

利用 Taq DNA 聚合酶反转录 cDNA 第一链的研究

张银东 彭存智 曾宪松 郑学勤

(热带作物生物技术国家重点实验室 海口 571101)

摘 要 应用 Taq DNA 聚合酶 (*Thermus aquaticus* DNA polymerase) 直接对 RNA 进行反转录成 cDNA 第一链, 然后用特异引物进行 PCR 扩增, 结果表明, 反转录达到 AMV 逆转录酶的效果, 且可能得到比 AMV 逆转录酶更完整的 cDNA 第一链。

关键词 Taq DNA 聚合酶, 反转录, cDNA 第一链

分类号 Q756 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0079-82

DNA 聚合酶(DNA polymerase)是那些以 DNA 或 RNA 为模板催化合成互补新链的一类酶。大多数情况下, DNA 聚合酶作用需要一个引物来起聚合作用。分子克隆中许多步骤都涉及在 DNA 聚合酶催化下的 DNA 体外合成反应, 这些酶作用时大多数需要模板, 合成产物的序列则与模板互补。大多数聚合酶优先作用于 DNA 模板, 但也可作用 RNA 模板。耐热 DNA 聚合酶(Taq DNA 聚合酶)是聚合酶中重要的一种, 它是一种依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶, 最初是从极度嗜热的栖热生菌(*Thermus aquaticus*)中纯化而来的^[1]。逆转录酶也是聚合酶中的重要的一类, 这类酶的作用特点是可以以 RNA 作为聚合模板, 合成与之互补的新的 DNA 链。目前, 已广泛应用于 cDNA 文库的构建和基因分离等分子克隆的各个领域^[2-4]。常用的是禽源反转录酶, 其最佳反应温度为 42℃, 最佳 pH 值为 8.3, 当反应的 pH 值偏离最佳 pH 值 0.2 时, 其催化合成的 cDNA 长度就将大大降低^[5], 使得 cDNA 文库的构建和基因的分选和克隆过程中出现一些意想不到的问题。Taq DNA 聚合酶的反转录酶活性在国外已有报道^[7], 但在国内尚未见到, 本研究报道了利用 Taq DNA 聚合酶进行反转录 RNA(mRNA)成 cDNA 的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

冬麦 (*Triticum aestivum* L. cv Fredrick) 种子播种于沙盘, 待小麦幼苗长到 7d 之后, 作如下处理: (1) 4℃ 低温处理 1~4d; (2) 10^{-5} mmol/L ABA 处理 2~4d; (3) 2% NaCl 处理 2~4d。以没有处理的材料为对照。提取 RNA 和反转录过程中所用的试剂和酶类均为上海华美公司和 Promega 公司的产品。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取按文献[3]介绍的方法进行。

1.2.2 RNA 反转录成 cDNA 第一链: 用 AMV 进行反转录, 按 Promega 公司介绍的方

法略加改进进行:(1)取无菌的 0.5mL 离心管置冰上,依次加入 2 μ g RNA, 0.5 μ g Oligo(dT) (15mer)引物/ μ g RNA,再加入无菌双蒸水至 10 μ L 反应管于 70 $^{\circ}$ C 保温 5min,立即置冰上冷却 5min。(2)加入 AMVRT5 倍反应缓冲液 5 μ L;dNTP 混合物(10mmol/L) 2.5 μ L, RNA 酶抑制剂 40 u, AMVRT 30 u,用无菌双蒸水补至总体积为 25 μ L。(3)混匀,于 42 $^{\circ}$ C 保温 60min,反应结束后,置 95 $^{\circ}$ C 保温 5min 以使酶失活。-20 $^{\circ}$ C 储存备用。

用 Taq DNA 聚合酶进行反转录:(1)取无菌的 0.5mL 离心管置冰上,依次加入 2 μ g RNA 0.5 μ g Oligo(dT)(15mer)引物/ μ g RNA,再加入无菌双蒸水至 10 μ L,反应管于 70 $^{\circ}$ C 保温 5min,立即置冰上冷却 5min。(2)加入 Taq DNA 聚合酶 10 倍反应缓冲液 2.5 μ L, dNTP 混合物(10mmol/L) 2.5 μ L, RNA 酶抑制剂 40 u;Taq DNA 聚合酶 5 u,用无菌双蒸水补至总体积为 25 μ L。(3)混匀按如下反应条件进行反转录反应,94 $^{\circ}$ C 变性 2min,65 $^{\circ}$ C 保温 10min。反应结束后,于 -20 $^{\circ}$ C 储存备用。

1.2.3 PCR 反应:按文献[6]报道的小麦低温诱导蛋白基因序列合成一对引物

5'AGTGAGGATCCCAGCGCAAGATGGAGAAC

5'TTCTCGGATCCAACGACCAAGTGAGCT

将反转录产物用无菌水稀释到 50 μ L,取 1 μ L 作为 PCR 反应的模板,然后依次加入 10 \times Taq DNA 酶缓冲液,5 μ L dNTP s(2.5mmol/L) 5 μ L,5'端引物 20pmol、3'端引物 20pmol Taq DNA 聚合酶 1~3 u,最后加水补至总体积为 50 μ L,再加 50 μ L 石蜡油覆盖于表面,按以下条件进行 PCR 反应:94 $^{\circ}$ C 变性 2min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1min,55 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2min,共进行 35 个循环,最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min,反应结束后取 5 μ L 用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察,PCR Marker 为分子量标准。

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 按文献[3]介绍的方法所提取的 RNA 其 $OD_{260/280} = 2.001$, $OD_{260/230} = 2.002$,由此可见其纯度完全要以满足实验的要求。

2.1.2 PCR 反应的结果:不同处理的材料其 PCR 产物结果完全不同,见图 1。ABA、氯化钠和对照一样,没有出现理想的扩增产物,而经低温(4 $^{\circ}$ C)诱导处理后,结果出现同文献[6]报道的结果一致,扩增产物约 1.5kb。说明该基因仅特异地受低温诱导,而不同于其它的胁迫基因。

利用逆转录酶(AMV)和 Taq DNA 聚合酶进行逆转录反应的结果从图 1 可以看出用两种不同的方法获得的 cDNA 第一链即 RNA-DNA 杂交链是完整的,且两者结果基本一致。因此,Taq DNA 聚合酶完全能够完成 RNA 反转录成 cDNA 的反应。

为了进一步证实这一结果,避免假阳性的出现,在用 Taq 酶反转录之前,取部分 RNA 样品分别用 DNase I 及 RNase 处理,再进行反转录,结果如图 2 所示:用 DNase 处理后的 RNA 进行反转录的 PCR 扩增产物同 RNA 直接反转录后的 PCR 扩增的结果完全一致;而用 RNase 处理后再反转录则无任何扩增带,这进一步证实了 Taq 酶的反转录活性。

2.2 讨论

根据文献[5]报道,目前实验室常用的禽源反转录酶(AMV)其反应最佳温度为

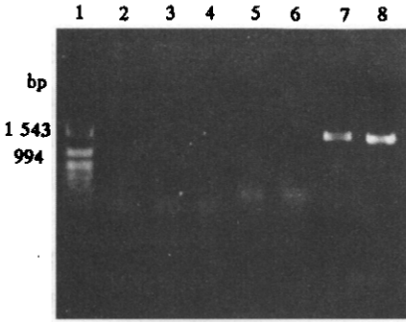


图 1 不同处理两种反转录方法的 PCR 结果

Fig.1 PCR results of two RT products with different treatment

1. PCR Marker; 2. CK(nontreatment);
3, 4. 2% NaCl(4d); 5, 6. 10~5mmol/L(4d);
7, 8. 4°C (4d)
(2, 3, 4, 7. AMV RT, 4, 6, 8. Taq RT)

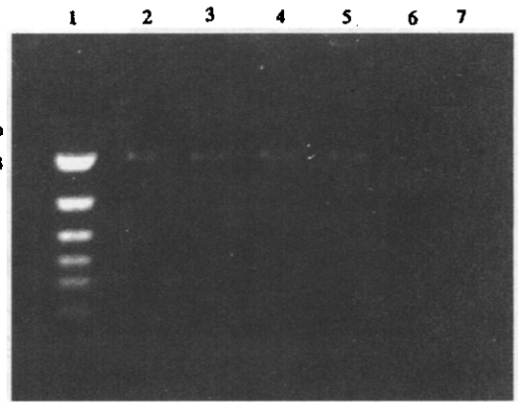


图 2 DNase I 和 RNase 处理后反转录产物的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplified with RT products after RNA treated by DNase I and RNase

1. PCR marker; 2, 3. CK(nontreatment);
4, 5. treated with DNaseI;
6, 7. treated with RNase;
(2, 4, 6 are AMV; 3, 5, 7 are Taq)

42℃, 最佳 pH 值为 8.3, 而当反应溶液的 pH 值偏离最佳值 0.2 时(pH8.3±0.2), 其催化合成的 cDNA 长度就将大大降低, 有时甚至直接影响 PCR 的扩增(见图 3)。另外, AMV 反应温度为 42℃, 在此条件下, RNA 或 mRNA 解链不完全, 尤其是大于 1kb 以上的 RNA 或 mRNA 链中的二级结构不易解开, 可能仍然以二级结构的形式存在, 如图 4 所示。

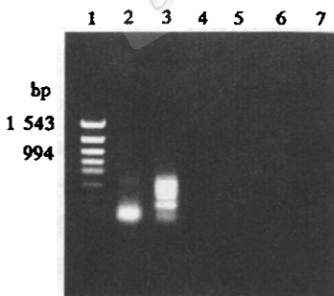


图 3 pH 值对 AMV 反转录的影响

Fig.3 Effects of pH value on AMV RT

1. PCR Marker
2~7. pH value of the reaction buffer
8.1, 8.5, 7.4, 7.8, 8.3, 8.7
(All samples treated with 4°C for 4d)

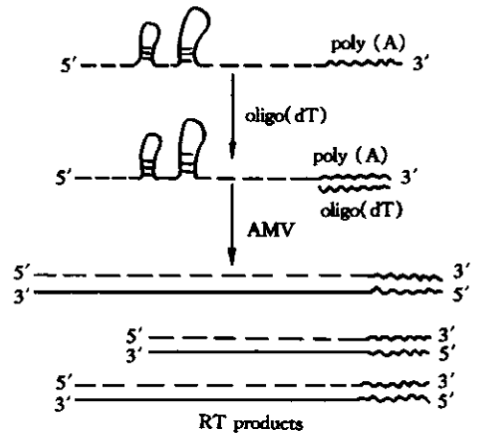


图 4 AMV 反转录过程中 RNA 二级结构示意图

Fig.4 RNA secondary structure in the process of AMV RT

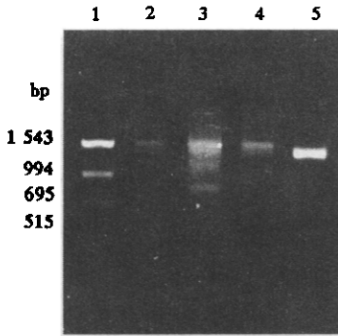


图 5 两种反转录方法对 PCR 扩增产物的影响

Fig. 5 Effects of two RT methods on PCR products

1. PCR Marker; 2, 3, 4. PCR results of AMV RT;
5. PCR results of Taq RT (all samples treated with 4°C for 4d)

这样, AMV 催化合成的 cDNA 第一链的长度就不一致, 因此经 PCR 扩增后, 往往出现多条扩增条带(见图 5)。使得后续的克隆工作难度加大。而在本实验中用 Taq DNA 聚合酶进行的逆转录反应获得的 cDNA 即 RNA-DNA 杂交链经 PCR 反应则没有出现以上情况。

根据 Grable 1996 年的报道^[7], 只有在缓冲液中加入 2mmol/L 的 Mn^{2+} 时, Taq 酶才有 RT 活性, 但本实验在多次重复中, 只用常规的缓冲液而没有加入 Mn^{2+} 均能得到满意的结果。

由此可见, 利用 Taq DNA 聚合酶进行逆转录反应, 完全可能获得利用 AMV 进行逆转录反应的结果, 有时反而会得到比 AMV 更为理想的结果。再者在经济上更为实惠。因此这一研究结果具有较大的理论意义和实际意义。

参 考 文 献

- [1] A. Chien, D. B. Edgar, J. M. Trela. *J. Bacteriol.*, 1976, **127**: 1550.
- [2] 胡天华, 吴琳, 刘伟等. 见: 陈章良主编, 植物分子生物学丛书-1. 北京: 北京大学出版社, 1992, pp. 191~201.
- [3] 黄晓风, 王荣臣, 阎隆飞等. 见: 陈章良主编, 植物分子生物学丛书-1. 北京: 北京大学出版社, 1992, pp. 170~176.
- [4] 王春香, 高谦等, 陈章良主编, 植物分子生物学丛书-1. 北京: 北京大学出版社, 1992, pp. 202~208.
- [5] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd Ed*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp. 275~276.
- [6] Mario Houde, Jean Danyluk, Jean-Francois Lalierte *et al.* *Plant Physiol.*, 1992, **99**: 1381~1387.
- [7] Grable *et al.* *FEBS Letters*, 1996, **387**: 189~192.

First Strand Synthesis of cDNA by Application of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase

Zhang Yindong Peng Cunzhi Zeng Xiansong Zheng Xueqin
(National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, Haikou 571101)

Abstract First strand synthesis of cDNA was catalyzed by application of the Taq DNA polymerase, then PCR was made using cDNA-RNA as a template with speciale primer. The results showed that the effects of first strands synthesis of cDNA catalyzed by Taq DNA polymerase and AMV Reverse Transcriptase were the same as each other, and , could obtain longer cDNA first strands than AMV Reverse Transcriptase. These results are the first report in native.

Key words Taq DNA polymerase, reverse transcript, first strand of cDNA