

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00550

• 研究快报 •

猫视神经慢性损伤相关差异表达基因消减 cDNA 文库的构建

吕立权,楼美清,董艳,蔡如珏,胡国汉,骆纯,侯立军,卢亦成*

第二军医大学长征医院神经外科,上海市神经外科研究所,上海 200003

[摘要] **目的:**构建猫视神经慢性损伤相关差异表达基因消减 cDNA 文库。**方法:**15 只成年家猫随机分为正常对照组、视神经压迫 4 周组和视神经压迫 8 周组 ($n=5$),压迫 4 周组和压迫 8 周组猫利用球囊植入法建立慢性视神经损伤模型。取各组动物视神经,TRIzol 法提取总 RNA,SMART 技术合成 cDNA,随后利用抑制消减杂交方法分离受压 4 周和 8 周视神经中差异表达基因的 cDNA 片段,将其与 T 载体进行 T/A 连接构建文库,将连接产物用氯化钙转化法转化大肠杆菌进行文库扩增和蓝白斑筛选,随机挑取 300 个白色克隆进行菌落 PCR 鉴定。**结果:**菌落 PCR 扩增显示每个文库 80% 的克隆中均有 200~800 bp 的插入片段。**结论:**成功构建猫视神经慢性损伤相关差异表达基因消减 cDNA 文库,为进一步筛选、克隆慢性视神经损伤相关差异表达基因奠定了基础。

[关键词] 慢性视神经损伤;抑制消减杂交;基因文库

[中图分类号] R 774.6

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2008)05-0550-05

Construction of subtracted cDNA library for differentially expressed genes associated with chronic optic nerve injury

LÜ Li-quan, LOU Mei-qing, DONG Yan, CAI Ru-jue, HU Guo-han, LUO Chun, HOU Li-jun, LU Yi-cheng*

Department of Neurosurgery, Shanghai Institute of Neurosurgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[ABSTRACT] **Objective:** To construct subtractive cDNA libraries of differentially expressed genes associated with chronic optic nerve injury in cats. **Methods:** Fifteen adult cats were randomly divided into 3 groups ($n=5$): control group, 4-w compression group and 8-w compression group. The chronic optic nerve injury was produced by an inflatable balloon implanted under the optic chiasm. The total RNA was prepared from optic nerves of each group by TRIzol method. Double-stranded cDNA was produced by SMART PCR cDNA synthesis protocol. Suppression subtractive hybridization (SSH) was used to isolate the cDNA fragments of differentially expressed genes in the optic nerves after 4-w and 8-w compression. The cDNA fragments were directly inserted into T/A cloning vector to establish the subtractive library, followed by amplification of the libraries through *E. coli* transformation with calcium chloride and screening of blue and white clones. Three hundred positive bacterial clones were randomly picked in each library and identified by colony PCR. **Results:** Analysis of the white clones by PCR showed that 80% clones contained 200-800 bp inserts in each library. **Conclusion:** Four subtractive cDNA libraries of differentially expressed genes associated with chronic optic nerve injury have been successfully constructed by SSH and T/A cloning techniques, which lays a solid foundation for screening and cloning specific differentially expressed genes associated with chronic optic nerve injury.

[KEY WORDS] chronic optic nerve injury; suppression subtractive hybridization; gene library

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(5): 550-554]

临床上慢性视神经损伤多由鞍区及眼眶肿瘤慢性压迫所致,病变晚期患者常出现视力严重下降甚至失明,但损伤的具体分子机制仍不明确。我们的前期研究^[1]应用球囊植入法建立了猫慢性视神经损伤模型,并对其病理生理变化进行了初步观察,发现视神经慢性受压后不仅在损伤局部发生了显著的病

理改变,而且受压周围视神经、视网膜和外侧膝状体也发生了明显的病理变化,且这种病理变化与视觉功能的损伤相一致。由此表明,视神经慢性受压后视觉功能的改变不能仅归因于直接的机械性损伤,还可能与受压视神经内发生的基因表达变化密切相关。因此,本研究在前期研究的基础上利用抑制消

[收稿日期] 2007-09-30

[接受日期] 2008-02-13

[基金项目] 国家自然科学基金(30271333). Supported by National Natural Science Foundation of China(30271333).

[作者简介] 吕立权,博士,讲师、主治医师. E-mail: lvliquan@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-63610109-73361, E-mail: lycheng@sh163.com

减杂交(SSH)技术构建猫视神经慢性损伤相关差异表达基因消减 cDNA 文库,为进一步筛选、克隆慢性视神经损伤相关差异表达基因奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司, cDNA 合成试剂盒和抑制消减杂交试剂盒购自 Clontech 公司。

1.2 实验动物及分组 成年健康家猫 15 只,雌雄不限,体质量 2.5~3.5 kg。检查双眼屈光间质清,瞳孔等大等圆,对光反应好,眼底无异常。随机分为 3 组:正常对照组、视神经压迫 4 周组和视神经压迫 8 周组。后 2 组参考文献^[1]制备慢性视神经损伤模型:质量分数为 3%戊巴比妥钠,30 mg/kg 腹腔注射麻醉动物后,开颅暴露颅内段视神经和视交叉,植入球囊并用造影剂充盈。术后注意观察动物生命体征和神经系统功能缺损情况。每组动物在预定时间追加造影剂,术后行头颅 CT 扫描以确定球囊无异位和泄漏。

1.3 标本取材和 RNA 提取 动物深度麻醉后,在显微镜下开颅取出双侧视神经,立即放入液氮内保存备用。采用 TRIzol 法提取总 RNA,用 1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析其纯度,使用紫外分光光度计测定其浓度和 D_{260}/D_{280} 值。

1.4 SMART 技术合成 cDNA 参照 SMART PCR cDNA 合成试剂盒说明书进行。

1.4.1 第一链 cDNA 的合成 取各组视神经总 RNA 各 100 ng 分别与 1 μ l 3' SMART CDS 引物 II A(12 μ mol/L)和 SMART 引物 II A(12 μ mol/L)混合,72 $^{\circ}$ C 孵育 2 min。再加入 2 μ l 5 \times 第一链缓冲液,1 μ l DTT(20 mmol/L),1 μ l dNTP(10 mmol/L)混合物和 1 μ l 逆转录酶。42 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。用 40 μ l 的 TE 缓冲液稀释后 72 $^{\circ}$ C 加热 7 min 终止反应。

1.4.2 应用 LD-PCR 合成第二链 取上述第一链 cDNA 产物分别至 3 个 0.5 ml 的 PCR 管,每管 1 μ l,每一个反应管中加入 99 μ l 配置好的 PCR 反应液。从各自的 3 个管中取出 1 管进行 PCR 条件优化。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 1 min 后,95 $^{\circ}$ C 15 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,68 $^{\circ}$ C 6 min,24 个循环。分别在 15、18、21 和 24 个循环各取 15 μ l 产物进行琼脂糖凝胶电泳,根据结果来决定最佳循环数。然后用最佳循环数对各自剩余 2 管进行 PCR,其产物就是第二链 cDNA。用层析柱对第二链 cDNA 纯化后溶解于 75 μ l 1 \times TNE 缓冲液中。

1.5 抑制消减杂交 参考文献^[2-3]及 SSH 试剂盒说明书进行。用正常组视神经作为驱动器(Driver)分别与视神经压迫 4 周组及 8 周组视神经(Tester)杂交得到正向文库,然后再用 4 周组和 8 周组 Driver 与正常组 Tester 杂交得到反向文库。

1.5.1 *Rsa* I 酶消化 取 Tester 及 Driver 的双链 cDNA 各 43.5 μ l,分别用限制性内切酶 *Rsa* I(10 u/ μ l)1.5 μ l 于 37 $^{\circ}$ C 酶切 1.5 h。将未经酶切的双链 cDNA 10 μ l 与经酶切的双链 cDNA 10 μ l 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行酶切效率分析。酶切完全后将酶切产物进行纯化处理。

1.5.2 接头连接及连接效率检测 将酶切后的 Tester 双链 cDNA 1:6 稀释,分为 2 组,各加入 Tester 双链 cDNA 2 μ l 及 T4 DNA 连接酶 1 μ l,分别与接头 1 和接头 2R 各 2 μ l 于 16 $^{\circ}$ C 反应过夜。取 1 μ l 上述反应液进行连接效率分析。

1.5.3 两轮消减杂交 确定接头连接效率大于 25%后,将连有不同接头的 Tester 双链 cDNA 各 1.5 μ l 分别与 1.5 μ l Driver 双链 cDNA 和 1 μ l 4 \times 杂交缓冲液混合,98 $^{\circ}$ C 加热 1.5 min,然后于 68 $^{\circ}$ C 杂交 8 h。混合 2 份杂交样本,加入过量新鲜变性的 Driver 双链 cDNA,68 $^{\circ}$ C 杂交过夜,加入 200 μ l 稀释缓冲液。

1.5.4 两轮 PCR 扩增 取 1 μ l 消减杂交产物用接头 1 和接头 2R 的外侧序列引物进行第一次 PCR 扩增,27 个循环。将 PCR 产物按 1:10 稀释,取 1 μ l 用两个接头的巢式 PCR 引物进行第 2 次 PCR 扩增,12 个循环。分别取第 1、2 次 PCR 产物 10 μ l 用 2% 琼脂糖/EB 凝胶进行电泳分析。

1.6 消减 cDNA 文库的构建 将第 2 次 PCR 产物纯化,取 2 μ l 纯化后的 PCR 产物和 1 μ l pMD18-T 载体混合,在 1 μ l T4 DNA 连接酶作用下,16 $^{\circ}$ C 反应 30 min。

1.7 消减 cDNA 文库的扩增及鉴定 取连接质粒 10 μ l 与 DH5 α 感受态细菌混匀,用氯化钙法将质粒导入大肠杆菌。取 150 μ l 细菌培养液均匀涂布于含 X-gal/IPTG 的氨苄青霉素琼脂培养板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。待菌落显色完全,随机挑取 50 个白色菌落接种到 LB/Amp 液体培养基中,250 次/min 摇菌 8 h;重复上述操作,再次转化感受态细胞,随机挑取 50 个白色菌落,直至每个库得到 300 个菌落为止。各取 1 μ l 菌液用巢式引物进行 PCR 扩增,反应参数与

第2轮 PCR 扩增相同,产物用 2%琼脂糖/EB 凝胶电泳进行鉴定。

2 结果

2.1 总 RNA 提取结果的分析 总 RNA 电泳结果显示提取的总 RNA 在 28S、18S 有明显的亮带,且 28S 条带的亮度几乎是 18S 的 2 倍,说明总 RNA 没有降解,提取完整(图 1)。紫外分光光度计测定结果显示总 RNA 的 $D_{260}/D_{280} > 1.90$,纯度符合实验要求(表 1)。

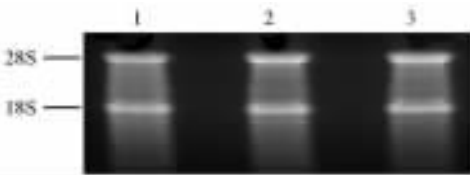


图 1 总 RNA 电泳图

Fig 1 Electrophoresis of total RNA

1: Total RNA of the control group; 2: Total RNA of the 4-w compression group; 3: Total RNA of the 8-w compression group

表 1 总 RNA 浓度及 D_{260}/D_{280} 测定结果

Tab 1 Concentration and D_{260}/D_{280} value of the total RNA

Group	D_{260}	D_{280}	D_{260}/D_{280}	Concentration $\rho_B/\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$
Control	0.312	0.162	1.92	0.624
4-w compression	0.285	0.145	1.96	0.570
8-w compression	0.312	0.157	1.98	0.624

2.2 双链 cDNA 的合成及 *Rsa* I 酶切结果 *Rsa* I 是一种四碱基内切酶,其识别序列 GCAT 在核酸序列中普遍存在,经过酶切后的 cDNA 片段长度将变短,分布范围缩小。本实验酶切鉴定结果(图 2)显示:与酶切前比较,酶切后的 cDNA 片段明显变短,聚集于 100~2 000 bp。结果提示酶切完全。

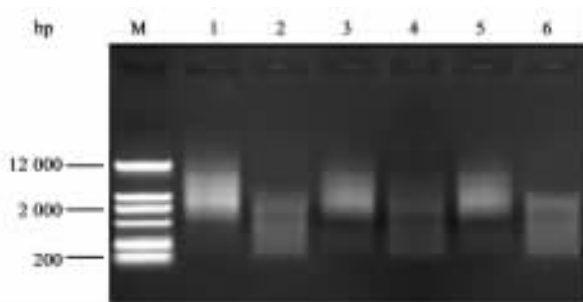


图 2 双链 cDNA 的 *Rsa* I 酶切鉴定图

Fig 2 Electrophoresis of the cDNA before and after *Rsa* I endonuclease digestion

M: Marker; 1, 3, 5: Before *Rsa* I endonuclease digestion; 2, 4, 6: After *Rsa* I endonuclease digestion

2.3 接头连接效率分析 *Rsa* I 接头连接效率检测是根据看家基因 G_3PDH 大量存在的事实,分别使用 G_3PDH 自身和对应于接头的 3'和 5'引物扩增 G_3PDH 基因片段,对比这两种不同引物在相同的循环参数下扩增效率的差别。由于接头的连接效率直接影响以此为模板的 3'和 5'引物扩增效率,因此 3'和 5'引物扩增效率可以间接反应接头连接效率。PCR 结果用琼脂糖凝胶电泳分析,如果两种引物的 PCR 产物亮度接近,表明接头连接效率较高。研究表明:采用接头 3'和 5'引物的 PCR 产物超过采用 G_3PDH 自身引物的产物的 25%,表明接头连接成功(图 3)。

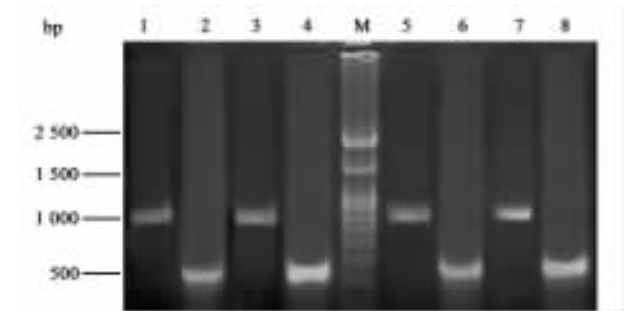


图 3 接头连接效率鉴定图

Fig 3 Results of ligation efficiency analysis

1,5: PCR products using Tester (Adaptor 1-ligated) as the template and the G_3PDH 3' Primer and PCR Primer 1; 2,6: PCR products using Tester (Adaptor 1-ligated) as the template, and the G_3PDH 3' and 5' Primers; 3,7: PCR products using Tester (Adaptor 2R-ligated) as the template, and the G_3PDH 3' Primer and PCR Primer 1; 4,8: PCR products using Tester (Adaptor 2R-ligated) as the template, and the G_3PDH 3' and 5' Primers; M: Marker

2.4 第二次 PCR 产物分析 第二次 PCR 产物表现为一片亮度呈正态分布的图片,500~2 000 bp 范围,看家基因得到有效消减(图 4)。

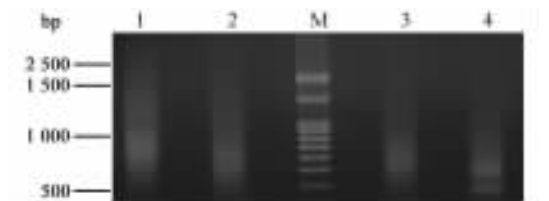


图 4 第二次 PCR 产物电泳图

Fig 4 Electrophoresis of the second PCR production

1: PCR production of 4-w forward subtractive hybridization; 2: PCR production of 8-w forward subtractive hybridization; 3: PCR production of 4-w reverse subtractive hybridization; 4: PCR production of 8-w reverse subtractive hybridization; M: Marker

2.5 消减效率分析 消减杂交效率检测是根据同

时存在于 Tester 和 Driver 中的看家基因 G_3 PDH 在杂交过程中理论上被消减, 在随后的 PCR 过程中被抑制, 得不到扩增的事实。使用 G_3 PDH 自身引物, 分别以消减前后的产物为模板, 扩增 G_3 PDH 基

因片段。通过对比在相同循环参数下扩增效率的差异, 判断类似 G_3 PDH 的共同序列是否被有效消减和抑制。结果表明消减后产物看家基因得到有效抑制(图 5)。

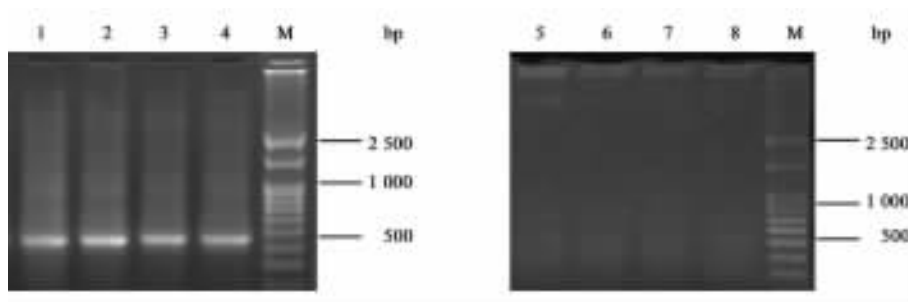


图 5 消减效率分析结果

Fig 5 Analysis of hybridization efficiency

1-4: PCR results before hybridization; 5-8: PCR results after hybridization; M: Marker

2.6 消减 cDNA 文库的扩增及鉴定结果 电泳结果显示约 80% 的白斑细菌均成功扩增出目的片段,

说明转化效率较高, 经 PCR 扩增得到的目的片段分布于 200~800 bp(图 6)。

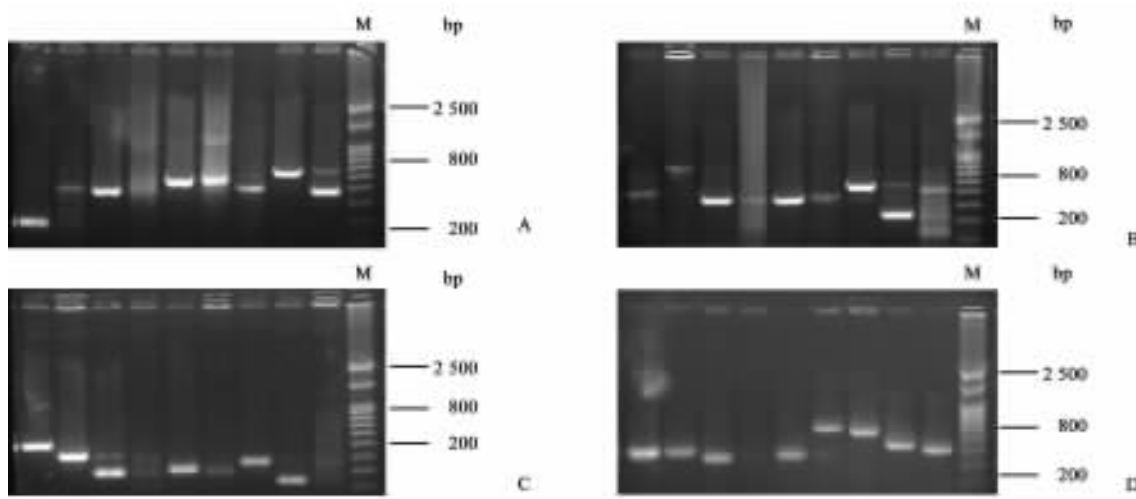


图 6 消减文库 PCR 扩增结果

Fig 6 PCR results of subtractive libraries

A: PCR results of 4-w forward subtractive libraries; B: PCR results of 4-w reverse subtractive libraries; C: PCR results of 8-w forward subtractive libraries; D: PCR results of 8-w reverse subtractive libraries

3 讨论

慢性视神经损伤是神经外科和眼科的常见疾病, 主要见于垂体腺瘤、颅咽管瘤、鞍结节脑膜瘤、蝶骨嵴内侧脑膜瘤和眶内肿瘤等。虽然早期切除占位病变, 患者的视力视野可有不同程度的恢复, 但是仍有不少患者的视觉功能得不到良好恢复, 严重影响了患者的生活质量。到目前为止, 国内外对慢性视神经损伤病理机制的认识明显不足, 相关研究报道还很缺乏, 揭示慢性视神经损伤发生的分子机制, 将

有助于找到治疗该疾病的有效方法。本研究利用抑制杂交消减技术成功构建了视神经慢性受压后差异表达基因文库, 为进一步阐明慢性视神经损伤的分子机制奠定基础。

随着分子生物学相关技术的发展, 越来越多的技术应用于高通量分析和分离差异表达基因^[4]。其中微阵列(microarray)和基因芯片(gene chip)技术是当前应用最为广泛的, 但由于没有现成可利用的芯片, 二者对非模式动物并不十分适合。除此之外, 目前尚有其他几种方法可用于基因表达谱的研究,

主要包括:cDNA 消减杂交(subtractive hybridization)技术、mRNA 差异显示(differential display, DD)技术、代表性差异分析(representational difference analysis, RDA)技术以及抑制消减杂交(SSH)技术。cDNA 消减杂交、RDA 以及 mRNA 差异显示等方法都有一个共同的缺点,即不能有效分离获得低丰度的差异表达基因,而抑制消减杂交技术却对高、低丰度的差异表达基因均能有效分离^[5-6]。除此之外,SSH 方法还具有快速、简便易行、所需 mRNA 量较少以及假阳性率低、重复性好等优点。SSH 方法正是凭借这些优点而成为分离差异表达基因的有力工具,获得了广泛的应用^[7-8]。尽管通过 SSH 方法获得的只是部分 cDNA 片段,但这些片段长度(200~800 bp)已足以用来进行同源性比较和对其编码蛋白的基序(motif)进行预测分析,其还可作为探针用来钓取相应的全长基因。此外,SSH 方法可以与基因芯片等高通量表达分析技术相联合,利用获得的克隆制备基因芯片,从而可以有针对性地对差异表达基因进行定量自动分析^[9]。

基于 SSH 在分离差异表达基因方面的优势,本研究选择该方法对正常视神经和受压 4 周和 8 周视神经之间差异表达基因进行比较和分离。通过 RNA 提取,双链 cDNA 合成、酶切、接头连接,两轮消减杂交及 2 次抑制 PCR 等反应步骤,使 Tester 与 Driver 中共有基因的 cDNA 片段得到有效消减,而存在于 Tester 中的特异表达基因则得到特异性扩增。利用 T/A 克隆技术,将特异性扩增的 PCR 产物直接与 T 载体进行连接,成功构建了猫视神经慢性受压后差异表达基因的消减 cDNA 文库。扩增文库后,经过初步蓝白斑筛选,菌液 PCR 结果显示约 80% 的克隆中有 200~800 bp 的插入片段。结果说明这些克隆中均可能含有慢性视神经损伤相关差异表达基因的 cDNA 片段。进一步分析这些 cDNA 片段,利用其钓取全长基因,可能为揭示慢性视神经

损伤的分子机制及治疗奠定基础。

[参考文献]

- [1] 吕立权,朱爱红,楼美清,蔡如珏,董艳,卢亦成.猫慢性视神经损伤模型的建立及病理学的动态变化[J].中华医学杂志,2006,86:2177-2181.
- [2] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, 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, 93:6025-6030.
- [3] Zuber J, Tchernitsa O I, Hinzmann B, Schmitz A C, Grips M, Hellriegel M, et al. A genome-wide survey of RAS transformation targets[J]. Nat Genet, 2000, 24:144-152.
- [4] Manning A T, Garvin J T, Shahbazi R I, Miller N, McNeill R E, Kerin M J. Molecular profiling techniques and bioinformatics in cancer research[J]. Eur J Surg Oncol, 2007, 33:255-265.
- [5] von Stein O D, Thies W G, Hofmann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25:2598-2602.
- [6] Gurskaya N G, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert P D, Khaspekov G L, Lukyanov K A, et al. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate[J]. Anal Biochem, 1996, 240:90-97.
- [7] Qing Y, Yingmao G, Shaoling L. Identification and validation of differentially expressed genes in neural tube defects of golden hamster induced by hyperthermia using suppression subtractive hybridization[J]. Int J Neurosci, 2007, 117:1193-1208.
- [8] Liu M Y, Wang X L, Fu B Q, Li C Y, Wu X P, Le Rhun D, et al. Identification of stage-specifically expressed genes of *Trichinella spiralis* by suppression subtractive hybridization[J]. Parasitology, 2007, 134(Pt 10):1443-1455.
- [9] Liu Y, Zhu X, Zhu J, Liao S, Tang Q, Liu K, et al. Identification of differential expression of genes in hepatocellular carcinoma by suppression subtractive hybridization combined cDNA microarray[J]. Oncol Rep, 2007, 18:943-951.

[本文编辑] 贾泽军