http://www.journals.zju.edu.cn/med DOI:10.3785/j.issn.1008-9292.2009.04.007

利用抑制性消减杂交技术筛选大鼠哮喘相关基因

钟 波,王慧莲,Muhammad Shahzad,宁启兰,韩 燕,杨旭东,张富军,吕社民
(西安交通大学医学院遗传学与分子生物学系,陕西 西安 710061)

[摘 要] 目的:利用哮喘大鼠模型筛选与哮喘发病相关的差异性表达基因。方法:采用抑制性消减杂交技术,以哮喘大鼠肺组织总RNA为检验子,对照大鼠肺组织总RNA为驱赶子,将消减杂交获得的DNA片断与pGEM-T Easy Vector连接,构建cDNA文库后,转化大肠杆菌DH5α,筛选阳性克隆。将获得的阳性克隆插入片段进行测序分析,测序结果与GenBank数据库中cDNA和EST序列进行相似性比对,获得差异性表达基因的信息。结果:扩增消减cDNA文库获得300余个白色克隆,随即挑选36个测序,除去重复序列,结果中含有已知的基因4个,ESTs 2个及与任何序列无同源性的新基因片段3个。结论:成功构建了哮喘大鼠肺脏差异性表达基因的正向消减cDNA文库,筛选出数个与哮喘相关的差异表达基因。

[关键词] 哮喘/免疫学;哮喘/病理生理学;抑制性消减杂交;差异性表达基因;cDNA文库
[中图分类号] R 562.25 [文献标识码] A [文章编号] 1008-9292(2009)04-0362-08

Identification of differentially expressed genes in rat asthma model by suppression subtractive hybridization technology

ZHONG Bo, WANG Hui-lian, MUHAMMAD Shahzad, NING Qi-lan, HAN Yan, YANG Xu-dong, ZHANG Fu-jun, LU She-min (*Department of Genetics and Molecular Biology, Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Xi'an* 710061, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To identify differentially expressed genes related to asthma by using a rat model. **Methods**: Total RNA extracted from the asthmatic rats was taken as the tester and the total RNA from the control rats as the driver. Suppression subtractive hybridization (SSH) was used to isolate the cDNA fragments of differentially expressed genes. The products of SSH were inserted into pGEM-T Easy vector to establish the subtractive library. The library was amplified through *E. coli* transformation and positive clones of the transformants were screened. The white clones in selective medium from cDNA library were isolated and digested by EcoR I restriction endonuclease. Thirty-six positive clones were chosen randomly and sequenced. Nucleic acid similarity was subsequently analyzed by comparing with the data from GenBank (NCBI). **Results**: There were more than 300 white clones in the cDNA library. The clones were sequenced and similarity search (http://www.ncbi.hlm.nih.gov/BLAST) revealed 4 known genes, 2 ESTs

收稿日期: 2009-01-05 **修回日期**: 2009-04-22
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30630058,30801027,30571725).
作者简介:钟 波(1980—),女,博士研究生,从事哮喘发病机制的研究.
通讯作者:吕社民(1959—),男,博士,教授,从事复杂性疾病易感基因的定位与克隆;E-mail:lushemin@mail.xjtu.edu.cn.

without homologous genes and 3 potential new gene fragments. **Conclusion**: The forward-subtracted cDNA library for differentially expressed in the lung of asthmatic rats has been successfully constructed and the interesting candidate genes related to asthma have been identified.

[**Key words**] Asthma/immunol; Asthma/physiopathol; Suppression subtractive hybridization; Differentially expressed gene; cDNA library

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2009,38(4):362-369.]

支气管哮喘(简称哮喘)是一种以气道阻塞和气道高反应性为特征的过敏性炎性疾病，大量的资料提示该疾病可能是许多易感基因和环境因素相互作用的结果[1-2]。筛选和鉴定哮喘相关基因，对了解该疾病的病因及发病机制具有重要的意义。近年来已经建立了多种克隆新基因的方法，如mRNA差异显示反转录PCR，代表性差异分析技术(RDA)，基因表达系列分析以及cDNA微阵列技术等。这些方法都能有效地分离差异表达基因，但也存在如假阳性率高、差异基因丰度差别大、步骤烦琐、工作量大等问题。在RDA技术的基础上，Diatchenko等[3]于1996年设计出了以抑制性PCR和消减杂交技术为基础的抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization，SSH)，可以有效地分离和富集两种组织中差异表达的基因，其优点在于快速、易操作、实验周期较短、可使低丰度的片断大量富集。该技术目前在人类及其它动物和植物的基因克隆中得到了广泛的应用。

本研究以大鼠肺组织作为实验材料，用抑制性消减杂交技术构建了哮喘与对照肺组织差异表达基因的cDNA文库，并筛选、克隆哮喘差异表达基因，为从分子水平研究哮喘的发生发展机制提供线索。

1　材料和方法

1.1　主要材料及试剂　16～20周龄E3近交系大鼠9只，雌雄皆用，系本实验室从瑞典隆德大学引进，SPF级。鸡卵清蛋白(OVA)、铝佐剂均系美国Sigma公司产品；提取总RNA的Trizol®购自Invitrogen公司；分离mRNA所用的PolyATtract® mRNA Isolation System和pGEM-T Easy Vector购自Promega公司；反转录时使用的AMV Reverse Transcriptase购自BioFlux公司；合成DNA第二链时所用的polymerase I、RNase H以及限制性内切酶Rsa I均为Fermentas公司产品；E. coli Ligase、T4 DNA polymerase和T4 ligase购自TaKaRa公司；BD PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit为CLONTECH公司产品。

1.2　引物及接头的序列　反转录引物：5′ TTTTGTACAAGCTT$_{30}$N$_1$N 3′；PCR Primer 1：5′CTAATACGACTCACTATAGGGC 3′；Nested PCR Primer 1：5′TCGAGCGGCCGC CCGGGCAGGT 3′；Nested PCR Primer 2：5′AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT 3′；β-actin Forward primer：5′GAGGGAAATCGTGCG TGAC 3′；β-actin Reverse prime：5′GCATC GGAACCGCTCATT 3′。以上序列均由北京奥科生物技术有限责任公司合成。接头1：5′ CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGC GGCCGCCCGGGCAGGT 3′，3′GGCCCGTC CA 5′；接头2R：5′CTAATACGACTCACTAT AGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT 3′，3′GCCGGCTCCA 5′。二者由BD PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit提供。

1.3　方法

1.3.1　动物模型制备：按体重将9只16～20周龄的E3大鼠随机分为两组，哮喘组4只，对照组5只。哮喘组每只腹腔注射1 mg/ml OVA (pH为7.4，含50 mg/ml铝佐剂)1 ml，2周后用1 mg/ml的OVA(不含铝佐剂)滴大鼠双侧鼻，每侧50 μl，1次/日，共持续1周。对照组则腹腔注射和鼻腔滴注灭菌的1×PBS液。

1.3.2 总RNA提取及mRNA纯化：使用Trizol®提取对照大鼠和哮喘大鼠肺组织总RNA，用PolyATtract® mRNA Isolation System分离两种组织总RNA中的mRNA，具体步骤均按说明书操作。微量核酸蛋白定量仪和普通琼脂糖凝胶电泳鉴定总RNA及mRNA的纯度和质量。

1.3.3 配5×cDNA第二链合成缓冲液：用1 000 mmol/L KCl 250 μl、100 mmol/L $MgCl_2$ 125 μl、1 000 mmol/L Tris-HCl 50 μl、500 mmol/L $(NH4)_2SO_4$（含7.5 mmol/L β-NAD）50 μl、10 mg/ml BSA（购自TaKaRa公司）13 μl加灭菌水12 μl配成500 μl 5×cDNA第二链合成缓冲液。

1.3.4 cDNA合成：购置BioFlux RT007AMV Reverse Transcriptase，以mRNA为模板，按说明书操作合成cDNA第一链。并在cDNA第一链合成产物中加入适量RNase H、DNA polymerase I、E coli ligase及5×cDNA第二链合成缓冲液，16℃孵育2 h；加入T4 polymerase，16℃孵育30 min。用变性复性的方法检测双链的合成，即先取部分ds cDNA在室温下测其A_{260}，将该样品在94℃变性10 min，其中一半变性后立即放置冰上，另一半室温放置使其缓慢复性，10 min后再测这两份样品的A_{260}。其余ds cDNA用酚/氯仿抽提，常规操作，无水乙醇沉淀后加50 μl灭菌三蒸水溶解。取5 μl用于浓度鉴定及电泳分析，其余用于Rsa I酶切。

1.3.5 酶切：纯化后的ds cDNA每份样品中加入限制性内切酶Rsa I 1.5 μl（10 U/μl），37℃水浴反应2.5 h。取5 μl与酶切前的样品一起用2%琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切结果。剩余样品用酚/氯仿常规抽提回收，最终用5 μl灭菌三蒸水溶解。

1.3.6 连接：以哮喘模型肺组织的ds cDNA为检验子（tester），对照肺组织的ds cDNA为驱赶子（driver）；反向消减则以对照肺组织的ds cDNA为tester，以哮喘模型肺组织的ds cDNA为driver。将tester ds cDNA分别与接头1、2R用T4 ligase连接，16℃反应过夜。连接产物分别用β-actin forward primer、β-actin reverse primer和β-actin forward primer、PCR primer 1扩增检测连接效率。

1.3.7 两次杂交：连好接头的tester分别与过量新鲜变性的driver cDNA 68℃杂交8 h，将两份杂交产物合并后再与新鲜变性的过量driver cDNA杂交16 h。

1.3.8 两次PCR扩增：第一次PCR反应以PCR primer 1为引物，程序为72℃ 5 min→94℃ 3 min→94℃ 1 min，63℃ 45 s，72℃ 2 min，35个循环→72℃ 5 min。第二次PCR反应以第一次PCR反应产物为模板，以Nested primer 1和Nested primer 2R为引物，扩增富集差异表达的基因片段，具体程序为94℃ 30 s，68℃ 30 s，72℃ 1.5 min，15个循环。

1.3.9 消减文库的构建及转化重组子的鉴定：获得的SSH产物经无水乙醇沉淀纯化后，与pGEM-T Easy Vector按5∶1的比例12℃过夜连接，用热击法转化大肠杆菌DH5α感受态细胞，在含100 μg/ml氨苄青霉素的LB/X-gal/IPTG的培养板上37℃培养20 h，获得哮喘大鼠肺脏差异性表达基因的消减cDNA克隆。从正向cDNA文库随机挑选白色菌落，接种于含100 μg/ml氨苄青霉素的液体LB培养基中，37℃振摇培养过夜，提取扩增后的质粒，用EcoR I限制性内切酶酶切，1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定插入片段的大小。

1.3.10 DNA序列测定和相似性分析：随机挑选正向cDNA文库36个具有插入片段的阳性克隆送测序公司测序，测得的序列去除载体序列和巢式PCR引物序列，为真正的插入片段的序列，在Genbank数据库中进行相似性比对分析（http://www.ncbi.hlm.nih.gov/BLAST），分别在Reference mRNA sequences（Others）数据库，Non-human，non-mouse ESTs数据库及小鼠和人的数据库中寻找同源基因。

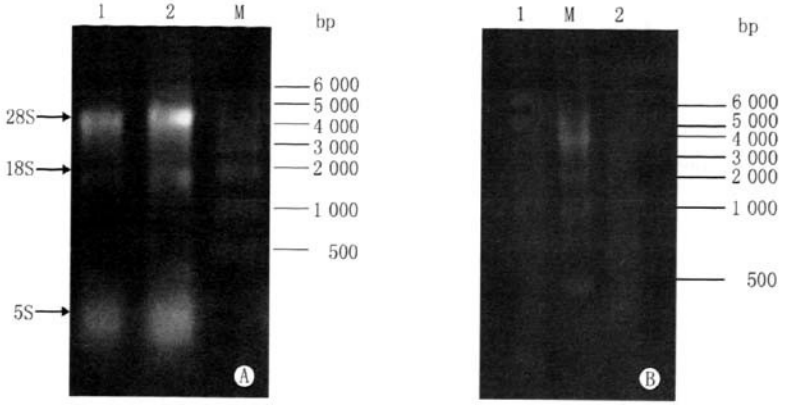
2 结果

2.1 经组织学、免疫学和生化指标的检测结果

与对照组相比，模型组大鼠出现了典型的哮喘样病理改变（结果未显示）。

2.2 RNA和mRNA的提取结果 提取的总RNA经微量核酸蛋白定量仪检测，哮喘模型大

鼠肺和对照大鼠肺的OD_{260}/OD_{280}比值分别为1.901和1.896。图1A示经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,提取的总RNA 28S、18S、5S rRNA条带清晰可见,且28S∶18S约为1.5～2∶1,这说明提取的总RNA没有降解且纯度较高。两者mRNA的OD_{260}/OD_{280}比值分别为1.700和1.995,说明mRNA的纯度较高,在1%琼脂糖凝胶电泳显示为彗尾状拖带,见图1B。

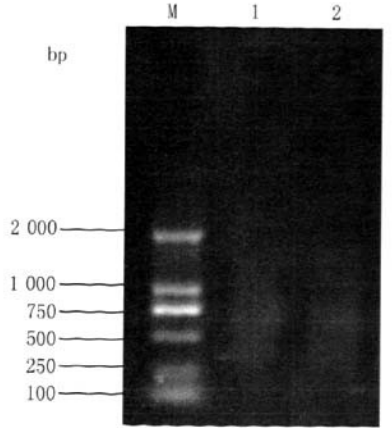


1:哮喘模型大鼠组;2:对照大鼠组;M:RNA Marker RL6000

图1　哮喘组与对照组总RNA(A)与mRNA(B)电泳图

Fig. 1　Electrophoresis results of total RNA(A) and mRNA(B)

2.3　ds cDNA合成电泳检测变性和复性结果　1%琼脂糖凝胶电泳可见合成的ds cDNA呈片状阴影分布(图2),片段集中在250 bp～>2 000 bp之间。这说明了cDNA扩增完整,符合实验的要求。



1:哮喘模型大鼠组;2:对照大鼠组;M:D2000 DNA Marker

图2　哮喘组与对照组ds cDNA电泳图

Fig. 2　Electrophoresis results of ds cDNA

在ds cDNA合成反应结束后,对样品进行了变性与复性的处理。从结果(表1)可以看出,94℃变性10 min并在冰上放置使DNA保持单链的样品,其A_{260}值的增加率分别为26.9%和41.9%,与理论值37%比较接近,在一定程度上可以说明成功合成了cDNA双链。

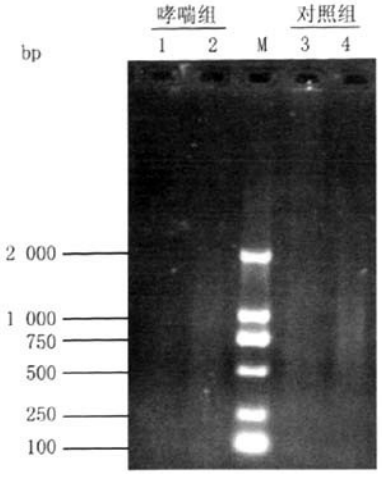
表1　ds cDNA A_{260}值测定结果

Table 1　A_{260} value of ds cDNA

组别	变性前	室温复性后	冰上放置后	冰上放置后的增加率/%
哮喘组	0.431	0.500	0.547	26.9
对照组	0.334	0.439	0.474	41.9

2.4　ds cDNA Rsa I酶切结果　Rsa I酶切前后的cDNA在2%的琼脂糖凝胶上同时电泳,酶切后片段较未经酶切片段弥散条带的发光中心明显前移,说明cDNA片段长度减小,cDNA已经被酶切(图3)。

2.5　连接效率分析　ds cDNA与接头连接效率的高低是决定SSH成败的关键之一,ds cDNA的酶切片段5′端分别与接头1和接头2R



1:酶切后;2:酶切前;3:酶切前;4:酶切后;M:D2000 DNA Marker

图3 哮喘组与对照组ds cDNA Rsa I酶切后的电泳结果

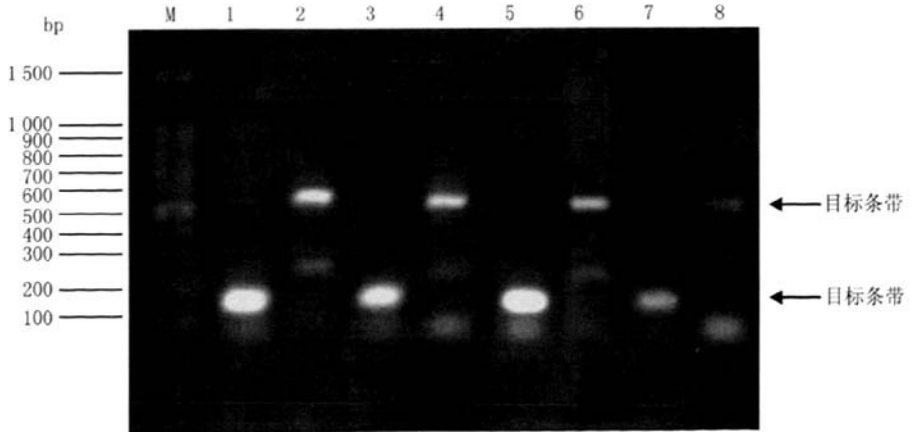
Fig. 3 Electrophoresis results after Rsa I digesting ds cDNA

连接后,利用接头外侧序列引物 Primer 1 和β-actin forward primer、β-actin reverse primer 和β-actin forward primer 分别扩增β-actin 基因。PCR 产物经电泳分析(图4),并将图像经凝胶成像系统软件分析,灰度扫描结果(表2)显示,接头序列引物 Primer 1 和β-actin forward primer 扩增产物较β-actin reverse primer 和β-actin forward primer 所得产物灰度扫描值相差小于4倍,连接效率达到了理论要求的25%,可以进行后续实验。

表2 接头连接效率检测PCR产物灰度扫描值测定

Table 2 Gray scale value of PCR products

组　别	泳道	灰度扫描值 /×10⁴	连接效率 /(B：A)×100%
哮喘组	1(A)	4.086	
	2(B)	1.612	39.45%
	3(A)	3.426	
	4(B)	1.289	37.62%
对照组	5(A)	4.070	
	6(B)	1.156	28.40%
	7(A)	1.299	
	8(B)	0.324	24.94%

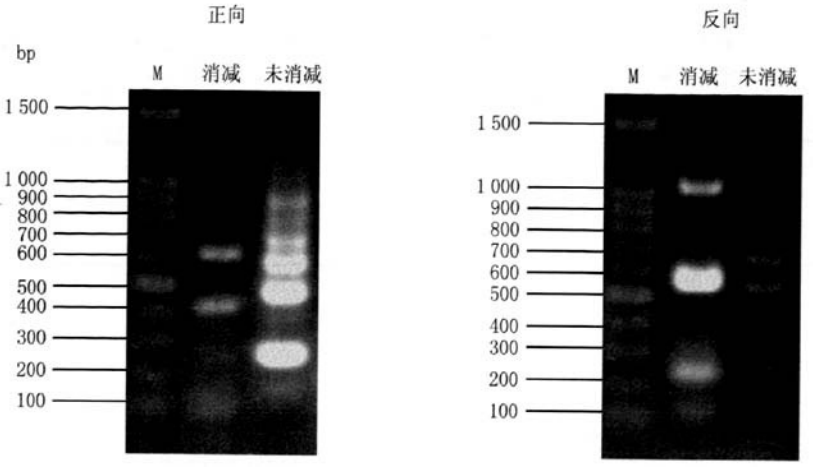


1,2,3,4:哮喘模型大鼠组;1,2:tester 与接头1相连;3,4:tester 与接头2R 相连;5,6,7,8:对照大鼠组;5,6:tester 与接头1相连;7,8:tester 与接头2R 相连;1,3,5,7:用β-actin forward primer 与β-actin reverse primer 扩增;2,4,6,8:用β-actin forward primer 与PCR primer 1 扩增;M:100 bp ladder DNA marker

图4 PCR法检测接头连接效率产物的电泳结果

Fig. 4 Electrophoresis results of PCR products when analyzing the adaptors ligation efficiency

2.6 两轮PCR对消减杂交产物的特异性扩增结果　首先用接头序列外侧引物PCR Primer 1对消减产物进行扩增，再次用接头内侧引物扩增第一轮PCR产物，正向与反向消减均15个循环可见明显的消减产物，其产物平均分布在500 bp左右，在正向与反向、消减与未消减间均有显著差别(图5)。



M:100 bp ladder DNA marker

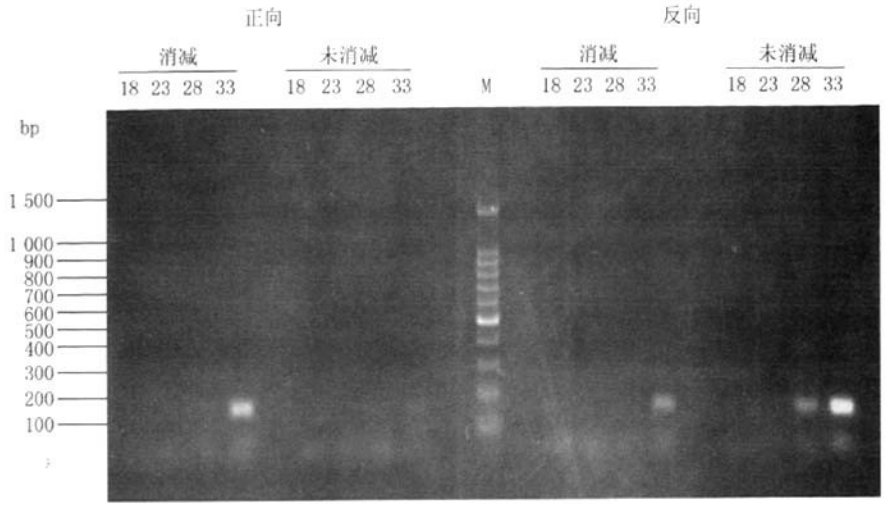
图5　正向、反向杂交与未杂交产物第二次PCR后的电泳结果

Fig. 5　Electrophoresis results of the second PCR products

2.7 消减效率分析　消减效率高低直接决定消减文库的质量。分别以正向和反向经消减杂交与未经消减杂交的第二轮PCR产物为模板扩增β-actin基因，结果如图6。从正向消减的结果可以看出该基因在消减后得到了明显地富集，出现了清晰的亮带，提示在哮喘发生时通常可以作为管家基因的β-actin可能发生了上调；而反向消减的结果也从反面证明了这一点。综合起来说明两个方向的消减杂交效率都是比较满意的。

2.8 消减cDNA文库的构建和鉴定结果　将获得的抑制性消减杂交产物克隆至pGEM-T Easy Vector上，然后转化感受态DH5α。将转化后的细菌接种于含氨苄青霉素的LB/X-gal/IPTG的培养板上，37℃孵育过夜，将克隆计数。得到的300～400个菌落中80%为白色克隆，表明抑制性消减杂交第二次PCR产物被高效地克隆至pGEM-T Easy Vector中。克隆扩增后提取的质粒经EcoR I消化后进行电泳(图7)。由于pGEM-T Easy Vector在外源片段插入两端均有一个EcoR I酶切位点，经该酶单酶切后可以释放出插入的cDNA片段。酶切结果显示，90%的克隆中含有200～600 bp的插入片段，与Rsa I酶切ds cDNA的结果一致。从结果中可见部分插入片段被酶切成了两个条带，可能的原因是插入片段本身也存在EcoR I的酶切位点。

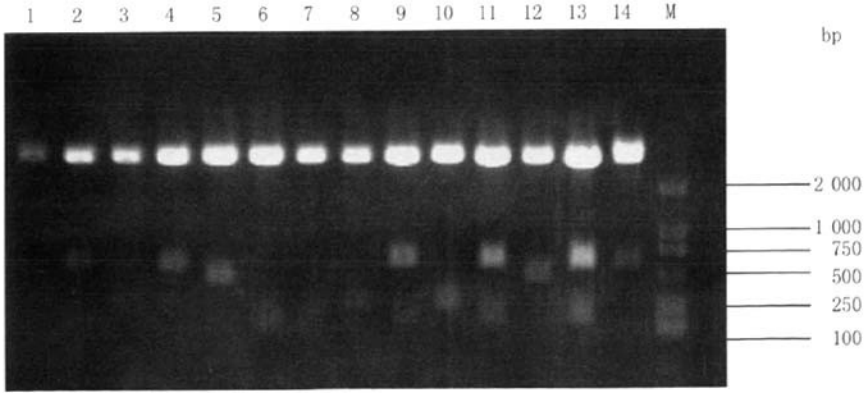
2.9 生物信息学分析　测序的36个阳性克隆中除去重复序列，去除载体序列和巢式引物序列所得的序列，在NCBI Genbank数据库中进行核酸序列的相似性比对。结果显示，有4个克隆源于已知基因，分别为蛋白酶体7型α亚单位，肺表面活性物质相关蛋白C(SP-C)，烟碱型胆碱能受体α多肽与人类着丝粒蛋白，2个克隆与大鼠的EST高度同源，3个克隆可能为新的EST，占总测序量的25%。未发现GAPDH等管家基因。



18、23、28、33代表循环数;M:100 bp ladder DNA marker

图6 PCR法分析正向与反向消减杂交效率电泳结果

Fig. 6 Electrophoresis results of PCR products in the efficiency analysis of forward and reverse subtractive hybridizations



1～14:部分提取的质粒;M:D2000 DNA Marker

图7 质粒DNA经EcoR I酶切后的电泳结果

Fig. 7 Electrophoresis results after EcoR I digesting plasmid DNA

3 讨 论

抑制性消减杂交技术因其易操作、假阳性率低和重复性强等优点,在筛选差异性表达基因的领域被得到了广泛的应用,每年都有大量的差异性表达基因被发现[4-10]。本研究取用哮喘大鼠和对照大鼠的全肺组织,正向消减以哮喘大鼠肺组织cDNA为检验子(tester),对照大鼠肺组织cDNA为驱赶子(driver),经过两轮消减杂交和两次PCR扩增,得到了哮喘大鼠肺组织的差异性表达基因,成功构建了哮喘大鼠肺脏差异性表达基因的正向消减cDNA文库。

目前,针对哮喘发病机制的基础研究在不断地深入,研究的重点也已进入分子水平,但由于哮喘所涉及因素众多,一些关键细胞获得量太少限制了其研究的深入,能否获得足够的起

始量是在实验前需要首先考虑的一个问题。我们采用E3大鼠的肺组织直接提取总RNA和mRNA,组织易取,易保存,可保证获得足够的起始实验材料,即使在实验中需要重复,也无需担心样品量不够。有人直接用滑膜组织[11]作为起始材料进行抑制性消减杂交,获得满意效果,往往可以省去分离和提取细胞的步骤。

有研究表明,选择性抑制剂对蛋白酶体的阻断可以缓解NF-κB的效应,从而抑制炎症反应。而蛋白酶体抑制剂的使用可以明显降低哮喘模型大鼠的白细胞数量,特别是嗜酸性粒细胞的数量[12]。这些结果表明,蛋白酶体在哮喘的发病中可能起到一定的作用,但其确切机制尚不明了。肺表面活性物质相关蛋白是由肺泡Ⅰ型上皮细胞产生的磷脂蛋白复合体,有四种肺表面活性物质相关蛋白(SP),分别简称为SP A、SP B、SP C、SP D。目前了解较多的是SP A与哮喘的关系,有研究表明SP A可以减弱鼠类哮喘模型的嗜酸性粒细胞炎症反应[13]。而对于SP-C与哮喘的关系知之甚少。对于人类着丝粒蛋白和烟碱型胆碱能受体与哮喘发病的关系更鲜有报道。我们进一步的研究工作,将设计实验来验证这些差异表达基因片段在E3大鼠哮喘肺组织和正常肺组织中的表达情况,获得真正意义上的哮喘差异表达基因,并对已获的基因进行功能学研究,为进一步揭示哮喘发生、发展的分子机制提供线索。

References:

[1] BARNES K C. Gene-environment and gene-gene interaction studies in the molecular genetic analysis of asthma and atopy [J]. **Clin Exp Allergy**, 1999, 29: 47-51.

[2] DU Xiao-gang, DONG Xin-wei, CHEN Ji-qiang, et al (杜晓刚, 董新威, 陈季强, 等). Immunoregulatory effects of pertussis protein on allergic asthma in mouse [J]. **Journal of Zhejiang University: Medical Sciences** (浙江大学学报:医学版), 2008, 37(4): 351-356. (in Chinese)

[3] DIATCHENKO L, LAU Y C. Suppression subtractive hybrization: A method for generating differentially regulated or tissue specific cDNA probes and libraries [J]. **P Natl Acad Sci USA**, 1996, 93: 6025-6030.

[4] MURPHY M, GODSON C, CANNON S, et al. Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells [J]. **J Biol Chem**, 1999, 274(9): 5830-5834.

[5] PITZER C, STASSAR M, ZOLLER M. Identification of renal-cell-carcinoma-related cDNA clones by suppression subtractive hybridization [J]. **J Cancer Res Clin**, 1999, 125(8-9): 487-492.

[6] RHO J, ALTMAN C R, SOCCI N D, et al. Gene expression profiling of osteoclast differentiation by combined suppression subtractive hybridization (SSH) and cDNA microarray analysis [J]. **DNA Cell Biol**, 2002, 21(8): 541-549.

[7] CAI J L, XUE H P, ZHAN M, et al. Characterization of progenitor-cell-specific genes identified by subtractive suppression hybridization [J]. **Dev Neurosci-Basel**, 2004, 26(2-4): 131-147.

[8] COLIN C, BAEZA N, BARTOLI C, et al. Identification of genes differentially expressed in glioblastoma versus pilocytic astrocytoma using suppression subtractive hybridization [J]. **Oncogene**, 2006, 25(19): 2818-2826.

[9] QIU J, NI Y H, GONG H X, et al. Identification of differentially expressed genes in omental adipose tissues of obese patients by suppression subtractive hybridization [J]. **Biochem Bioph Res Co**, 2007, 352(2): 469-478.

[10] SOUSA J F, ESPREAFICO E M. Suppression subtractive hybridization profiles of radial growth phase and metastatic melanoma cell lines reveal novel potential targets [J]. **Bmc Cancer**, 2008, 8(1): 1-19.

[11] JUSTEN H P, GRUNEWALD E, TOTZKE G, et al. Differential gene expression in synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. **Mol Cell Biol Res Comm**, 2000, 3(3): 165-172.

[12] ELLIOTT P, PIEN C, CORMACK M C, et al. Proteasome inhibition: A novel mechanism to combat asthma [J]. **J Allergy Clin Immun**, 1999, 104(2 Pt 1): 294-300.

[13] HOHLFELD J M, ERPENBECK V J, KRUG N, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D as modulators of the allergic inflammation in asthma [J]. **Pathobiology**, 2002-2003, 70(5): 287-292.

[责任编辑　黄晓花]