

## 应用 Super SMART cDNA 合成技术扩增哮喘嗜酸性粒细胞总 RNA

赵海金<sup>1</sup>, 蔡绍曦<sup>1</sup>, 邹飞<sup>2</sup>, 佟万成<sup>1</sup>, 万为人<sup>2</sup>(第一军医大学<sup>1</sup>南方医院呼吸科,<sup>2</sup>热带军队卫生学系高温医学研究室, 广东广州 510515)

**摘要:**目的 应用 Super SMART cDNA 合成技术从嗜酸性粒细胞微量总 RNA 扩增大量双链 cDNA。方法 利用 Percoll 密度梯度离心分离哮喘病人血嗜酸性粒细胞, 用 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA, 利用 Super SMART cDNA 合成技术合成 cDNA 第 1 链及优化扩增第 2 链。通过梯度电泳鉴定 cDNA 产品质量, 通过对获得的 cDNA 定量来评估扩增效能。结果 从 20 ng 总 RNA 成功扩增出双链 cDNA 7.155 μg, 电泳结果显示 cDNA 质量及纯度较高。结论 Super Smart cDNA 合成技术可实现从微量总 RNA 高效扩增高质量的 cDNA, 为进一步从基因水平研究哮喘机制奠定了基础。

**关键词:** Super SMART cDNA 合成技术; 支气管哮喘 / 病因; 嗜酸性粒细胞

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)09-1037-03

## Super SMART cDNA synthesis technology for amplifying small amount of total RNA of peripheral blood eosinophils from asthma patients

ZHAO Hai-jin<sup>1</sup>, CAI Shao-xi<sup>1</sup>, ZOU Fei<sup>2</sup>, TONG Wan-cheng<sup>1</sup>, WAN Wei-ren<sup>1</sup>

Department of Respiratory Diseases, Nanfang Hospital<sup>1</sup>, Department of High-temperature Medicine<sup>2</sup>, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract: Objective** To amplify double-strand cDNA from small amount of total RNA of eosinophils from asthma patients by Super SMART cDNA synthesis technique. **Methods** The eosinophils were purified from the peripheral blood of asthma patients before and after treatment by Percoll gradient centrifugation, from which the total RNA was extracted using TRIzol kit. First-strand cDNA synthesis and double-strand cDNA amplification were performed using Super SMART cDNA synthesis technique. The quality of the obtained cDNA was evaluated by gradient cDNA electrophoresis, and the amplification efficiency determined by cDNA quantification. **Result** From 20 ng total RNA, 7.155 μg and 6.568 μg of the tester and driver double-strand cDNAs respectively were obtained successfully, and the result of electrophoresis indicated high quality and purity of the cDNA acquired. **Conclusion** Super SMART cDNA synthesis technique can effectively amplify high-quality double-strand DNA from a very small amount of total RNA, which may facilitate the exploration of the mechanism of asthma from the genetic level.

**Key words:** super smart cDNA synthesis technology; bronchial asthma/pathogeny; eosinophils

近 20 年来,相当多的研究已经表明,支气管哮喘是一种复杂的多基因遗传病。而嗜酸性粒细胞(EOS)在气道组织的浸润是引起气道炎症的主要原因及特征之一,是哮喘发作的关键效应细胞<sup>[1,2]</sup>。人们迫切想知道哮喘发病过程中具体的效应细胞即 EOS 基因改变的本质,这也是近年来研究的主导方向。然而基因表达的研究需要 RNA 的分析,用传统的方法从非常小的样本中获得 RNA 及高质量的 cDNA 非常困难,效率也低下,这就限制了从基因水平研究 EOS 的功能。本研究即应用 Super SMART cDNA 合成技术从血 EOS 微量总 RNA 扩增大量双链 cDNA,为下一步文库的构建及基因筛选提供有力的保证。

收稿日期:2004-03-16

基金项目:国家自然科学基金(30270593)

This study was supported by National Natural Science Foundation of China (30270593)

作者简介:赵海金(1975-),男,第一军医大学在读硕士生,主治医师,电话:020-61641575

通讯作者:蔡绍曦,电话:020-61641571

Corresponding author: CAI Shao-xi, Tel: 86-020-61641571

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

分离哮喘细胞的 Percoll 试剂购自 Amersham Pharmacia 公司;Trizol 总 RNA 分离试剂购自 Invitrogen 公司;Super SMART cDNA 合成试剂盒及 Chroma spin -1000 depc 水纯化柱购自 Clontech 公司。

#### 1.2 外周静脉血 EOS 分离及 RNA 提取

所用 EOS 取自我院门诊 1 例符合哮喘诊断标准<sup>[3]</sup>的 36 岁男性患者,治疗前后各取静脉血 15 ml,取血后立即分离 EOS。采用不连续密度梯度法,按 Percoll 试剂说明书及称量法确定各梯度的密度。分离完毕对 EOS 进行计数及活力鉴定。哮喘病人治疗前后 EOS 总 RNA 参照 Trizol 试剂盒说明进行。

#### 1.3 第一、二链 cDNA 的合成

参照 super SMART cDNA 合成试剂盒说明书及文献<sup>[4,5]</sup>进行。

1.3.1 第一链 cDNA 的合成 取治疗前后的 EOS 总 RNA 各 20 ng 分别与 7 μl 3' SMART CDS 引物 II (12 μmol/L) 和 7 μl SMART II A 寡核苷酸 (12 μmol/L)混

合,热循环仪 65 °C、孵育反应管 2 min。再加入 20 μl 5×第 1 链缓冲液,2 μl DTT (100 μmol/L),10 μl 50×dNTP (10 mmol/L),5 μl Rnase 抑制剂 (20 U/μl),5 μl Powerscript 逆转录酶,42 °C 孵育反应管 60 min,加 2 μl 0.5 mol/L EDTA 终止反应。

1.3.2 柱层析 根据 NucleoSpin 提取试剂盒上的步骤进行操作。在使用之前根据瓶上说明直接加 28 ml 95%酒精到 NT3,加 3 体积的 NT1 缓冲液到每一 cDNA 合成反应管。分别吸取样品到 NucleoSpin 柱,14 000 r/min 离心 1 min。洗涤样品,共 3 遍,插入该 NucleoSpin 柱到新的 2 ml 收集管,14 000 r/min 旋转 1 min 来干燥过滤器。转移 NucleoSpin 纯化柱,加 50 μl Mili-Q 水,在盖子开放的情况下浸泡 2 min。14 000 r/min 离心 1 min,重复洗提,使最终容积为 80 μl。

1.3.3 长距离 PCR (LD-PCR)进行 cDNA 扩增 每一样本取第 1 链 cDNA 80 μl,各加 30 μl 10×PCR 高级缓冲液,6 μl 50×dNTP (10 mmol/L),6 μl 5' PCR 引物 II A (12 mol/L),6 μl 50×高级多聚酶混合物,172 μl 去离子水,组成 300 μl 的反应体系。每一样本分 3 管标记为 A、B、C,各 100 μl 进行 PCR。PCR 反应条件 95 °C 1 min,95 °C 5 s,65 °C 15 s,68 °C 3 min,共 30 个循环。当每个反应管进行 15 个循环时,在 C 管取 30 μl 到另 1 个 0.2 ml 反应管(标记为优化),4 °C 保存 A、B 及 C 管中实验管余下的 70 μl。分别在 15、18、21、24、27、30 个循环取产物 tester 8 μl 与 driver 5 μl,用 1.2% 琼脂糖 -EB 凝胶,1×TAE 缓冲液,0.1 μg/l1 kb DNA,60 V 进行梯度电泳 1 h,以决定最佳的 PCR 循环数。取出 4 °C 储存的 15 个循环的实验 PCR 管,加额外的循环数。

1.4 PCR 产物纯化及定量

每一样本经过酚 - 氯仿 - 异戊醇(25:24:1)抽提液抽提,丁醇抽提使 PCR 产物浓缩为 40~70 μl。把 1 个 CHROMA SPIN-1000 柱颠倒几次,彻底打散凝胶。将纯化柱放入 1.5 ml 离心管,加 1.5 ml 1×TNE 缓冲液。让缓冲液在圆柱中依靠重力流动,直到在纯化柱中能够看到凝胶表面。小心将样本涂到平展的胶床表面,用 25 μl 1×TNE 缓冲液完全流出纯化柱,用 150 μl 1×TNE 缓冲液再次流出柱子。转移纯化柱到另 1 干净的 1.5 ml 离心管中,用 320 μl 1×TNE 缓冲液收集洗脱的纯化双链 cDNA 片段,各取 10 μl 进行分光光度仪测定。

2 结果

2.1 EOS 的分离与鉴定

经全自动全血细胞计数仪分析及 EOS 瑞士 - 姬姆染色(图 1),显微镜计数示,治疗前 EOS 为 3×10<sup>6</sup>

个,纯度为 99%;治疗后 EOS 总数 1×10<sup>6</sup> 个,纯度 99%;锥虫蓝活力鉴定均大于 99%。

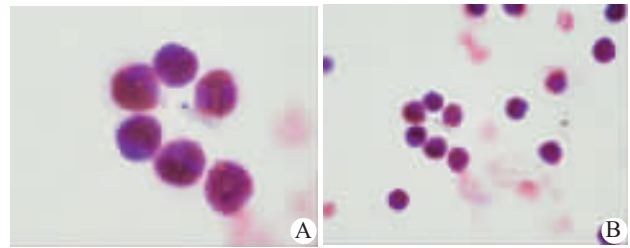


图 1 EOS 瑞氏 - 姬姆萨染色  
Fig.1 Wright-Giemsa staining of the eosinophils from asthma patients  
A: ×1000; B: ×400

2.2 EOS 总 RNA 提取结果

提取的总 RNA 在 28、18、5 S 有的 3 条亮带 (图 2),且 28 S 强度为 18 S 的 1.5 倍。说明所提取总 RNA 没有降解,提取完好。使用紫外分光光度计测定其浓度和 OD (260/280) 值,治疗前后分别为 30.5 μg/ml、1.827,15.8 μg/ml、1.850。

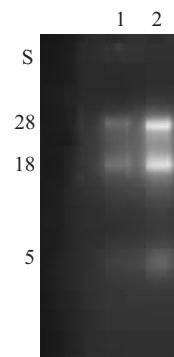


图 2 总 RNA 电泳图  
Fig.2 Electrophoretogram of the total RNA  
Lane 1: Total RNA of the driver; Lane 2: Total RNA of the tester

2.3 cDNA 扩增

20 ng 检测子与驱动子用来扩增第 1 链 cDNA,产物经 Nucleospin 提取试剂盒纯化,80 μl 用来进行 PCR 扩增,通过 15、18、21、24、27、30 不同循环数来决定用来扩增实验管最优循环数。tester 组在 27 个循环达平台期(图 3),driver 组在 30 个循环达平台期(图 4)。由此可判断用来扩增的最优循环数,tester 为 26 循环,driver 为 29 循环。从此实验可知,用 Super SMART cDNA 合成技术可大量扩增出所需的双链 DNA。

2.4 双链 cDNA 定量

PCR 产物经柱层析,应用分光光度仪测定,tester 及 driver 各获得双链 cDNA 7.155 和 6.568 μg。

3 讨论

支气管哮喘是最常见的慢性疾病之一,全世界约有 1.5 亿哮喘患者。在许多地区近 10~20 年来哮喘的患病率增高了 1 倍<sup>[6]</sup>,哮喘已成为严重的影响公众健

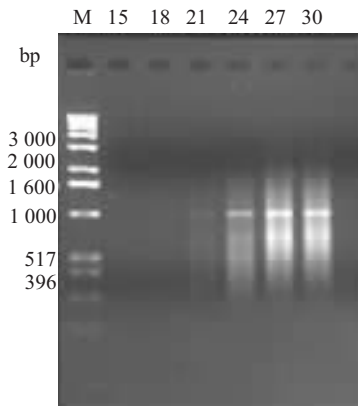


图 3 检测子第 2 链扩增

Fig.3 PCR amplification of the tester double-stranded cDNA

Lane M: 1 kb DNA ladder marker. The strong band at 1 000 bp is typically seen for human eosinophil total RNA

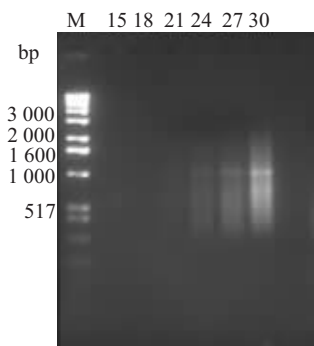


图 4 驱动子第 2 链扩增

Fig.4 PCR amplification of the driver double-stranded cDNA

康的疾病。人们对哮喘发病机制的研究也在不断地深入,尽管近年来对哮喘的基础研究已进入到了分子和细胞水平,但由于哮喘的病因涉及因素较多,而一些关键效应细胞如 EOS 的获得量又太少,均限制了其研究的深入。哮喘动物模型的血液或肺泡灌洗液里,所能获得的 EOS 就更少,这也限制了系统地基因水平对 EOS 参与哮喘机制的研究。本研究利用 Super SMART cDNA 合成技术可有效地从微量 EOS 总 RNA 中获得高质量的双链 cDNA,从而为进一步从基因水平探讨哮喘机制打下了基础。

所有普通的 cDNA 合成方法都依赖于逆转录酶在第 1 链反应中将 mRNA 逆转录成单链 cDNA 的能力。然而,由于逆转录往往不能转录全部的 mRNA 序列,在 cDNA 中基因的 5' 末端不能完全重现 mRNA 的序列。Super SMART cDNA 合成技术使用总 RNA 或 poly A+RNA 都可以,沿用标准的 SMART 技术<sup>[4]</sup>,改进的 Olig T(dT)引物指导第 1 链的合成反应,当逆转录到达 mRNA 的 5' 末端 (cDNA 第 1 链的 3' 端)时额外加上 3~5 个脱氧胞苷 (dC),从而利于第 2 链 LD-PCR<sup>[5]</sup>。Super SMART cDNA 合成技术提高了反应的体系,比 Standard SMART cDNA 合成技术的高出 10 倍,合成第 1 链后增加了纯化步骤,可以使整个纯化的单链 cDNA 用来扩增,提高了合成的敏感度。

目前从微量总 RNA 来合成 cDNA 方法并不多, Lukyanov 等<sup>[5]</sup>报道的使用抑制性 PCR 可以从 10~100 ng 的总 RNA 中合成高质量的 cDNA。Oh 等<sup>[7]</sup>利用改进的寡核苷酸帽状结构从 100 μg 的总 RNA 成功建成了全长 cDNA 文库。Reddy 等<sup>[8]</sup>用改进的 PCR 方法可从有限的组织中获得大量的高质量 cDNA,其原理也是基于 oligo-dT 引物及 T4 DNA 连接酶作用下在单链 cDNA 3' 末端连接上 1 个改良的寡核苷酸,从而在 cDNA 的两端产生已知序列,以利于全部 cDNA 的扩增。利用 Super SMART cDNA 合成技术来进行基因功能的研究尚不多,本实验即通过此技术从 20 ng 的 EOS 总 RNA 中成功地获得高质量及大量双链 cDNA,从而为下一步文库的构建及基因功能的研究打下了良好基础。

对于只有有限起始量的研究来说,通过激光所获得的样品 RNA、流式细胞仪获得的细胞样品及其他小样品尤其有用。这种从少量起始物合成 cDNA 的方法,在研究基因功能及转录调节上是非常有价值的,对从临床只可获得有限的样本来说更是有利的。

#### 参考文献:

- [1] 罗亮,罗雅玲,文岩. 火把花根片对哮喘豚鼠肺泡灌洗液白细胞介素 3 受体 mRNA 的表达及嗜酸性粒细胞浸润的影响[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(10): 1069-73.  
Luo L, Luo YL, Wen Y. Effects of *Huobahuagen* tablet on the expression of interleukin-3 receptor mRNA in asthmatic guinea pig bronchoalveolar lavage fluid and eosinophil infiltration[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(10): 1069-73.
- [2] 徐劲松,蔡绍曦,邹飞,等. 应用抑制消减杂交克隆支气管哮喘病人嗜酸性细胞差异表达基因[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(5): 509-12.  
Xu JS, Cai SX, Zou F, et al. Cloning of differentially expressed genes of eosinophils from asthmatic patients by suppression subtractive hybridization [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2004, 24(5):509-12.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗及教育和管理方案)[J]. 中华结核和呼吸杂志(Chin J Tuberc Respir Dis), 2003, 26(3): 132-8.
- [4] Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, et al. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction[J]. Biotechniques, 2001, 30(4): 892-7.
- [5] Lukyanov K, Diatchenko L, Chenchik A, et al. Construction of cDNA libraries from small amounts of total RNA using the suppression PCR effect[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 230(2): 285-8.
- [6] 杨昆,黄绍光. 支气管哮喘流行变化趋势分析[J]. 中华结核和呼吸杂志(Chin J Tuberc Respir Dis), 2001, 24(3): 181-3.
- [7] Oh JH, Kim YS, Kim NS. An improved method for constructing a full-length enriched cDNA library using small amounts of total RNA as a starting material[J]. Exp Mol Med, 2003, 35(6): 586-90.
- [8] Reddy MK, Nair S, Sopory SK. Global amplification of cDNA from limiting amounts of tissue, an improved method for gene cloning and analysis[J]. Mol Biotechnol, 2002, 22(3): 223-34.