

引物退火控制技术在差异表达基因克隆中的应用

Application of annealing control primer system to cloning of differentially expressed genes

谢芳靖, 张子平, 林 鹏, 王艺磊

(1. 集美大学 水产学院 水产生物技术研究所, 福建 厦门 361021; 2. 美国密执根州立大学 水产与野生生物系, 美国密执根)

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2007) 05-0070-06

许多年以来,分离差异表达基因的方法仅限于差异筛选 cDNA 文库,直到 1992 年 Liang 等^[1]发明了一种检测基因转录模式的方法,即 mRNA 差异显示技术(mRNA Differential Display Reverse Transcription PCR, DDRT-PCR),第一次实现了同时快速灵敏地检测到真核细胞中大部分的差异表达转录体的目的。近些年来,在分离和克隆差异表达基因的功能基因组学研究中,国内外学者又发展了多种分析方法,如,代表性差异分析 (Representational Difference Analysis, RDA)、RNA 指纹技术 (RNA Arbitrarily Primed PCR, RAP-PCR)、RC4D(RFLP-coupled Differential Display)、SAGE(Serial Analysis of Gene Expression)、抑制消减杂交技术 (Suppression Subtractive Hybridization, SSH)^[2]、cDNA-AFLP、iAFLP (Introduced Amplified Fragment Length Polymorphism) 及基因芯片技术 (DNA Chip Technique)等方法克隆差异表达基因。这些方法的发明与应用,取得了许多成就,克隆了一系列的差异表达基因。这些方法各具独特优点,但同时也具有其自身不同的缺陷。这些技术的原理和优缺点比较已有许多综述总结^[3-8]。

引物退火时能否与其靶序列特异结合,是 PCR 能否成功扩增的关键因素之一,因此引物结构的优化非常重要。退火温度的高低决定引物是否能与其互补链完全结合,还是有一个或多个碱基的错配,因此通过调整退火温度就可以增加引物与模板结合的特异性。许多研究者提出了各种办法来提高引物退火的特异性,如在引物的 5'端增加一段通用引物序列,或加一段同聚物,或加上一段环状序列,以增加 PCR 扩增的特异性和退火的稳定性^[9-11],但这些方法并不能

消除初始反应的非特异性退火。作者将介绍一种在 DDRT-PCR 基础上发展起来的对差异表达基因克隆的新方法,即引物退火控制技术(Annealing Control Primer, ACP)^[12]。该方法则可较好地消除初始反应的非特异性。在此基础上,我们对此方法做了进一步的改进,并成功地克隆到了多个差异表达基因。

1 ACP 技术的基本原理

退火控制引物由独特的三部分组成(图 1),3'端和 5'端部分由中间的调节部分连接。3'端部分是核心部分,能与模板完全互补;5'端部分是通用引物序列;中间调节的部分为多聚脱氧次黄苷 [poly(dI)],一般由 5 个脱氧次黄苷(dI)组成,在控制引物的退火温度时起着关键的作用^[13-14]。ACP 技术主要由以下三个部分组成:逆转录合成第一条链和两个不同阶段的 PCR 反应(图 2)。

1.1 逆转录合成第一条链

以总 RNA 或 mRNA 为模板, dT-ACP1 为引物,在逆转录酶的作用下合成第一条 cDNA 链。引物

收稿日期: 2006-11-13; 修回日期: 2007-03-03

基金项目: 国家自然科学基金 (30571430); 福建省科技厅重点项目 (2005N041); 国家教育部项目 (205079); 福建省教育厅重点项目 (JA004229)

作者简介: 谢芳靖 (1976-), 男, 福建浦城人, 工程师, 在职硕士研究生, 主要从事水产生物技术研究, E-mail: fxiexie520@163.com; 王艺磊, 通讯作者, 电话: 0592-6182723, E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

dT-ACP1 的核心部分是和 mRNA 的 3' 端 Poly(A) 互补的 Oligo (dT), 合成的第一条 cDNA 链含引物 dT-ACP1 的 5' 端通用序列。

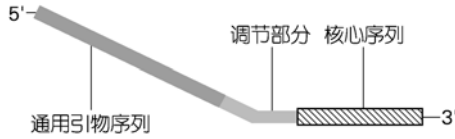
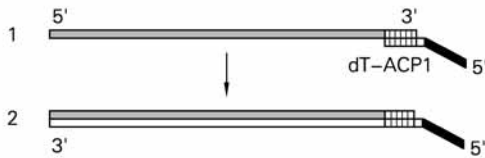
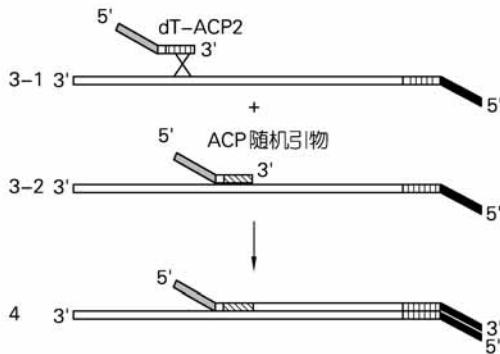


图 1 ACP 结构图

1. 逆转录合成第一条链



2. 第一阶段 PCR 反应合成 cDNA 第二条链



3. 第二阶段 PCR 反应扩增 cDNA 第二条链

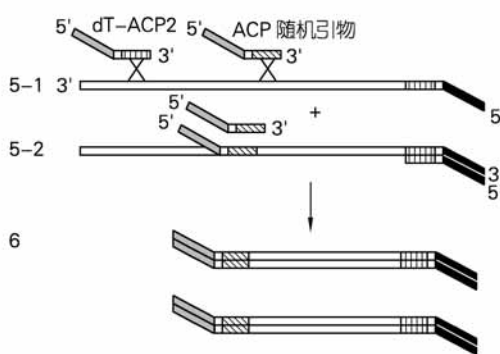


图 2 ACP 技术路线图

1.2 第一阶段 PCR 反应合成 cDNA 第二条链
反应合成的第一条 cDNA 链经稀释后, 与 dT-ACP2 引物和 ACP 随机引物混合于 PCR 管中进行

反应。ACP 随机引物的 3' 端的核心部分一般由 10 个碱基组成, 在 50 °C 退火温度时, 引物中间的 poly(dI) 部分形成泡状结构, 阻止了 5' 端的通用引物序列与模板的非特异性结合, 并且 poly(dI) 可以提高 3' 端随机引物的退火温度, 从而保证了引物的核心部分能与第一条 cDNA 链特异结合, 同时这个阶段只进行一个 PCR 循环反应。通过第一阶段的 PCR 反应使得合成的第二条 cDNA 链的 3' 端含有 dT-ACP1 通用序列的互补序列, 以及 ACP 随机引物 5' 端序列。

1.3 第二阶段 PCR 反应扩增 cDNA 第二条链

PCR 反应体系中的退火温度提高至 65 °C, 使 dT-ACP2 引物与 cDNA 第二条链特异结合, 经 35 ~ 40 个 PCR 循环, 扩增出特异的 cDNA 片段。

2 ACP 技术的优点

2.1 假阳性低

假阳性高是目前克隆差异表达基因的瓶颈问题之一, 如 DDPCR 技术由于随机引物较短 (10 ~ 13 bp) 在 PCR 循环时通常需要在 40 ~ 45 °C 退火, 这种低的退火温度导致引物与模板的非特异性结合, 使得该技术具有较高的假阳性, 并且结果重复性差。而增加 5' 端通用引物 (18 ~ 20 bp) 长度, 经过在 40 ~ 45 °C 的 1 ~ 4 个循环后, 引物的退火温度可以提高至 60 °C, 但是增加 5' 端通用序列的引物在低的退火温度与模板结合时也是非特异的。ACP 技术则可使引物在初始反应就与模板链特异结合, 扩增出真实可靠的产物, 从而降低了 PCR 结果的假阳性。

2.2 不需要聚丙烯酰胺凝胶电泳, 只需通过琼脂糖凝胶电泳就足以进行分析

ACP 技术显著提高了 PCR 扩增的特异性和敏感性, 使得 PCR 产物的特异性大为增强。无须再用繁琐且有剧毒的聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测的步骤。通过普通琼脂糖凝胶电泳就可以检测 PCR 产物, 且琼脂糖凝胶电泳显示的条带可以直接用于 Northern 杂交分析。

2.3 不需要特别的技术

ACP 是基于 PCR 和普通琼脂糖电泳的一种技术, 简单容易操作。

2.4 重复性高

由于 ACP 采用简单容易的操作就可得到结果, 避免了繁复步骤引入误差的机会, 使得试验结果的重复性大大提高。

2.5 速度快、经济实惠

ACP 技术在较短时间内就可克隆到可信的差异表达基因,且不需要花大量的时间来排除假阳性。相反,目前其它的一些克隆差异表达基因的技术要大量的精力来鉴定候选基因的可信度。

2.6 PCR 产物分布范围广

产物条带分布可为 150 bp ~ 2 kb, 这样不仅增加了鉴定差异表达基因的机会,也为预测基因的功能提供了更多重要的序列信息。而其它技术,如 SSH 技术扩增产物的大小平均为 256 bp, DDPCR 技术分离的 cDNA 片段长度也小于 500 bp, 这些短的片段所提供的序列信息对于人、果蝇、酵母等模式生物,由于 GenBank 等数据库有大量的数据可供参考,或许足够

用以分析,但对于非模式生物而言,256 bp 的序列太短,不足以满足分析所需。

3 ACP 技术在差异表达基因克隆中的应用

为检测 ACP 引物的 3' 端在第一次退火时是否与模板完全杂交上, Hwang 等^[12] 以小鼠 RIKEN 基因的 cDNA 为模板, ACP 引物和通用引物来进行 PCR 扩增; 引物 3' 端均为相同的 10 个碱基序列, 5' 端均为通用引物序列。实验结果表明: 以 ACP 引物扩增产物只有一条 635 bp 特异条带, 10 个碱基的引物无扩增条带, 其余引物扩增产物均有多条非特异性条带产生 (表 1)。

表 1 小鼠 RIKEN 基因 cDNA 扩增使用的引物组合及扩增结果^[12]

引物组合	引物序列	扩增结果
1	正向引物: 5' -AGGAGATGCG-3' 反向引物: 5' -GGTCACGGAG-3'	无条带
2	正向引物: 5' -GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATAGGAGATGCG-3' 反向引物: 5' -TATGATGCTGTGACGCCGAGGTCACGGAG-3'	多条带
3	正向引物: 5' -TATGATGCTGTGACGCCGAAGGAGATGCG-3' 反向引物: 5' -GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATGGTCACGGAG-3'	多条带
4	正向引物: 5' -GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATAAAAAGGAGATGCG-3' 反向引物: 5' -GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATAAAAAGGTCACGGAG-3'	多条带
5	正向引物: 5' -GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIAGGAGATGCG-3' 反向引物: 5' -GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGGTCACGGAG-3'	单条带
6	正向引物: 5' -GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATAGGAGATGCG-3' 反向引物: 5' -CTGTGAATGCTGCGACTACGATGGTCACGGAG-3'	多条带
7	正向引物: 5' -CTGTGAATGCTGCGACTACGATAGGAGATGCG-3' 反向引物: 5' -GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATGGTCACGGAG-3'	多条带
8	正向引物: 5' -GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATAAAAAGGAGATGCG-3' 反向引物: 5' -CTGTGAATGCTGCGACTACGATAAAAAAGGTCACGGAG-3'	多条带
9	正向引物: 5' -CTGTGAATGCTGCGACTACGATAAAAAAGGAGATGCG-3' 反向引物: 5' -GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATAAAAAGGTCACGGAG-3'	多条带
10	正向引物: 5' -GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIAGGAGATGCG-3' 反向引物: 5' -GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGGTCACGGAG-3'	单条带
11	正向引物: 5' -CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIAGGAGATGCG-3' 反向引物: 5' -GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGGTCACGGAG-3'	单条带

ACP 技术在差异表达基因克隆中的应用，目前报道的主要集中于哺乳动物（小鼠、牛和猪等）生殖发育相关的基因的研究（表 2），通过该技术克隆了许多差异表达基因，为深入了解哺乳动物早期生殖发

育相关的分子调控机制提供了有利证据。

本实验室也利用 ACP 技术对大黄鱼（*Pseudosciaena crocea*）杂色鲍（*Haliotis diversicolor*）抗病相关功能基因的差异表达，虾蟹雌雄性腺差异表达基

表 2 ACP 技术在差异表达基因克隆中的应用

研究内容	使用引物数	获得的差异表达基因	文献
研究小鼠妊娠 4.5、11.5 和 18.5 d 的孕体组织中基因的差异表达	3 对	6 个已知基因，2 个 EST， 2 个未知基因	[15]
研究体外培养的牛早期胚胎和孵化胚胎中基因的差异表达	8 对	4 个已知基因，5 个 EST	[16]
研究体外培养的牛生发泡期的卵母细胞、8 细胞期和胚泡期胚胎中基因的差异表达	4 对	2 个已知基因，2 个 EST	[17]
研究小鼠 4 细胞期和胚泡期胚胎中基因的差异表达	120 对	62 个已知基因，12 个未知基因	[18]
研究小鼠生发泡期和第二次减数分裂中期卵母细胞基因的差异表达	20 对	26 个已知基因，6 个未知基因	[19]
研究猪生发泡期和第二次减数分裂中期卵母细胞基因的差异表达	60 对	13 个基因，已知基因或 EST	[20]
研究猪单性生殖 2 细胞期和胚泡期胚胎中基因的差异表达	60 对 120 对	9 个基因，已知基因或 EST 46 个基因，已知基因或 EST	[21] [22]

因的克隆等进行了初步研究，并对引物做了适当的改进。以 dT-RSL 引物取代了 dT-ACP1 和 dT-ACP2，并使原 dT-ACP 和 ACP 随机引物的 5' 端均具有相同的通用引物序列，从而使得到的短的基因片段两端反向-重复序列在退火时产生类似于“锅柄”的结构，降低了其与引物配对的几率，选择性地抑制了短片段的扩增。例如，我们分别从对照组和副溶血弧菌诱导 4 h，1 d 和 2 d 的大黄鱼肝脏中提取总 RNA，等量混合后分为对照组和实验组总 RNA，以 dT-RSL 为引物，在逆转录酶的作用下合成第一条 cDNA 链，再通过 dT-RSL 与 20 条 RSL 随机引物（表 3）组成 20 对引物，共扩增出多个差别表达基因，图 3 所示为 5 对引物扩增出的 3 个差异表达基因。对其中的 4 个基因进行测序分析，获得 1 个 1360 bp 纤维蛋白原 β 链基因长片段（GenBank accession：EF014896）的抗病候选基因，已有研究表明该基因的表达水平可受病原体感染诱导而提高，可能是参与机体免疫功能的重要基因^[23]。其余序列为 EST。

综上所述，ACP 技术操作简单，无需昂贵仪器设

备，是一种高效便捷克隆差异表达基因的新方法。目前虽然在世界范围内仅有几个研究小组对为数不多的材料进行了研究，但可肯定该方法的出现和应用将在基因克隆中发挥更多的积极作用。

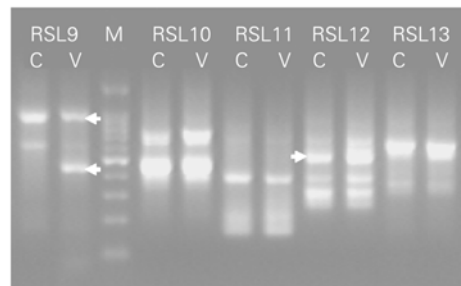


图 3 5 对 RSL 引物扩增出的大黄鱼肝脏差异表达基因 2% 琼脂糖凝胶电泳结果图

C 表示对照组；V 表示副溶血弧菌诱导组；M 代表 100 bp marker；箭头所示为差异表达基因

表 3 大黄鱼抗病相关功能基因 cDNA 扩增使用的引物

引物	序列
dT-RSL	5' -AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTT TTT TTT TTT TTT TTT T-3'
RSL1	5' '-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III IGC CAT CGA CC -3'
RSL 2	5' '-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III IAG GCG ATG CC -3'
RSL 3	5' '-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III ICC GGA GGA TG -3'
RSL 4	5' '-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III IGC TGC TCG CG -3'
RSL 5	5' '-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III IAG TGC GCT CG -3'
RSL 6	5' '-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III IGG CCA CAT CG -3'
RSL 7	5' -AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III ICT GCG GAT CG -3'
RSL 8	5' -AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III IGG TCA CGG AG -3'
RSL 9	5' -AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III IGA TGC CGC TG -3'
RSL 10	5' -AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III ITG GTC GTG CC -3'
RSL 11	5' -AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III ICT GCA GGA CC -3'
RSL 12	5' -AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III IAC CGT GGA CG -3'
RSL 13	5' -AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III IGC TTC ACC GC -3'
RSL 14	5' -AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III IGC AAG TCG GC -3'
RSL 15	5' -AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III ICC ACC GTG TG -3'
RSL 16	5' -AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III IGT CGA CGG TG -3'
RSL 17	5' -AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III ICA AGC CCA CG -3'
RSL 18	5' -AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III ICG GAG CAT CC -3'
RSL 19	5' -AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III ICT CTG CGA GC -3'
RSL 20	5' -AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTI III IGA CGT TGG CG -3'

参考文献：

- [1] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. *Science*, 1992, 257:967-971.
- [2] Diatchenko L, Lau Y FC, Campbell A P, *et al.* Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6 025 – 6 030.
- [3] 李斐雪,王雁玲. 差异表达基因的高通量筛选方法[J]. *细胞生物学杂志*, 2004, 26:339-343.
- [4] 周延凯,周建林,聂东宋. 筛选差异表达基因方法的新进展 [J]. *生物技术通报*, 2004, 15(6):620-622.
- [5] 李文雍,陈清轩. 筛选差异表达基因的方法进展[J]. *阜阳师范学院学报*, 2004, 21(1):1-6.
- [6] 徐德全,熊远著. 差异表达基因克隆技术的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2004, 31(3):31-34.
- [7] 谢伟伟,王凭青,杨青川,等. 植物差异表达基因克隆技术及研究进展[J]. *重庆大学学报*, 2005, 28(12):96-100.
- [8] 肖朝庭, 储明星, 傅衍. 几种基因差异表达筛选技术在动物发育与繁殖中的最新进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2006, 33(4):34-38.
- [9] Brownie J, Shawcross S, Theaker J, *et al.* The elimination of primer-dimer accumulation in PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25:3 235-3 241.
- [10] Saiki R K , Walsh P S, Levenson C H, *et al.* Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86:6 230-6 234.
- [11] Ailenberg M, Silverman M. Controlled hot start and improved specificity in carrying out PCR utilizing touch-up and loop incorporated primers (TULIPS) [J]. *BioTechniques*, 2000, 29:1 018-1 024.

- [12] Hwang I T, Kim Y J, Kim S H, *et al.* Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification[J]. **BioTechniques**, 2003, 35:1 180-1 184.
- [13] Martin F H, Castro M M, Aboulela F, *et al.* Base pairing involving deoxyinosine: implication for probe design[J]. **Nucleic Acids Res**, 1985, 13:8 927-8 938.
- [14] Ohtsuka E, Matsuka S, Ikehara M, *et al.* An alternative approach to deoxyoligonucleotides as hybridization probes by insertion of deoxyinosine at ambiguous codon positions[J]. **J Biol Chem**, 1985, 260: 2 605-2 608.
- [15] Kim Y J, Kwak C I, Gu Y Y, *et al.* Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels[J]. **BioTechniques**, 2004, 36:424-428.
- [16] Hwang K C, Cui X S, Park S P, *et al.* Identification of differentially regulated genes in bovine blastocysts using an annealing control primer system[J]. **Mol Reprod Dev**, 2004, 69:43-51.
- [17] Hwang K C, Park S Y, Park S P, *et al.* Specific maternal transcripts in bovine oocytes and cleaved embryos: identification with novel DDRT-PCR methods[J]. **Mol Reprod Dev**, 2005, 71:275-283.
- [18] Cui X S, Shin M R, Lee K A, *et al.* Identification of differentially expressed genes in murine embryos at the blastocyst stage using annealing control primer system[J]. **Mol Reprod Dev**, 2005, 70:278-287.
- [19] Yoon S J, Chung H M, Cha K Y, *et al.* Identification of differential gene expression in germinal vesicle vs. metaphase II mouse oocytes by using annealing control primers[J]. **Fertil Steril**, 2005, 83 (Suppl 1):1 293-1 296.
- [20] Cui X S, Song H, Kim N H. Identification of metaphase II-specific gene transcripts in porcine oocytes and their expression in early stage embryos[J]. **Reprod Fertil Dev**, 2005, 17:625-631.
- [21] Hwang K C, Lee H Y, Cui X S, *et al.* Identification of maternal mRNAs in porcine parthenotes at the 2-cell stage: a comparison with the blastocyst stage[J]. **Mol Reprod Dev**, 2005, 70:314-323.
- [22] Lee H Y, Cui X S, Lee K A, *et al.* Annealing control primer system identifies differentially expressed genes in blastocyst stage porcine parthenotes[J]. **Zygote**, 2006, 14(1):71-80.
- [23] Zhang S M, Loker E S. Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*[J]. **Gene**, 2004, 341: 255-266.

(本文编辑 : 刘珊珊)