

斑点显色增强,检测敏感性提高。加入 5% 硫酸葡聚糖即可使检测敏感性由 1pg 提高到 0.25pg;当其浓度继续提高到 10%,斑点显色进一步加深,但此时背景也明显增加。

3 讨 论

DNA 探针的杂交条件涉及的因素较多,而各种文献所列杂交条件不甚一致,为此我们用化学方法制备了生物素标记的 DNA 探针,并就各种杂交条件对检测结果影响作了较系统探讨。

关于杂交时间。杂交所需时间显然与探针浓度、杂交温度等因素有关。本文结果表明,当探针浓度为 0.5 μ g/ml,杂交反应在 42 $^{\circ}$ C 进行 10h 尚不完全,进一步延长杂交时间则可使检测敏感性得以提高。因此可认为,在不提高探针浓度的情况下,只要条件允许,应使杂交时间保证在 16h 以上。

关于探针浓度。马大龙等所用生物素标记探针浓度为 1ng/ml^[4],Reisfeld 等报道则为 0.5 μ g/ml^[5],两相比较,相差达 500 倍。从本文结果看,当杂交时间为 16h,0.1 μ g/ml 的生物素探针已基本可使杂交反应进行完全,进一步提高探针浓度仅略增强显色信号,而未能明显提高检测敏感性,反使背景增加。因此我们认为,杂交时可将其探针浓度控制在 0.1—0.2 μ g/ml 之间。

Denhardt 的作用是封闭 NC 膜上与探针非特异

结合部位。关于其浓度,报道中多有为 5 $\times$ Denhardt,但也有用 1 $\times$ Denhardt^[5], 2 $\times$ Denhardt^[6,7],甚至 10 $\times$ Denhardt^[2]。从本文结果看,即使杂交液中不含 Denhardt,探针的特异性也基本不受影响,NC 膜的背景也仍较清晰,这可能是经过预杂交,NC 膜上非特异结合部位已基本被封闭之故,加入一定量的 Denhardt,则可进一步降低背景,为此我们在实验中将其 Denhardt 浓度定为 2 $\times$ Denhardt。

本文结果表明,在杂交液中加入一定量硫酸葡聚糖即可使检测敏感性进一步提高。加入 5% 硫酸葡聚糖即可使检测敏感性从 1pg 提高至 0.25pg。但过高浓度的硫酸葡聚糖将使背景明显增加。因此杂交时可根据检测需要控制其在杂交液中的一定含量。

可以认为,以上实验结果不但对生物素标记探针,而且对其它非同位素探针和同位素探针杂交条件的选择和控制也有一定参考意义。

注:上述各项实验,曾重复一次,结果基本类似。

参 考 文 献

- 1 刘钟瑛,杨贵贞. 医学与哲学, 1991;3: 10
- 2 Viscidi R P et al. *J Clin Microbiol*, 1986;23:311
- 3 刘钟瑛,杨贵贞. 中国免疫学杂志, 1990;6(4): 244
- 4 马大龙等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1987;7(2): 77
- 5 Reisfeld A et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987; 142(2): 519
- 6 张鹤龄等. 病毒学报, 1989;5(1): 72
- 7 Keller G H et al. *Anal Biochem*, 1989; 177:392

一种快速微量的双温 PCR 法

阎小君 苏成芝 吉昌华

(第四军医大学生化教研室,西安 710032)

关键词 三温 PCR, 双温 PCR, DNA 扩增

PCR 技术能特异、直接和高效的扩增各种对象的基因。本文建立了一种快速、微量的双温度点法 PCR,并探讨了该 PCR 法的最适条件。旨在使 PCR 技术常规化。

1 PCR 方法

PCR 特异引物为 HIV-1Pr₁ 和 HIV-1Pr₂, 模板为 pARV-2/7A 质粒(内含 HIV-1 全长 cDNA)。反应总体积分别为 10, 20, 50, 100 μ l, 其中主要含有 HIV-1Pr₁ 和 HIV-1Pr₂ 各 50pmol/L, dNTP 为 200

μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 10 和 20 μ l 反应体积加 1U, 50 和 100 μ l 反应体积中加 2U; 模板 DNA 50—500ng; 加适量的反应缓冲液和双蒸水。煮沸 3—5 min, 加酶后进入循环。三温度点 PCR (简称 3tPCR) 反应条件为: 72 $^{\circ}$ C, 80s, 91 $^{\circ}$ C, 40s, 55 $^{\circ}$ C, 60s, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min; 双温度点 PCR (简称 2tPCR) 是将延伸与退火温度合并(退延温度), 故反应管只在退延及变性两个温度点下进行, 具体条件见下文。

2 结 果

PCR 循环结束后取 $10\mu\text{l}$ 反应液走 1.7% 琼脂糖凝胶电泳, 结果如下

图 1 说明在 93°C , 20s, 60°C 40s 的条件下, 2tPCR 扩增产物的特异性较 3tPCR 好, 但扩增产物的量却稍小。图 2 说明在 93°C , 20s, 63°C , 40s, 20ng 模板, 2U 酶和采用 $100\mu\text{l}$ 反应体积的条件下, PCR 在第 25 循环时, 扩增产物即可用肉眼观察, 而在第 35 个循环时扩增最好。从图 3 可见, 在 93°C , 20s 的变性条件下, 63°C 退延 10s 已有扩增 (图 3a); 40s 时扩增效果最好 (图 3c); 在 63°C , 40s 的退延条件下, 93°C 变性 20s (图 3e) 扩增效果最好, 93°C 变性 40s (图 3f) 和 10s (图 3d) 扩增结果相近。说明 PCR 的变性时

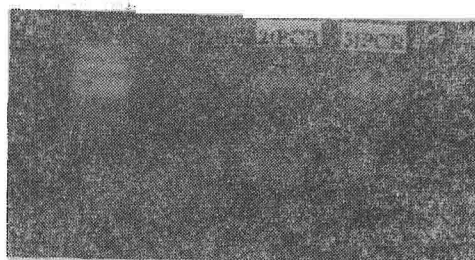


图 1 双温 PCR 的特异性和敏感性

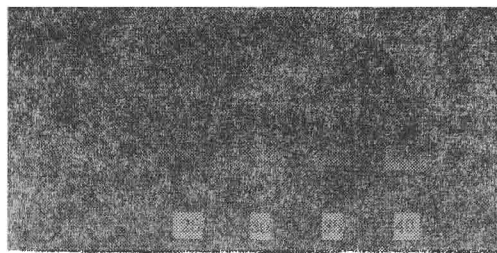


图 2 双温 PCR 的最小和最佳循环次数

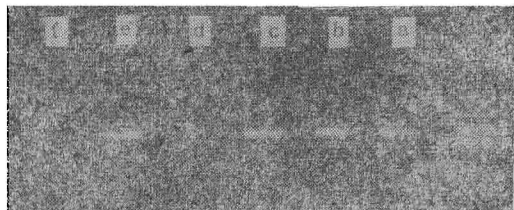


图 3 双温 PCR 的最佳和最短变性与退延时间

间不宜过长。图 4 显示不同退延温度对扩增的影响。结果说明, 在 $63-65^{\circ}\text{C}$ 退延时扩增效果好, 低于 61°C 易出现非特异性扩增, 高于 65°C 则易发生扩增失败现象。图 5 为不同反应体积对扩增的影响。结果表明, 微量反应体积 $10-20\mu\text{l}$ 是可行的。图 6 结果表明在 93°C , 20s, 63°C , 40s 循环 35 个周期后, (反应体积为 $20\mu\text{l}$), 用 0.1U 的 Taq 酶便能扩增出肉眼可见的带, 0.5U 的扩增效果亦相当明显。

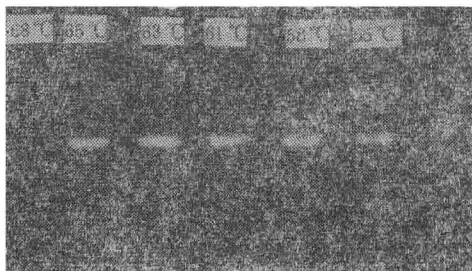


图 4 双温 PCR 的最佳退延温度及其范围

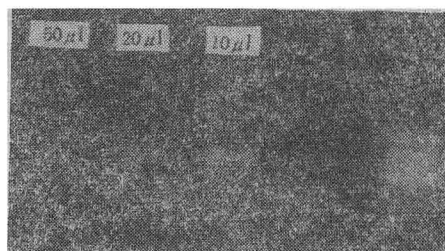


图 5 双温 PCR 的最小及最佳反应体积

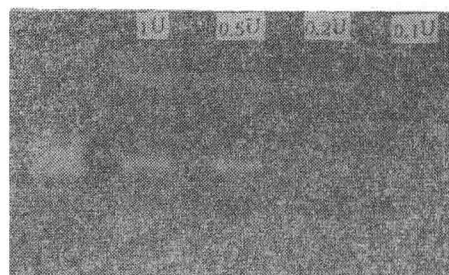


图 6 双温 PCR 的最小和最佳酶用量

本文报道的结果虽为扩增质粒 DNA, 但我们已使用该法成功地对 HCV (丙肝病毒), HBV (乙肝病毒) 作了扩增, 并已被许多单位所采用。