



图 2 红细胞溶血液 CuZn-SOD 等电聚焦酶谱
邻联[二]茴香胺染色

除选择适当的乙醇浓度外,在染色过程中还应注意: a. 染色液需新鲜配制,染色时不宜剧烈震荡。b. 染色后的胶板浸入水中至少过夜,以洗去背景的淡黄

色,提高对比度。c. 不宜用含乙醇、醋酸的保存液处理,否则酶带褪色。

总之,邻联[二]茴香胺染色法与负染法相比具有操作简便、试剂价格相对低廉、染色结果直观、便于扫描定量等优点,它弥补了负染法之不足,可满足 SOD 基础及应用研究中的多方面需要。

参 考 文 献

- 1 Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 1971; 44:276
- 2 Misra H P, Fridovich I. Superoxide dismutase and peroxidase: a positive activity stain applicable to polyacrylamide gel electropherograms. *Arch Biochem Biophys*, 1977; 183:511
- 3 Arai K, Lizuka S, Makita A *et al.* Purification of CuZn-superoxide dismutase from human erythrocytes by immunoaffinity chromatography. *J Immun Met*, 1986; 91:139
- 4 Anon. *Instruction manual of LKB 2117 multiphor electrophoresis system*. Sweden, 1986: 27—56

关于提高 PCR 产物克隆效率的一些问题

王 志 珍

(Department of Anatomy and Cell Biology, University of
Alberta, Edmonton, Canada T6G 2H7)

关键词 聚合酶链反应 (PCR), PCR 产物克隆

近年来,由于聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, 简称 PCR) 技术的飞快发展,用 PCR 产物进行克隆也越来越广泛地用于分子生物学的各个领域。PCR 的原理决定了它的产物不具有粘性末端,因此只能进行平整末端连接的克隆。一般说来,平整末端的连接的效率总是不高的,特别是 PCR 产物的末端连接效率更低。这可能是因为 PCR 产物实际上常常是不均一的,具有参差不齐的末端。虽然可以用 DNA 多聚酶的 Klenow 片段在一定程度上做末端修补,但并不能在根本上提高克隆效率。现在更多采用的是在 PCR 引物的 5' 末端加上限制性内切酶的识别顺序,这样得到的 PCR 产物经这些酶处理便可获得黏性末端,利用粘性末端的连接,克隆到有相应末端的载体中去,应该可以大大提高克隆效率。虽然这种设计在理论上是十分合理的,可是在实践中,许多实验室

还是遇到种种困难^[1],常常不能得到成功^[2],至今它还没有被证明是一种可以顺利进行的成熟技术^[3]。笔者在自己的实践中,考虑到以上情况,并根据一般经验,加大限制性内切酶用量,希望得到较完全的粘性末端,但和许多实验室一样也未能得到满意结果。用自连接来检查粘性末端的质量,发现自连接形成的二体,一般只占总产物的 50—60% (未发表结果)。

制备满意的 PCR 产物的粘性末端不是很容易的,这已是一个公认的事实。这里对提高 PCR 产物克隆效率提出一些建议供读者参考。(1) 因为许多限制性内切酶对处在 DNA 片段末端的识别序列的作用效率远较处于内部的序列为低。譬如 HindIII, SmaI, SalI 以及 XbaI 这些常用的限制性内切酶都不能作用于处在 DNA 分子末端的特异位点。不同的酶对位于它们的识别序列以外的碱基对的最低长度要求不同^[4-6],

这样在设计 PCR 引物时,对限制性内切酶的选择就要十分小心;在识别位点前要添加足够长度的额外核苷酸,最好富有 CG,但又要避免形成二级结构,以此来提高酶切效率。(2)在制备载体相应的不同粘性末端时,即使二个酶所用的缓冲液等条件是相同的,最好也不要同时用二个酶进行酶切,除非这两个切点相距很远,不会在相近的二个切点上相互干扰。较为小心的做法是,在第一个酶作用完全后,先用酚-氯仿把酶除去,或用 Glass milk (一种极细的二氧化硅粉末悬浮液,在高盐浓度下能吸附 DNA,低盐浓度时释放)分离 DNA,再进行第二个酶的处理。此外还要考虑这二个酶的酶解次序。如果要制备 BamHI 和 Sma I 二个末端时,一般先用 Sma I,再用 BamHI,相反的次序则会造成酶切不完全^[3]。同时用 T4 多核苷酸激酶和连接酶一步处理,即在 PCR 产物 5' 端磷酸化后进行自连接形成多聚物,再做酶解来克服酶切点接近于分子末端而引起的困难,但第一步平整末端连接还是一个限制因素^[5]。

根据近二年出现的一种完全新的思路来克服 PCR 产物克隆的困难,即所谓“T 载体”^[13]、“双脱氧 T 尾端载体”^[14]和“TA 克隆药盒”^[15],这些载体的设计是根据用于 PCR 的 DNA 聚合酶(例如 Taq)的一种特殊性质^[16,17],DNA 聚合酶是有机体进行 DNA 复制过程中一个十分关键的酶,自 1958 年发现后一直被认爲极其严格地催化以 DNA 为模板的,在引物上按碱基配对原则进行核苷酸链的合成。直到 1987 年 Clark 等^[10]宣称他们发现 *E. Coli* 的 DNA 聚合酶 I 还具有一种新的催化性质,即不依赖模板信息的在 DNA 分子 3' 平整末端上加上一个或几个核苷酸的活力。1988 年他们进一步报道了许多原核细胞和真核细胞的 DNA 聚合酶都具有这种非模板指导的在双股 DNA 分子的 3' 平整末端的一 OH 基加一个或几个脱氧核苷酸(主要是一个 A)的活力^[11]。这也许是 PCR 产物用平整末端连接进行克隆不甚成功的主要原因。针对 PCR 产物的这个特点,可以设计一个平整末端的载体,在其 3' 端加上一个 T,这样任何 PCR 产物,不必有特定的内切酶位点,都可以利用 TA 配对而直接克隆到这种 T 载体中去。可以用 Holten 方法^[11]自己制备这种载体,即用 ECoRV 得到平整末端,然而用平整末端转移酶和双脱氧三磷酸胸腺嘧啶核苷(dideoxythymidine triphosphate, ddTTP)在 5' 端只加上一个双脱氧胸腺嘧啶核苷酸(ddT)。也可用 Merchuk 方法^[12],在一定的控制条件下,用 Taq 聚合酶与 ddTTP 在 3' 端加上一个 ddT。美国的 Invitrogen 公司现在已经有二代商品“TA 克隆药盒”——“PCR-1000”和“PCR-2001”,这样 PCR 产物不必经过纯化,修补和

酶切等处理就可直接克隆到这些通用的载体内,其效率要比平整末端连接高 50—100 倍,通常 100 μl 的 PCR 反应系统只要 1 μl 做克隆即够。在某些情况下,PCR 引物中不必加入限制性内切酶的识别序列和额外核苷酸,不仅降低合成成本,还可避免限制性内切酶所引起的克隆的困难。对于未知序列的插入片段,也不必顾虑它具有外加酶切点的危险。从 T 载体中得到的 PCR 片段比起 PCR 产物的酶切片段要均一得多,克隆效率也高得多(作者未发表结果)。此外,还有其他一些改进 PCR 产物克隆效率的方法^[11]也值得注意。最近 Buchman 等^[12]的文章表明这个问题仍然没有得到满意的解决,仍然是一些公司努力的目标。

参 考 文 献

- Holten TA, Graham M W. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucl Acids Res*, 1991; 19:1156
- Shuldiner A R, Scott L A, Roth J. PCR-induced (ligase free) subcloning: a rapid reliable method to subclone polymerase chain reaction (PCR) products. *Nucl Acids Res*, 1990; 18: 1920
- Marchuk D, Drumm M, Saulino A *et al.* Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucl Acids Res*, 1991; 19: 1154
- Grouse J, Amorese D. *Focus*, 1986; 8:9
- Kaufman D L, Evans G A. *BioTechniques*. 1990; 9:304
- Frederick M *et al* eds, *Current protocols in molecular biology*, Vol.1. Wiley-Interscience. 1991
- Mead D H, Pey N K, Herrnstadt C *et al.* A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *BioTechnology*, 1991; 9: 657
- Clark J M. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucl Acids Res*, 1988; 16:9677
- Mole SE, Iggo RD, Lane DP. Using the polymerase chain reaction to modify expression plasmids for epitope mapping. *Nucl Acids Res*, 1989; 17: 3319
- Clark J M, Joyce CM, Bearrdsley G P. Novel blunt-end addition reactions catalyzed by DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 1987; 198: 123
- Aslanidis C, Jong PJ de. Ligation-independent cloning of PCR products. *Nucl Acids Res*, 1990; 18:6069
- Buchman G W, Schuster D M, Rashchian A. Rapid and efficient cloning of PCR products using the CloneAMP system. *Focus*, 1992; 14:41