

# 一种改进的高效高保真的 PCR 合成鸡球虫总 cDNA 方法

蒋建林 蒋金书

(中国农业大学动物医学院)

**摘要** 本研究改进了用 PCR 合成 cDNA 的方法。先用具有长链合成能力的高效反转录酶(Superscript™ II Rnase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase)合成第一链 cDNA,用多种 RNA 酶去除 RNA 后,在第一链 cDNA 3 端用末端转移酶特异性加上多个 dGTP,再用具高保真和长链合成能力的耐高温 DNA 聚合酶(Taq 和 Pwo DNA 聚合酶)PCR 扩增总 cDNA。总 cDNA 长度分析试验结果表明本法合成的总 cDNA 质量高。

**关键词** cDNA 合成; PCR

**分类号** S852.72; Q 523

## A Modified Method of Synthesis Total cDNA Using PCR Technique with High Fidelity and High Yield

Jiang Jianlin Jiang Jinshu

(College of Veterinary Medicine, CAU)

**Abstract** This paper reported a modified method of synthesis total cDNA using PCR technique. The first-strand cDNA was synthesized with the Superscript II version of Rnase H<sup>-</sup> Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by using the oligo (dT)<sub>15</sub> primer containing Not I restriction sites at their 5' ends. After removal of mRNA, a G-tail was added to 3' ends of the first-strand cDNA using terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT). The double-strand cDNA was then synthesized by PCR with the most stable Taq and Pwo DNA polymerases using oligo (dC)<sub>18</sub> and oligo (dT)<sub>15</sub> primer. The size distribution of cDNAs synthesized by this approach was extended from 0.25 kb to 5.0 kb, and the majority of the amplified cDNAs were found to range from 0.5 kb to about 2.0 kb in size. The results showed that the high qualified total cDNA was synthesized by this modified method.

**Key words** cDNA synthesis; PCR

cDNA 合成是 cDNA 文库的构建中最关键的一步,合成的 cDNA 的质量直接影响到 cDNA 文库的质量。传统的合成方法基本上都利用反转录酶合成第一链 cDNA,再用 Rnase H 酶和 *Escherichia coli* DNA 聚合酶合成第二链 cDNA,这种方法简单方便,但 cDNA 的产量和质量受到一定限制。如材料的 mRNA 量不多,传统的方法合成的 cDNA 量就不足构建 cDNA 文库;*E. coli* DNA 聚合酶反应温度不能高于 16 (否则易发生“反弹 DNA”现象),空间结构

收稿日期: 1999-04-06

国家攀登计划资助项目(85-44)

蒋金书,北京圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区),100094

复杂的cDNA就很难合成。自Tam等<sup>[1]</sup>发明利用PCR方法合成cDNA以来,许多学者<sup>[2-7]</sup>对其进行了改进,该方法成为一种方便简单的cDNA合成方法。但因囿于分子生物学酶的缺陷,合成的cDNA的质量(特别是保真性和长度)不很高。本研究利用现代新型分子生物学酶(新型反转录酶和耐高温DNA聚合酶)改进了PCR合成鸡球虫cDNA的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

鸡球虫卵囊,取孢子化7h的卵囊作材料,按蒋建林等<sup>[8]</sup>方法分离;mRNA分离试剂盒为Pharmacia公司的QuickPrep<sup>®</sup> mRNA Purification Kit;反转录酶为BRL公司的Superscript<sup>™</sup> II RNAase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase;Taq酶为Boehringer Mannheim公司的Expand<sup>™</sup> High Fidelity PCR System。

### 1.2 分离mRNA

用1mL压积的孢子化7h的卵囊分离mRNA,具体方法按Pharmacia公司的试剂盒说明书操作。

### 1.3 反转录第一链cDNA

以oligo(dT)<sub>15</sub>-Not I为引物,mRNA在42~50min条件下用Superscript<sup>™</sup> II RNAase H<sup>-</sup>反转录酶合成第一链cDNA,具体方法见反转录酶说明书。

### 1.4 PCR扩增全长cDNA

用多种RNA酶(RNase H和Rnase A)去除mRNA后,在第一链cDNA 3'端用末端转移酶特异性加上多个dGTP。以oligo(dC)<sub>18</sub>作为上游引物,oligo(dT)<sub>15</sub>-Not I作为下游引物,用高保真耐高温DNA聚合酶(Expand<sup>™</sup> High Fidelity PCR System)PCR扩增全长cDNA,反应条件为:第1个循环为94℃ 30s,59℃ 30s,72℃ 10min;后30个循环为94℃ 30s,59℃ 30s,72℃ 5min。

### 1.5 cDNA质量检测

合成的cDNA经碱性凝胶电泳后,用放射自显影法测定其长度,具体方法见Promega公司的Universal Ribocloner<sup>®</sup> cDNA Synthesis System说明书。

## 2 结果和讨论

本研究以oligo(dT)<sub>15</sub>-Not I作引物用高效无RNase H酶活性的新型反转录酶(Superscript<sup>™</sup> II RNAase H<sup>-</sup>反转录酶)合成第一链cDNA,用末端转移酶在第一链cDNA 3'端加尾多聚dGTP,再以oligo(dC)<sub>15</sub>和oligo(dT)<sub>15</sub>-Not I作引物,用高保真耐高温聚合酶(Expand<sup>™</sup> High Fidelity PCR System)PCR扩增全长总cDNA(方案见图1)。本研究利用该方法合成的总cDNA大小在0.25~5.0kb之间,大部分cDNA集中于0.5~2.0kb之间,符合cDNA的合成分布规则(图2)。

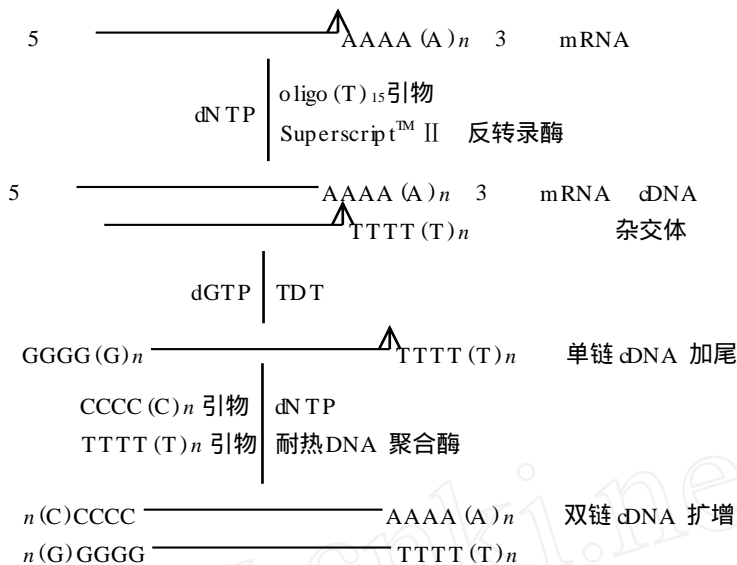


图 1 PCR 法扩增全长总 cDNA 的方案

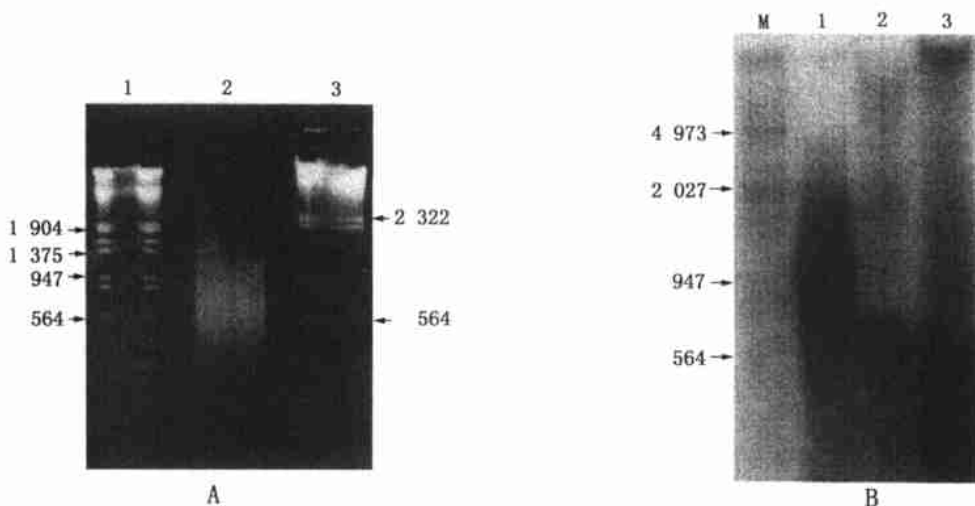


图 2 PCR 扩增的 cDNA 长度分析

- A. 1% 琼脂糖凝胶电泳分析: 1 λDNA 双酶切标准分子量; 2 cDNA; 3 λDNA 单酶切标准分子量。
- B. 放射自显影检测: 1 双链 cDNA; 2 同聚加尾后的第一链 cDNA; 3 第一链 cDNA; M λDNA 双酶切标准分子量。

已往研究<sup>[2-7]</sup>的基本思路都是用 TDT 在第一链 cDNA 的 3' 随机加尾,再用 Taq 酶 PCR 扩增总 cDNA。因 Taq 酶错配率高扩增片段短,这一方法没有被普遍接受。随着现代分子生物酶学和技术的发展,其缺点得到了很大的克服,并日益显示出其优越性。本研究用的

Superscript™ II RNAase H<sup>-</sup> 反转录酶无 RNAase H 酶活性, 并可以在较高温度下反转录(45~50 °C), 空间结构复杂的 mRNA 也可以反转录, 比传统的 cDNA 合成试剂盒中的反转录酶(AMV, MMLV)反转录活性高, 合成的第一链的 cDNA 质量高。在 PCR 扩增第二链 cDNA 时, 本研究采用 Boehringer Mannheim 公司的 Expand™ High Fidelity PCR System, 该酶为 Pwo 和 Taq DNA 聚合酶混合物, Pwo DNA 聚合酶具有 3'→5' 核酸外切酶活性, 与 Taq DNA 聚合酶混合后可以大大提高 PCR 反应的保真性和效率, 并具有长链合成能力, 保证了第二链 cDNA 的高质量合成。从本研究的 cDNA 合成长度来看, 用 PCR 方法合总 cDNA 的质量与传统合成方法相似, 但该方法所需 mRNA 最低可达 50 ng, cDNA 合成产量比传统方法高, 空间结构复杂的需高温才能反转录的 mRNA 和第一链 cDNA 也能合成。该方法的最大缺点是原来的 cDNA 的比例发生了变化, cDNA 的 5' 端增加了原本不属于 cDNA 的多聚核苷酸, 最后一个缺点现已用一新的改良方法克服。

Clontech 公司据这种 PCR 合成 cDNA 的方法原理, 结合现代酶学和技术的发展, 开发了一种新型的 cDNA 合成方法(Smart™ cDNA Technology)。这种方法也是利用高效反转录酶和高保真性耐高温 DNA 聚合酶, 但使用了特殊的引物。据 Clontech 公司报告, 该方法合成的 cDNA 绝大部分为全长 cDNA, cDNA 的 5' 端不会多出多聚核苷酸, 反而比传统方法多出多达 54 个原本属于 cDNA 的核苷酸, 更具有代表性, 并只需 ng 量级的材料, 也可以用总 RNA 作为材料。

## 参 考 文 献

- 1 Tam A W, Smith M M, Fry K E, Larrick J W. Construction of cDNA libraries from small numbers of cell using sequence independent primers *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(3): 1269
- 2 A kowitz A, Manuelidis L. A novel cDNA/PCR strategy for efficient cloning of small amounts of undefined RNA. *Gene*, 1989, 81(2): 295~ 306
- 3 Beyavsky A, Vinogradova T, Rajewsky K. PCR-based cDNA library construction: general cDNA libraries at the level of a few cells *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(8): 2919~ 2932
- 4 Domec C, Garbay B, Fournier M, Bonner J. cDNA library construction from small amounts of unfractionated RNA: A association of cDNA synthesis with polymerase chain reaction amplification. *Analytical Biochemistry*, 1990, 188: 422~ 426
- 5 Gurr S J, McPherson M J. PCR-directed cDNA libraries. In: McPherson M J, Quirke P, Taylor G R, eds. *PCR: A Practical Approach*. Oxford, England: IRL Press, 1991, 147~ 170
- 6 Revel F, Renard J P, Duranthon V. PCR-generated cDNA libraries from reduced numbers of mouse oocytes. *Zygote*, 1995, 3(3): 241~ 250
- 7 Welsh J, Liu J P, Efstratidis A. Cloning of PCR-amplified total cDNA: Construction of a mouse oocyte cDNA library. *Genet Anal Techn Appl*, 1990, 7: 5~ 17
- 8 蒋建林, 蒋金书. 柔嫩艾美耳球虫各阶段虫体纯化方法的改进. *中国农业大学学报*, 1996, 1(5): 99~ 102