

人类风湿性关节炎滑膜组织 cDNA 文库的构建

闫永毅 任 蕾 高 飞 卢秀敏 刘彦虹[△]

(哈尔滨医科大学第二附属医院 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的 构建人类风湿关节炎(RA)滑膜组织 cDNA 文库。筛查与 RA 相关的特异基因,为探讨 RA 的发病机制及基因治疗奠定基础。方法 提取人类风湿关节炎滑膜组织 RNA 并使用 Trizol 法纯化 mRNA;运用 mRNA 5' 末端的模板转换方法以 powerscriptTM 逆转录酶进行转录,使用 COS III / 3' PCR 引物合成第 1 链 cDNAs,长距离聚合酶链反应(LD-PCR)合成双链 cDNA;PCR 产物经蛋白酶 K 水解并纯化后,经 Sfi I 酶切、柱层析洗脱,重组于 TripIEx2 载体并包装后,测定滴度、重组率、扩增文库,随机挑取 40 个噬菌斑,用载体克隆位点两端的通用引物进行 PCR 扩增,以检测所构建 cDNA 文库的质量。结果 未扩增文库的滴度为 6.89×10^6 pfu/mL,扩增后文库滴度为 2.63×10^9 pfu/mL,重组效率为 93%,插入片段主要集中在 300~1800bp。结论 成功构建了一个人类风湿关节炎(RA)滑膜组织 cDNA 文库,可以用探针抗体等做免疫学筛选,为进一步探寻与 RA 疾病相关的基因奠定坚实基础。

关键词 类风湿性关节炎;基因文库;cDNA

中图分类号 R593.22 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)16-3045-04

Construction and Identification of a cDNA Library of Human Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue

YAN Yong-yi, REN Lei, GAO Fei, LU Xiu-min, LIU Yan-hong[△]

(Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China)

ABSTRACT Objective: To construct a cDNA library of human synovial tissue of RA and identify the quality of the library. **Methods:** Total RNA was extracted and mRNA was purified. mRNA was reversed to first-strand cDNA which was amplified to double-strand cDNA by long distance PCR. PCR products were digested by proteinase K and Sfi I and were fractionated by CHROMA SPIN-400 column. The cDNA of length longer than 0.4kb were collected and ligated to λ TripIEx2 vector. The λ phage packaging reaction for the ligated DNA was performed to produce an unamplified library. Thereafter, the unamplified library was titered and the percentage of recombinant clones were detected. In the end, forty plaques were randomly selected and amplified by PCR using universal primers from vector in order to test the quality of the obtained library. **Results:** The titers of unamplified and amplified libraries were 6.89×10^6 pfu/mL and 2.63×10^9 pfu/mL respectively. The rate of recombinant was 93%. The insert size range from 300 to 1800 bp. **Conclusions:** A high quality cDNA library from human synovial tissue of RA was constructed successfully, and it lays solid foundation not only for screening and cloning new special genes associated with the occurrence of RA, but also for gene therapy of it.

Key words: Rheumatoid arthritis; Gene library; cDNA

Chinese Library Classification(CLC): R593.22 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)16-3045-04

前言

类风湿关节炎(RA)是最常见的慢性炎症性关节炎,影响了世界范围内 0.5-1.0% 的成年人,它可能最终导致关节破坏、功能下降、丧失工作能力,并增强死亡率^[1]。其复杂的发病机制尚未完全阐明,临床诊断主要是在结合临床症状的基础上,依赖于实验室检测出相关的自身抗体,然而现今公认的 RA 的标志性抗体发病早期阳性率低,而且特异性不高^[2,3],因此限制了它们在诊断中的应用^[4]。噬菌体抗体库技术是一项利用基因工程方法制备单克隆抗体的新技术,近年来兴起并迅速发展的^[5]。为此,我们构建了人类风湿性关节炎(RA)滑膜组织 cDNA 文库,并进一步筛选阳性克隆,筛查与 RA 的发生特异相关的基

因,这一研究将有助于了解 RA 的基因表达谱,从而为探讨 RA 的发病机制和基因治疗奠定坚实基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 类风湿性关节炎滑膜组织标本 类风湿性关节炎滑膜组织由哈尔滨医科大学附属第二医院提供(经患者同意),患者为住院治疗的 RA 确诊病人,均符合 1987 年美国风湿病学会(ACR)修订的类风湿关节炎诊断标准。关节镜滑膜切除术后取新鲜的滑膜组织,切割后立即放于液氮保存。

1.1.2 主要的试剂和工具酶

作者简介 闫永毅(1982-),女,硕士研究生。主要研究方向 免疫学方向。电话:15204607523, E-mail: xiaoyiyan529@163.com

[△]通讯作者 刘彦虹 liuusa@yahoo.com

(收稿日期 2012-02-20 接受日期 2012-03-17)

Trizol 试剂	购自 Gibco 公司
Oligotex -dT30 mRNA purification kit	购自 TAKARA 株式会社
SMART™ cDNA library constructin kit	购自 Clontech 公司;
Packagene Lambda DNA Packaging System	购自 promega 公司
PCR 纯化试剂盒	购自 Qiagen 公司
RNA 标记	购自 Fermentas
DNA 标记	新英格兰 Biolabsq

其他常规试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.1.3 引物设计与合成 根据 λTriplEx2 噬菌体载体两端 Sfi A、B 酶切位点附近的序列设计引物,由北京奥科公司合成。正向引物 5'-CTCCGAGATCTGGACGAGC-3' 及反向引物: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 mRNA 纯化

(1)总 RNA 提取 :在液氮中将冻存的新鲜 RA 滑膜组织研磨至粉末状,按照 Trizol™ 试剂盒操作说明提取总 RNA ,使用 Dnase-I 消化总 RNA 中的痕量 DNA ,取 2 μL 通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 的完整性,并测定 A 260 /A280 及浓度。

(2)mRNA 纯化: 以 Oligotex™-dT30 mRNA purification kit 进行 mRNA 分离纯化,实验步骤按试剂盒说明书进行 ,最后加入 7 μl 洗脱液溶解沉淀,取 2 μL 经 1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计分别检测其纯度和浓度。

1.2.2 cDNA 合成 取 3 μl mRNA 样本作为模板 ,加入 SMART 寡核苷酸和 COS III / 3' PCR 引物 ,PowerScript 逆转录酶逆转录成 cDNA 第一链 ,LD-PCR(Long-distance PCR)扩增双链 cDNA(PCR 扩增条件为 :95℃ 20S ,95℃ 5S ,68℃ 6 min), 22 个循环),取 5μl PCR 产物通过电泳鉴定双链 cDNA 的分布范围,并测定双链 cDNA 的浓度 ;用蛋白酶 K 灭活 DNA 聚合酶 ,然后按照 Qiaquick PCR 纯化试剂盒说明书纯化 PCR 产物 ;用 Sfi 酶酶切纯化产物然后经 CHROMA SPIN-400 Column 进行 cDNA 分级分离,收集符合大小 (>0.4kb)要求的 cDNA 片段。

1.2.3 cDNA 文库构建 将酶切后的双链 cDNA 按一定比例与 λTriplEx2(经 Sfi A 和 B 酶切)载体在 T 4 DNA 连接酶作用下连接。按照 Packagene Lambda DNA Packaging System 包装提取液说明书进行体外包装 ,以产生未扩增文库。

1.2.4 文库滴度、重组率测定 构建的 cDNA 文库滴度测定按照吴晓林等^[4]方法操作 (文库滴定公式 pfu·mL⁻¹= 噬菌斑数 × 稀

释倍数 × 10³ μL·mL⁻¹/ 稀释的噬菌体铺板 μL 数), 重组率测定采用蓝白斑筛选方法 ,即向含有噬菌体和 XL1 -Blue 混合液的上层琼脂中分别加入 50 μL 100 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 和 X-Gal ,于 90 mm 平板上铺板 ,置 37℃ 孵育过夜 ,分别计算蓝色噬菌斑和白色噬菌斑数,并计算其百分比。

1.2.5 文库的扩增和鉴定 按照原始文库的滴度,继续感染宿主菌以扩增文库 ;同时 ,铺平板检测扩增文库滴度及重组克隆的百分比,并从中随机挑取 40 个噬菌斑,进行 PCR 以扩增插入片段。PCR 反应程序为 :95℃ 5min,95℃ 15s,65℃ 5min,35 个循环 ,68℃ 保温 8min。反应产物以 1%琼脂糖凝胶电泳分析扩增片段的大小。

2 结果

2.1 总 RNA 提取及 mRNA 纯化

高质量总 RNA 的提取及 mRNA 的分离是构建 cDNA 文库的关键。所提取样本的 RNA28S 和 18S 条带清晰 ;测定总 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.85 ,浓度为 2388 ng/μL。说明提取的总 RNA 无明显降解 ,并且纯度较高。mRNA 片段长度分布广 ,说明纯化的 mRNA 比较完整(图 1)。

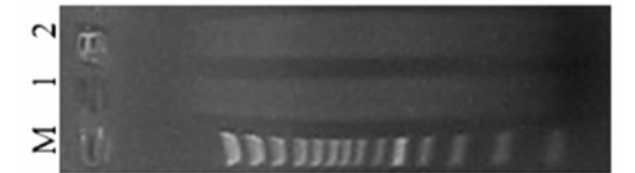


图 1 mRNA 纯化琼脂凝胶电泳图 M:DNA ladder Marker;1 和 2 均为滑膜组织的 mRNA

Fig.1 Gel electrophoresis figure of mRNA

2.2 cDNA 的合成

测定双链 cDNA 的浓度为 1063 ng/μL(表 1) ,大小约 0.4 ~ 5 kb cDNA 过柱(分级分离)后集中在 0.4kb 以上(图 2)。

表 1 滑膜组织一链及二链 cDNA 浓度和质量检测
Table 1 Synovial organization cDNA concentration and quality detection

样品 Sample	OD _{260/280}	浓度(ng/μl) Concentration
一链 cDNA	1.63	1105
一链 cDNA	1.70	1063

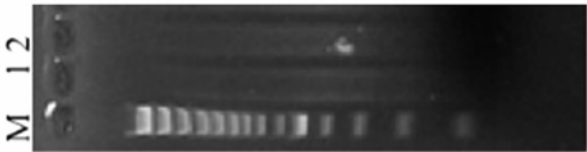


图2 滑膜组织一链及二链 cDNA 的合成。M:DNA ladder Marker;1:一链 cDNA 2 二链 cDNA

Fig.2 cDNA synthesis of Synovial organization

2.3 cDNA 文库的构建及鉴定

2.3.1 cDNA 文库的构建 LD-PCR 法合成双链，限制性内切酶酶切后纯化后进行连接、包装 将包装产物加入噬菌体稀释和

氯仿 混匀 离心分层 获得原始文库 用稀释缓冲液以 10 倍、100 倍和 1000 倍稀释文库 涂平板培养 计算文库的滴度及重组率($\text{cfu} / \text{mL} = (\text{噬菌斑数} \times \text{稀释倍数} \times 10) / \text{铺板稀释噬菌体体积}$ 重组率的计算是将滴度测定中的噬菌斑数换成白斑数) 将菌液稀释后进行 cDNA 文库滴度的检测 cDNA 原始文库滴度约为 $6.89 \times 10^6 \text{ pfu/mL}$ ，扩增后文库滴度为 $2.63 \times 10^9 \text{ pfu/mL}$ 重组率为 93%。

2.3.2 cDNA 文库的质量鉴定 从文库中随机挑取 40 个克隆进行菌落 PCR 鉴定 检测插入片段大小。结果显示文库重组率很高，所做的 40 个克隆中均有条带出现 PCR 产物主要集中于 300~1800 bp(图 3)。

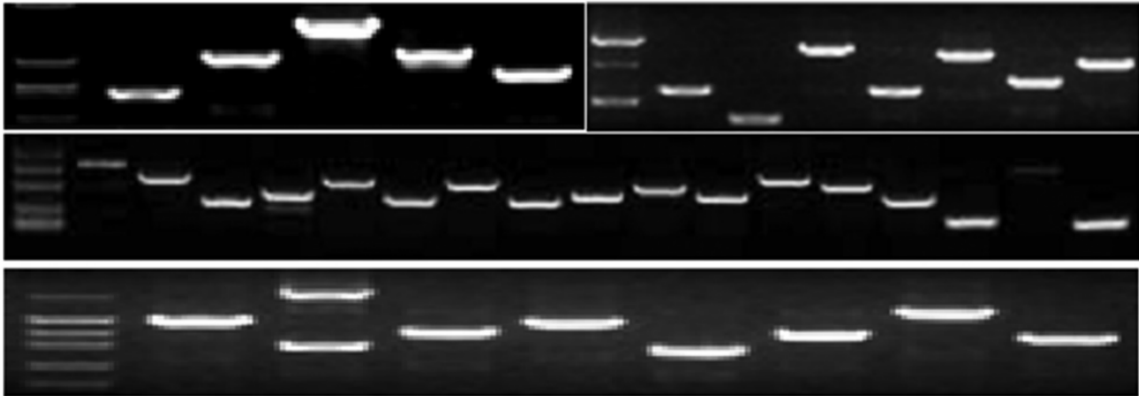


图3 克隆子的 PCR 鉴定电泳图

Fig.3 PCR figure of clones

表 2 插入片段长度数据

Table 2 Length data of insert fragments

片段名称 Fragment	长度(bp) Length	片段名称 Fragment	长度(bp) Length	片段名称 Fragment	长度(bp) Length	片段名称 Fragment	长度(bp) Length
1	500	11	500	21	800	31	930
2	520	12	480	22	940	32	720
3	600	13	500	23	1160	33	800
4	580	14	1300	24	750	34	790
5	700	15	820	25	1500	35	1250
6	850	16	840	26	900	36	700
7	460	17	790	27	430	37	810
8	500	18	640	28	870	38	800
9	750	19	730	29	1700	39	900
10	730	20	1600	30	800	40	1800

3 讨论

cDNA 文库的构建与分析是分子生物学的基本方法之一^[6]。cDNA 分子不含内含子序列和调控序列并且与蛋白质的氨基酸序列具有对应性,便于克隆和大量表达,可以从 cDNA 文库中筛选到所需的基因,并直接用于该目的基因的表达^[7]。是分离已知基因、筛选新基因、揭示基因表达某些影响因素的基础^[8]。成功地构建一个全长 cDNA 文库 主要反映在文库的代表性和重组 cDNA 片段的序列完整性两个方面。文库的代表性可用库容量来衡量,由于典型哺乳动物细胞一般含有 10 000~

30 000 种不同的 mRNA 序列,因此所要求的文库克隆数要大于 $1.7 \times 10^{5[9]}$ 本研究构建的人类风湿关节炎滑膜组织 cDNA 文库,原始文库滴度约为 $6.89 \times 10^6 \text{ pfu/mL}$ ，扩增后文库滴度为 $2.63 \times 10^9 \text{ pfu/mL}$ 重组率为 93% 完全满足了对 cDNA 文库库容的基本要求 适用于筛选目的基因克隆,可以用来大批量筛选 cDNA 克隆的 RA 特异或相关基因。重组 cDNA 片段的完整性是反映 cDNA 文库质量的另一重要因素 Gubler 和 Hoffman^[10] 传统方法构建的 cDNA 文库在分离 " 全长 " cDNA 克隆上有 2 大缺陷 :1. 首先在 mRNA 逆转录(RT)为 cDNA 的过程中,常常没有完全转录完就终止^[11] 导致具有完整 5' 端的 cDNA 克隆含

量较少。2.由于5'端的帽子结构不能作为mRNA的起始标记位点^[7],导致在识别哪些cDNA克隆具有完整5'端上有困难^[12]。

本研究采用SMART (Switching Mechanism at 5' end of RNA Transcript)技术是一个新的里程碑,其优点在于所构建的文库是含有完整的5'端非翻译区的全长型双链cDNA。首先,采用长距离PCR (LD-PCR)方法合成全长型cDNA,SMART IV寡核苷酸在mRNA的5'端充当短的延伸模板,当RT延伸到5'端时自动转换模板,继续复制至寡核苷酸的末端,因此生成的全长ss cDNA含有mRNA完整的5'末端,后者在LD-PCR扩增中充当通用的起始位点(SMART锚),只有那些在5'末端含有锚定序列的ss cDNA才可以充当扩增模板,不完整的cDNA和从poly A- RNA转录过来的cDNA由于缺少SMART锚而不能被扩增;

此外,Barnes^[13]应用2种不同的热稳定DNA聚合酶一起催化PCR扩增反应,解决了生长链3'末端掺入不匹配碱基的难题,使LD-PCR获得重大改进,可以较好地扩增长距离模板DNA^[14],并且允许用微量的总RNA或mRNA构建高比例全长cDNA文库,这对于取材困难的类风湿滑膜组织意义重大^[15];其次,由于cDNA的5'端和3'端Sfi I限制性酶切位点的不对称性,合成的双链cDNA经Sfi I (A和B)酶切后直接连接到λTriplex2载体的左右臂,消除了接头的自连接,实现cDNA的简便、快速的定向克隆^[16],提高了文库的重组效率。

在cDNA文库构建完成之后,一般需对载体中插入片段的大小进行检测。传统的检测方法是先用煮沸法^[17]或碱裂解法^[18]提取质粒DNA,然后用限制性内切酶进行酶切分析。Zon等于1989年提出了一种基于PCR技术的直接用于克隆检测的方法^[19]。此种方法简单、快速,但仍需提取质粒DNA,且实验成本较高。Tarig等对Zon的方法进行了改进,直接用菌液作为模板而不需要提取质粒DNA进行PCR检测^[20]。我们在实验中采用了此方法,成功地进行了cDNA文库的鉴定,得到了插入子片段,插入片段长度在300~1800 bp之间,且长度不一,表明我们所构建的文库具有一定复杂性。

我们运用SMART技术,构建了高效的人类风湿关节炎滑膜组织cDNA文库,经滴度测定、重组率、PCR鉴定均符合cDNA文库的质量要求。它为筛查与RA的发生特异相关的基因,进而为研究RA的发病机制、诊断及基因治疗奠定了坚实的基础。我们将进一步通过免疫学筛选和一些研究差异表达基因的方法,来探索RA发生发展过程中基因表达的差异和规律。

参考文献(References)

- [1] Rohan Deva Situnayake, Brian McConkey. Clinical and laboratory effects of prolonged therapy with sulfasalazine, gold or penicillamine: the effects of disease duration on treatment response[J]. The Journal of Rheumatology, 1990, 17(10): 1268
- [2] Watanabe R, Takiguchi Y, Kuriyama T. Serum tumor markers for primary lung carcinoma[J]. Nippon Rinsho, 2000, 58(5): 1070-1073
- [3] 黄芳, 杨莲. 胸水和血清中CEA、CYFRA21、TPS联合检测对良恶性胸水及肺癌的诊断价值[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(4): 370-372
- Huang Fang, Yang Lian. The chest water and serum CEA, CYFRA21, TPS united detection for benign and malignant pleural effusion and lung cancer diagnostic value [J]. Cell and molecular immunology

- magazine, 2008, 24(4): 370-372
- [4] Peter Callegari, William Williams. Laboratory tests for rheumatic disease[J]. Postgraduate Medicine, 1995, 97(4): 65
- [5] Buccheri G, Torchio P, Ferrigno D. Clinical equivalence of two cytokertin markers in non small cell lung cancer: a study of tissue poly peptide antigen and cytokeratin 19 fragments [J]. Chest, 2003, 124 (2): 622-626
- [6] Bonaldo, M.F., G. Lennon, and M.B. Soares, Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene Discovery[J]. Genome Res, 1996, 6(9): 791-806
- [7] Parmentier, M., F. Libert, C. Maenhaut, A. Lefort, C. Gerard, J. Perret, J. Van Sande, J.E. Dumont, and G. Vassart, Molecular cloning of the thyrotropin receptor[J]. Science, 1989, 246(4937): 1620-1622
- [8] Barnes WM. PCR amplification of up to 35 -kb DNA with high fidelity and high yield from bacteriophage templates[J]. Proc Natl Acad Sci, 1994, 91: 2216-2220
- [9] 吴晓林, 琦祖和, 卢圣栋. cDNA文库 [A]. 现代分子生物学实验技术[M]. 第二版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 319-328
- Wu Xiao-lin, Qi Zu-he, Lu Sheng-dong. CDNA library [A]. Modern molecular biology experiment technology [M]. Second edition. Beijing: China xie-he medical university press, 1999: 319-328
- [10] Gubler U, Hoffman BJ. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries[J]. Gene, 1983, 25(2-3): 263-269
- [11] D Alessio JM, Gerard GF. Second -strand cDNA synthesis with E. coli DNA polymerase I and RNase H: the fate of information at the mRNA 5 terminus and the effect of E. coli DNA ligase [J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16: 1999-2014
- [12] Suzuki Y, Yoshitomo-Nakagawa K, Maruyama K, et al. Construction and characterization of a full length -enriched and a 5'-end-enriched cDNA library[J]. Gene, 1997, 200: 149-156
- [13] Barnes WM. PCR amplification of up to 35 -kb DNA with high fidelity and high yield from bacteriophage templates [J]. Proc Natl Acad Sci, 1994, 91: 2216-2220
- [14] 萨姆布鲁克 D.w. 拉塞尔 著. 黄培堂等, 译. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 667-668, 863
- Sambrook J., Russell D. W. Huang Pei-tang, translation. Molecular Cloning[M]. Beijing: Science Press, 2002: 667-668, 863
- [15] Zhumabayeva, B., L. Diatchenko, A. Chenchik, and P.D. Siebert, Use of SMART-generated cDNA for gene expression studies in multiple human tumors. Biotechniques, 2001, 30(1): 158-163
- [16] 毛新国, 景蕊莲, 孔秀英, 等. 几种全长cDNA文库构建方法比较[J]. 遗传, 2006, 28(7): 9
- Mao Xin-guo, Jing Rui-lian, Kong Xiu-ying, et al. several cDNA library establishment, the method is genetic[J]. Hereditas, 2006, 28 (7): 9
- [17] Holmes DS, Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids[J]. Anal Biochem, 1981, 114: 193-197
- [18] Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA [J]. Nucleic Acids Res, 1979, 7: 1513-1523
- [19] Zon LI, Dorman DM, Orkin SH. The polymerase chain reaction clone miniprep[J]. Biotechniques, 1989, 7: 696-698
- [20] Tarig H, Gerd H, Horst Z. Direct clone identification by PCR miniprep[J]. Mol Biol Today, 2001, (3): 65-66