clone with primers  $\lambda$ gt10 EF/ER. C: Quantitative PCR of band a and b with HumGT-H1 specific primers GTH1-A/GTH1-B

以致不能判断哪一条电泳带是我们所需的特异目标片段。我们运用定量 PCR 的原理,采用不同时点采样的方式,发现在仅进行了 5 个循环的扩增后,含特异模板量多的样品就己能产生出较大量的特异扩增产物,而含特异模板量少的样品则不能产生足以显示的产物,由此而分辨出哪一条电泳带的回收片段是对应于特异引物的特异模板。而当进行至 15 个以上的循环时,即使特异模板量少的样品亦可产生足够多的特异扩增产物而使其与另一个反应无法区别。由本实验看出,定量 PCR 技术在基因克隆中也可发挥作用。当遇到杂交阳

性克隆为融合噬菌斑时,此法与再次杂交筛选鉴定方法相比,具有简便,快速等优点。图 2 比较了两种方法的操作时间,定量 PCR 方法只需几小时而杂交筛选需几天,可见定量 PCR 可大大缩短实验进程。如再考虑到我国同位素购买的时间限制因素,本方法的优势则更加明显。

本实验的鉴别对象是两个克隆的融合噬菌斑,当复筛后的杂交阳性信号对应于 3 个以上克隆的融合噬菌斑时,则更能体现此方法的优势。但是,当融合噬菌斑中的几个克隆中,正确克隆的插入片段和无关克隆的插入片段长度十分接近,用电泳难以分开时,则此方法难以奏效。尽管如此,我们认为定量 PCR 技术在基因克隆中仍不失为一种有用的辅助方法。

### 参 考 文 献

- 1 施少林,余龙,吴国俊,等.人类“锌指”蛋白基因 ZNF191 cDNA 的分离与克隆,自然科学进展,1997,7(4):499-502.
- 2 Horikoshi T, Danenberg K, Volkenandt M, et al. Quantitative measurement of relative gene expression in human tumors. In: White BA, ed. Method in Molecular Biology, Vol. 15. PCR Protocols: Current Method and Applications Human Press Inc, 1993. 177-181.
- 3 J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第 2 版,北京:科学出版社,1992,672-691.

(收稿:1998-06-22 修回:1999-02-12)

(本文编辑 张丽玲)

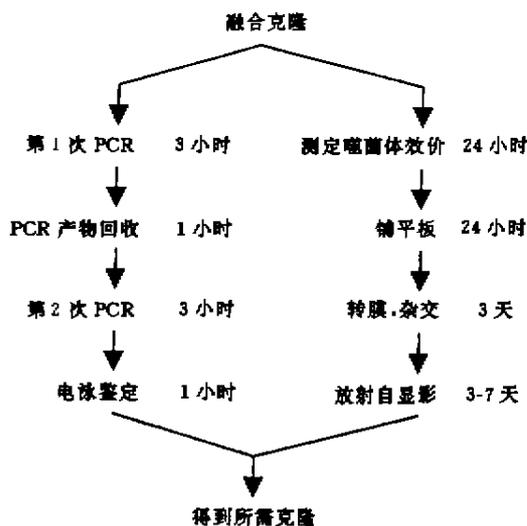


图 2 定量 PCR 法与杂交筛选鉴定操作时间的比较

Fig 2 Time comparison of two methods

## · 病例报告 ·

### Beckwith-Wiedemann 综合征一例

郭洪梁 李湘波

患儿女,7个月,第 I 胎孕 35 周,早产,父母非近亲婚配。出生时体重 2500g,腹膨大,脐膨出。生后 1 天出现呼吸困难,面色青紫;3 天出现低血糖、吸吮困难;5 天出现黄疸;1 个月起脐膨出逐渐增大,面部、舌一侧性增大,肋骨明显畸形。体检:表情淡漠,对外界环境反应较迟钝。小头,前卤未闭,枕部有骨性隆起、鼻扁平,左侧面部与舌较右侧明显增大。肋骨畸形,左侧肋间隙小,肋骨较右侧大。腹部膨隆,肝肋下 4cm,脾肋下 3cm,脐部膨出约 7cm×

2.5cm×2.5cm,可触及肠管等内容物。左侧肢体肥大,尤以下肢明显,双手指细长。实验室检查:血糖 2.11mmol/L(产后 4 天)、染色体检查为 46,XX。诊断为 Beckwith-Wiedemann 综合征。

讨论 Beckwith-Wiedemann 综合征又名脐疝-巨舌-巨体综合征(exomphalos-macroglossia-gigantism 综合征),或新生儿低血糖-巨舌-内脏肥大-脐膨出综合征,1963 年由 Beckwith 首先报道,是一种少见的遗传病,发病原因未明,其发病率在新生儿为 1/20 000。该病多呈散发性,也有家族性发病的报道,其遗传方式为常染色体隐性遗传,或常染色体显性遗传外显

不全。1983 年 Maziri 发现 11/62 例患者有染色体异常,其中 8 例涉及 11 号染色体。本病的临床特点是:巨躯畸形,巨舌,脐膨出或脐疝,新生儿低血糖,一侧性身体不对称性肥大、内脏肥大、并伴有心血管损伤,如心肌肥厚、先天性心血管畸形等。本病尚无特效疗法,对新生儿低血糖宜及时诊断、尽快治疗,除给予高渗葡萄糖外,还应同时给予胰岛素抑制剂二氮嗪、皮质激素和高糖治疗。伴脐膨出或脐疝、巨舌、心血管畸形者宜早期手术治疗。

(收稿:1998-06-28 修回:1998-12-10)

(本文编辑 张谦)

作者单位:414000 湖南省岳阳市第一人民医院中心实验室(郭洪梁),儿科(李湘波)