

表 1 导入 SMTPGH 基因获得转基因小鼠结果

受体号	DNA 浓度 ng/ μ l	受 体	胚 期	移入胚数		产仔数	整合仔数
				左输卵管	右输卵管		
1	1.0	假 孕	原 核	15	14	8 ¹⁾	1
2	1.0	假 孕	原 核	9	0	0	—
			2-细胞	0	10		
3	1.0	发情小鼠注射 LH ²⁾	原 核	8	10	0	—
4	1.0	发情小鼠注射 LH ²⁾	原 核	12	9	0	—
5	1.0	假 孕	原 核	13	12	0	—
6	1.0	假 孕	原 核	16	16	5	0
7	1.0	假 孕	原 核	15	15	5	1
8	0.5	假 孕	原 核	11	12	0	—
总 计				197		18	2

妊娠率 37.5%(3/8) 出生率 9.1%(18/197) 整合率 11.1%(2/18)

1) 出生一天后,母鼠死亡

2) LH: 促黄体素

2 范必勤等. 中国养兔杂志, 1986; 1: 25

3 Erlich H A. PCR Technology. Stockton Press, 198

参 考 文 献

1 寇寇等. 生物工程学报, 1991; 7(2): 120

用磁性分离 RNA 直接进行逆转录 PCR

王 升 启 马 立 人

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

关键词 RT-PCR, 登革热病毒, 亲和素-磁性球

逆转录 PCR(RT-PCR) 技术是将提取的 RNA 先逆转录为 cDNA, 然后再对该 cDNA 进行 PCR 扩增。该技术不仅可用于各种内源及外源性正常及异常 RNA 的分析或检测, 而且还常用于 cDNA 文库的构建及特定基因的制备。RT-PCR 所用 RNA 模板一般是未经纯化的总 RNA, 若 RNA 模板含量较低便难以检出, 增加扩增次数虽然可以提高灵敏度但同时也增加了错误掺入的几率^[1], 最近建立的 RNA 磁性分离技术^[2] 解决了从大体积复杂材料中富集或分离特定 RNA 的问题, 在此基础上我们又发展了一种用磁性分离 RNA 直接进行 RT-PCR 的新技术, 该技术集 RNA 纯化、逆转录及 PCR 于一体, 不仅解决 RNA 模板

的富集问题而且操作简便——所有操作可在一个管内进行。

该技术包括以下三步关键操作:

a. 靶 RNA 的磁性分离^[2-3] 将 5'-生物素化的靶 RNA 特异寡核苷酸探针 (最好是待扩增片段的下游引物) 与总 RNA 中的靶 RNA 杂交并用链亲和素-磁性球 (SA-PMPs, Promega) 捕获该杂交体, 低盐缓冲液洗去未结合的非特异 RNA 等杂质即得亲和素-磁性球结合的靶 RNA。

b. 靶 RNA 的逆转录 以上述结合于亲和素磁性球上的靶 RNA 为模板并补加 PCR

收稿日期: 1992-01-31

修回日期: 1992-03-03

下游引物 0.2—0.5 μg , 用 Promega 公司逆转录试剂盒成分及其推荐的步骤进行逆转录即可得可供 PCR 的 cDNA 模板。

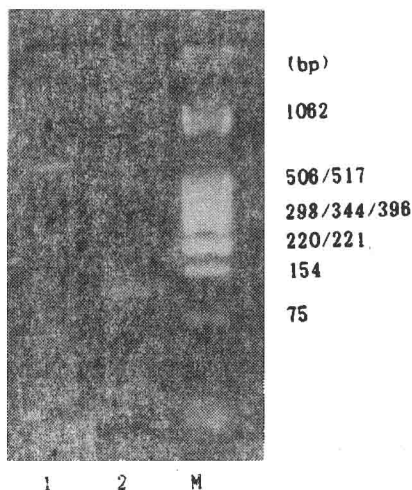


图 1 登革热病毒 RT-PCR 产物 2.5% 琼脂糖电泳图

M: 碱基对标准 (PBR322 *Hinf*I);

1: 3' 端非编码区 (525bp)

2: 5' 端非编码区 (111bp)

5' 端上游引物 (P1):

32nt (5'-AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACA-AAGACAG-3');

5' 端下游引物 (P2):

30nt (5'-TCGTTGGTTATTCATCAGAGATCTGCTCTC-3');

3' 端上游引物 (P3):

26nt (5'-AGGAATACACAGACTACATGCCATCC-3');

3' 端下游引物 (P4):

24nt (5'-AGAACCTGTTGATTCAACAGCACC-3')

c. PCR 向逆转录的 cDNA 模板中加入 PCR 上游引物及其它必需成分即可进行 PCR 扩增。

我们采用上述操作程序成功地扩增了登革热病毒 RNA 5' 及 3' 非编码区序列 (见图 1), 条件如下。

磁性分离: 总 RNA 50 μl (0.1mg); 亲和素-磁球 0.06ml; 探针 5'-生物素化两下游引物 (0.1 μg); 低盐缓冲液 $0.1 \times \text{SSC}$ 。

逆转录: 总体积 20 μl ; 25mmol/L MgCl_2 4 μl ; $10 \times \text{RT}$ 缓冲液 2 μl ; 10mmol/L dNTPs 2 μl ; rRNasin 0.5 μl (20U); AMV 逆转录酶 0.6 μl (15U); P2/P4 2 μl (0.4 μg); 无 RNase 水 8.9 μl ; 反应时间: 30 min (5' 端)/60 min (3' 端)。

PCR: 总体积 50 μl ; $10 \times \text{PCR}$ 缓冲液 5 μl ; 10mmol/L dNTPs 4 μl ; P1 (5' 端 111bp)/P3 (3' 端 525bp) 2 μl (0.4 μg); 模板 20 μl ; 无菌水 19 μl ; Tag 酶 1.5U。变性: 94 $^{\circ}\text{C}$, 30s; 退火及延伸: 68 $^{\circ}\text{C}$, 120s; 循环次数: 30 次。

参 考 文 献

- 1 Mcpherson M J *et al.* PCR. New York: Oxford University Press, 1991; 225
- 2 王升启, 马立人. 军事医学科学院院刊, 1992; 16(1): 80
- 3 Promega. Promega Notes, 1990; 25: 1

《生物化学与生物物理进展》编委会名单

主 编 林治焕

副主编 马万禄 王大成 王贵海

编 委 马万禄* 王大成* 王会信 王贵海* 申同健 李 钦 曲善乐
朱以桂 朱立煌 刘望夷 寿天德 杨进生 陈 燕* 陈润生*
范培昌 林波海 林治焕* 周爱儒 袁士龙* 郭爱克 倪逸声
徐建兴* 高吉寅 曹恩华 强伯勤

(以上均以姓氏笔划为序, 带*者为常务编委)

顾 问 贝时璋 邹承鲁 张龙翔 沈淑敏 梁栋材 杨福愉