

Photobiochem Photobiophys, 1984, 8 (1): 1~ 10

- 3 Wu B G, Zang R B. Chlorophyll fluorescence ratio F685/F735 in brown algae and its variation under excitation by two types of light and dehydration. Chin J Oceanol Limnol, 1993, 11 (1): 1~ 7

Preparation of Chloroplasts from Brown Algae. LI Ai-Fen, CHEN Min (*Department of Biochemistry, Yantai University, Yantai 264005, China*); ZHOU Ba-Cheng (*Experimental Marine Biology Laboratory, Oceanology Institute, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China*).

Abstract Thalli from a brown alga *Undaria pinnatifida* were soaked by CaCl_2 solution with different concentration and time at 4 °C, the effect of CaCl_2 solution on efficiency and fluorescence

emission spectra of chloroplasts were examined. The results show that the efficiency of collected chloroplasts is increased markedly after soaking in CaCl_2 solution. According to the results of collected efficiency and characteristic of fluorescence emission spectra at room temperature of chloroplasts, it was suggested that soaking in the 0.2 mol/L CaCl_2 solution for 10 min is optimum. Under this condition, the efficiency of collected chloroplasts is as 5 fold as control group, and the characteristics of chloroplasts obtained by CaCl_2 soaking are similar to that of traditional method.

Key words brown algae, chloroplasts, collected efficiency, fluorescence emission spectra

一种检测细胞微量点突变的方法* ——等位基因特异的 PCR

殷文璇 刘德培¹⁾ 李竹红 梁植权

(中国医学科学院基础医学研究所 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)
(中国协和医科大学基础医学院)

摘要 为了灵敏、方便地检测出细胞群体中含量极低的点突变, 利用一 β 珠蛋白基因簇 G γ -202 C $\rightarrow$ G 突变的杂合细胞株, 优化传统的等位基因特异 PCR 的反应条件, 以定量的 PCR 产物为模板, 在含 5% 甲酰胺的体系中使用半巢式的等位基因特异引物进行扩增. 结果表明, 该方法灵敏可靠, 可快速检测到细胞群体中低于 0.025% 的点突变.

关键词 等位基因, PCR, 点突变

学科分类号 Q7

等位基因特异 PCR (allele specific PCR, AS-PCR), 又称做 3' 碱基特异 PCR 或扩增阻滞突变体系 (amplification refractory mutation system), 是近几年发展起来的检测突变体的 PCR 技术之一^[1]. 其原理是: 当引物 3' 端与模板互补时, PCR 反应中的延伸作用能从 3' 端延伸下去; 反之, 则不能进行. 如果基因的某一特定位置点发生点突变, 则可用突变序列设计引物, 扩增出突变片段. 故用此方法能够检测正常和异常等位基因或 DNA 片段, 确定纯合子或杂合子, 进行群体分析以及基因表达的限定模式 (imprinting) 的研究^[2,3].

利用 AS-PCR 技术检测点突变时, 由于扩增序列与野生型序列之间仅有一个碱基的差异, 因此优化 PCR 反应条件, 提高反应的特异性是实验成功

的关键. 本文利用野生型 CMK 细胞系以及该系的一株含点突变的杂合子为材料, 在两次第一轮 PCR 扩增的基础上, 进行半巢式 AS-PCR, 并在反应体系中加入 5% 的甲酰胺以减少非特异性扩增的同时, 减少引物、dNTPs 及 Taq 酶的用量. 结果表明, 在这种优化的反应条件下, 可检测出样品中含量极微的点突变 (突变模板占野生型模板量的 0.025%), 表明该方法可应用于检测细胞群体中微量的点突变.

* 国家“863”计划 (BH-03-02-02) 基金资助项目.

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (010) 65296426, E-mail: liudp@public.east.cn.net

收稿日期: 1999-10-15, 修回日期: 2000-02-21

1 材料与方法

1.1 细胞系与细胞培养

CMK 细胞系为人巨核细胞系, 其中 D3 细胞株为 β 珠蛋白基因簇 $G\gamma$ 基因-202 C $\rightarrow$ G 点突变的杂合子. 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养细胞, 每 3 天传代 1 次.

1.2 微量基因组 DNA 的提取

离心 (2 000 r/min, 5 min) 收集 1 ml 悬浮培养的细胞 (8×10^5), 用预冷的 PBS 清洗 2 次, 加入 500 μ l DNA 抽提缓冲液 [10 mmol/L Tris·HCl (pH 8.0), 0.1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 20 mg/L 胰 RNA 酶, 0.5% SDS], 混匀后加入 5 μ l 10 mg/L 蛋白酶 K, 50℃ 消化 3 h, 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 基因组 DNA 溶于 20 μ l 水中.

1.3 第一轮 PCR 扩增、纯化及产物定量

在 25 μ l 体系中加入 30 mmol/L 引物 P1、P2 (P1: 5' GCACTGAACTGTTGCTTTATAGGAT 3'; P2: 5' GCGTCTGGACTAGGAGCTTATTG 3') 各 0.5 μ l, 基因组 DNA 模板 1 μ g, 扩增条件为 94℃ 40 s, 57℃ 40 s, 72℃ 40 s, 28 个循环. 取 2 μ l PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后, 切下含扩增条带的胶条, 加入 1 ml 双蒸水, 煮沸 3 min 后取 1 μ l 为模板, 其他条件不变重复第一轮扩增. 产物经 Hoefer TKO-100 微型荧光计 (HSI, S. F, USA) 定量, 并用双蒸水稀释成终浓度 50 μ g/L. 按杂合子中含 50% 的突变模板计算, 用野生型 PCR 产物稀释杂合突变模板, 使突变模板的含量最终达 1%、0.25%、0.025%.

1.4 半巢式 AS-PCR

第一轮 PCR 的上游引物 P1 与等位基因特异的 PCR 引物 P3 (P3: 5' GAGATAGTGTGGGA-AGGC 3') 组成半巢式 PCR 引物. 在 40 μ l 体系中, 含 150 pmol/L 的引物 P1、P3, 2.5 mmol/L 的 dNTPs 2 μ l, 0.4 U 的 Taq 酶, 2 μ l 上述稀释的模板 (100 pg). 扩增条件为 94℃ 40 s, 58℃ 40 s, 72℃ 40 s, 27 个循环. 扩增产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析.

2 结果与讨论

2.1 第一轮 PCR

分别收集培养的野生型 CMK 细胞及 D3 细胞, 提取基因组 DNA 作为第一轮 PCR 反应的模板. 引

物 P1、P2 分别位于 $G\gamma$ 基因两侧 (P1: - 623~ - 598, P2: + 56~ + 30)^[4], 第一轮 PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后结果为一条 650 bp 左右的条带, 与预期结果相符 (图 1). 将此带所在的胶条挖出, 煮沸后同样条件再次扩增. 两次扩增的目的主要是消除进行 PCR 产物定量时, 基因组 DNA 的干扰.

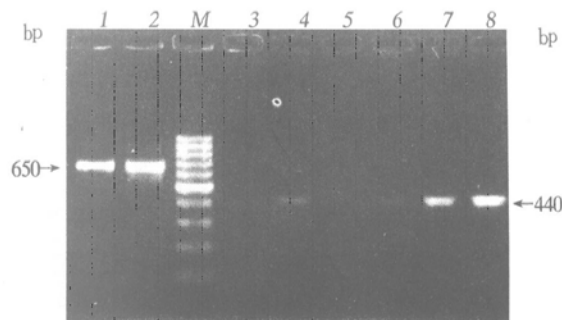


图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

M: 100 bp DNA ladder. 第一轮 PCR 结果: 1: 野生型 CMK 细胞; 2: D3 细胞. AS-PCR 结果: 3: 空白对照; 4: 未加甲酰胺的野生型 CMK 对照; 5: 野生型 CMK 对照; 6~8: 突变模板量依次为 0.025%、0.25%、1%.

2.2 半巢式 AS-PCR

根据 $G\gamma$ -202 C $\rightarrow$ G 点突变, 设计了一条等位基因特异的 PCR 引物 P3, 与第一轮 PCR 上游引物 P1 构成了一对半巢式 AS-PCR 引物. 分别将含突变模板量 1%、0.25%、0.025% 的第一轮 PCR 产物做模板, 进行 AS-PCR 分析. 结果如图 1 所示, 含上述三种模板比例的样品均在 440 bp 处扩增出特异条带, 而不含突变模板的对照, 没有任何条带扩增出来. 说明在 PCR 反应体系中加入 5% 的甲酰胺, 并降低 Taq 酶及 dNTPs 的使用量, 可明显提高 PCR 反应的特异性和灵敏性.

2.3 讨论

本实验采用半巢式及 AS-PCR 相结合的方法, 控制 PCR 反应体系中各成分的含量, 并加入甲酰胺以减少非特异性扩增, 效果显著, 使含量极微的突变模板得以特异性扩增.

利用 RNA/DNA 嵌合体修复术进行哺乳动物细胞基因组定点突变, 是一项新兴的基因治疗策略, 但对于不同细胞的突变效率存在着显著差异^[5]. 据 Yoon 小组报道, 在 HeLa 细胞中可检测到 5% 的定点突变, 而另外两种上皮细胞: HaCaT 细胞及原代培养的角质细胞, 却因突变效率低于 1%, 无法运用常规的检测方法 (如 RFLP 分析等)

检测到^[6]。该小组又利用一株因酪氨酸合成酶基因发生点突变而呈现白化表型的上皮细胞系, 进行定点纠正, 结果被纠正的细胞出现黑色的表型变化^[7]。但对于绝大多数无表型特征的基因定点纠正而言, AS-PCR 无疑是一种快速、便捷的检测手段。本实验室已成功运用此方法检测到效率极低的寡核苷酸定位点突变。

参 考 文 献

- 1 Bottema C, Sommer S. PCR amplification of specific alleles: rapid detection of known mutations and polymorphisms. *Mut Res*, 1993, **288** (1): 93~ 102
- 2 Hessner M, Luhm R, Pearson S, *et al.* Prevalence of prothrombin G2021A, factor V G1691A (Leiden), and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T in seven different populations determined by multiplex allele-specific PCR. *Thromb Haemost*, 1999, **81** (5): 733~ 738
- 3 Yun K, Soejima H, Arend E H, *et al.* Analysis of IGF2 gene imprinting in breast and colorectal cancer by allele specific PCR. *J Pathol*, 1999, **187** (5): 518~ 522
- 4 Stoming T A, Stoming G S, Lanclos K D, *et al.* An $\Delta\gamma$ type of nondeletional hereditary persistence of fetal hemoglobin with a T $\rightarrow$ C mutation at position - 175 to the cap site of the $\Delta\gamma$ globin gene. *Blood*, 1989, **73** (1): 329~ 333
- 5 Gura T. Repairing the genome's spelling mistakes. *Science*, 1999, **285** (5426): 316~ 318
- 6 Santana E, Peritz A, Iyer S, *et al.* Different frequency of gene targeting events by the RNA-DNA oligonucleotide among epithelial

cells. *J Invest Dermatol*, 1998, **111** (6): 1172~ 1177

- 7 Alexeev V, Yoon K. Stable and inheritable changes in genotype and phenotype of albino melanocytes induced by an RNA-DNA oligonucleotide. *Nat Biotechnol*, 1998, **16** (13): 1343~ 1346

Allele Specific PCR: A Useful Method for Detecting Trace Amounts Point Mutation in Mammalian Cell Pool. YIN Wen Xuan, LIU De Pei, LI Zhu Hong, LIANG Zhi Quan (LIANG Chi Chuan) (National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China).

Abstract To detect trace amount of DNA point mutation in mammalian cell pool, a semi-nest allele specific PCR was optimized by adding 5% formamide and decreasing all the components' amount of the polymerase chain reaction to eliminate the nonspecific amplification. This modification was so effective and highly specific that it can be used to detect the point mutation which is lower than 0.025% in mammalian cell pool.

Key words allele gene, PCR, point mutation

低温诱导唐古特红景天细胞分泌抗冻蛋白^{*}

卢存福

(北京林业大学生物学院森林生物学实验中心, 北京 100083)

简令成 匡廷云

(中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要 选择青海高原海拔 4000m 高山上生长的唐古特红景天为实验材料, 以叶片为外植体, 在 MS+ BA₂+ NAA_{0.2} 固体培养基上诱导出黄绿色、松脆愈伤组织。愈伤组织细胞在同样成分的液体培养基中培养获得成功。在悬浮培养液中可检测到分泌蛋白的存在。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明, 低温锻炼或脱落酸 (ABA) 诱导后, 细胞分泌蛋白的多肽谱带数增加。与此相对应的是, 细胞的抗冻能力也明显提高。PAS 染色揭示多肽中均含糖基。通过测定热滞值, 确信细胞分泌蛋白是具有抗冻活性的糖蛋白。

关键词 高山植物、唐古特红景天、悬浮培养细胞、抗冻蛋白

学科分类号 Q71

抗冻蛋白 (AFP) 最初是从极区海鱼中发现的一种适应低温的特异蛋白质, 它能阻止体内冰核的形成与生长, 维持体内的非冰冻状态^[1]。受动物抗冻蛋白 (AFP) 研究的启发, 1992 年加拿大 Griffith 等^[2]首先在冬黑麦中发现了植物 AFP。这一发现给人们许多启示, 即通过从植物中筛选活性

高的 AFP, 克隆、筛选抗冻基因, 从而有可能通过基因工程手段提高冷敏感植物的抗冻性。

^{*} 国家自然科学基金 (39800118) 和霍英东青年教师基金 (71030) 资助项目。

Tel: (010) 62338346, E-mail: lucunfu@beilin.bjfu.edu.cn

收稿日期: 1999-10-21, 修回日期: 2000-04-20