

经验交流

应用二次 PCR 技术提高体外基因扩增的效率*

余伍忠 周常文 郝小军 魏 静 李厚钧

(兰州军区乌鲁木齐总医院医学遗传研究室, 乌鲁木齐 830000)

关键词 聚合酶链反应, 人 β 珠蛋白基因, 基因扩增

自从 1985 年 Kary Mullis 等^[1]创立 PCR 技术以来, 作为一种基因研究的新方法已经在许多领域内得到广泛应用。PCR 方法简便、快速、灵敏、特异, 但实验易受诸多因素的影响^[2,3], 可以造成非特异性扩增产物或扩增产物的产量不足等现象, 使实验达不到预期的结果。为此, 我们建立了 PCR 二次扩增方法, 弥补了第一次扩增时出现的缺陷, 提高了扩增效率。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 琼脂糖 (Pharmacia 公司); Taq DNA 聚合酶 (Perkin-Elmer Cetus 公司); dNTPs (Pharmacia 公司); 引物 (上海医学遗传研究所合成), 其序列见表 1。

表 1 引物序列

引 物	序列 5' - 3'	特异扩增 片段长度
Pco3	ACACAACGTGTCTACTAGC	110 bp
Pco4	CAACTTCATCCACGTTCCACC	
Pco5	GTACGGCTGT- CATCACTTAGACCTCA	
Pco6	TGCAGCTTGT- CACAGTGCAGCTCACT	601 bp

1.1.2 仪器 DNA 扩增仪 (上海复旦实验技术研究所); 微量电泳仪 (BIO-RAD 公司)。

1.2 方法

模板 DNA 制备采用 Zeng 等^[4]方法。一次扩增参照 Saiki 等^[5]方法进行。

二次扩增方法: 先配制 50 μ l 反应液, 包含引物各 100pmol/L, dNTPs 各 0.2mmol/L, Tris · HCl (pH8.3) 10mmol/L, MgCl₂ 2.5mmol/L, KCl

50mmol/L, 加入适量第一次扩增的产物 (第一次扩增后产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 从凝胶中挖取相应区带, 溶解琼脂, 用正丁醇抽提去除琼脂中的溴化乙锭), 或者直接加入适量第一次扩增后的产物液; 用 Eppendorf 离心机离心 7s, 放置沸水浴 7min, 再加入 Taq DNA 聚合酶 2 单位, 以液体石蜡油覆盖液面。扩增程序设置为: 退火 45℃, 30s; 延伸 63℃, 90s; 变性 93℃, 30s; 循环 30 次扩增后的产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳分析鉴定。

2 结果和讨论

应用一次和二次 PCR 方法, 分别扩增了人 β 珠蛋白基因第 1 个外显子上游 40 位碱基 (-40) 到第 70 位碱基共 110bp 序列和第 1 个外显子上游 129 位碱基 (-129) 到第 2 个外显子 97 位碱基共 601bp 序列。扩增后的产物, 通过电泳分析显示, 一次扩增和二次扩增产物中均有相应的特定 DNA 片段 (图 1), 但一次扩增产物中, 包含有非特异性扩增成分, 产物的产率也较低 (图 1 B, C, E, F)。经过二次扩增后, 其产物在电泳的特定位置呈现一条单一、整齐的特异 DNA 带, 且背景清晰, 产物的产率明显提高 (图 1)。通常经过 25-35 次扩增后, 可使目的基因片段特异性地扩增一百多万倍以上。

应用一次扩增法, 除需严格控制各个反应条件外, 还应特别防止非靶序列 DNA 的污染^[2]。虽然 PCR 实验的操作步骤并不复杂, 但影响因素甚多, 如模板 DNA 纯度, 引物和模板 DNA 的比值, dNTPs 与 MgCl₂ 等反应体系条件, 以及设计程序等因素常可造成电泳结果拖带, 出现非特异性扩增产物, 形成引物模板二聚体或

* 本课题由总后卫生部科研基金资助。

收稿日期: 1991-03-02 修回日期: 1992-07-08

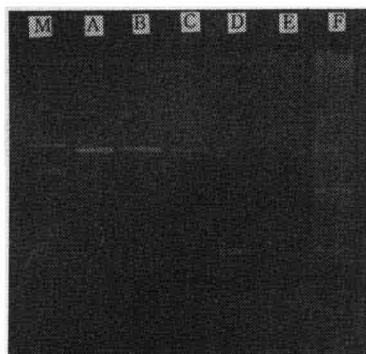


图1 PCR产物电泳结果

A, B, C为601bp片段; D, E, F为110bp片段.
电泳时各样品加样量均为10 μ l; B, C, E, F为第一次扩增结果; A, D为二次扩增结果; M为DNA片段大小标志, 系PGEM 7zf (+) Hae III片段

扩增后特异靶序列的产率低等现象, 从而不能满足进行基因分析的需要. 所以, 当前国内许多实验室因受反应条件和各种因素的影响, 不易获得满意结果. 采用二

次PCR技术后, 能有效地消除以上缺点, 弥补第一次扩增实验中的某些不足, 从而使PCR操作技术更趋完善.

参考文献

- 1 Erlich H A. Basic Methodology. In: Erlich H A ed, *PCR technology principles and applications for DNA amplification*, New York: Stockton Press, 1989: 1-6
- 2 Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 1989; **339**: 237
- 3 阎小君, 吉昌华. 保证多聚酶链反应技术成功的措施. 国外医学——微生物学分册, 1991; **14** (2): 82
- 4 Zeng Y T, Huang S Z. α -Globin gene organization and prenatal diagnosis of α -thalassemia in Chinese. *The Lancet*, 1985; **1**: 304
- 5 Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S *et al*. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988; **239**: 487

一种构建cDNA文库时 Sepharose CL-4B 筛分cDNA的简化方法*

汪洛 张迺蕻

(北京医科大学生化教研室基因工程研究室, 北京 100083)

关键词 Sepharose CL-4B 柱层析, cDNA 文库, 溴酚蓝

构建cDNA文库时, 为了提高获得全长cDNA的可能性, 在进行连接和包装反应之前, 应当采用Sepharose CL-4B柱层析对cDNA首先进行筛分. 一般的方法是在提取mRNA之后, 利用逆转录酶合成cDNA第一链, 然后直接在第一链反应混合液中加入同位素、RNase H和*E. coli* DNA聚合酶I示踪合成cDNA第二链, 再进行甲基化、连接接头并以限制性内切酶消化, 上Sepharose CL-4B柱层析进行分离^[1]. 显然这一程序由于多次使用同位素, 增加了放射污染材料扩散的可能, 也给整个实验过程带来不便.

随着cDNA合成条件的改善, 大多已不主张在第二链合成时直接加用同位素, 而改为在两条链合成时

分别小量另管示踪^[2]. 但这种改进却造成筛分工作检测的困难. 我们在构建人肺高转移巨细胞癌cDNA文库时, 在上样时加入溴酚蓝进行示踪, 获得较好的结果.

1 材料与方法

人肺高转移巨细胞癌细胞系(简称PG)由本校病理教研室建立^[3]. 按下述条件培养: 5%小牛血清/RP-MI1640培养液(GIBCO公司), 37℃和5%的二氧化碳

* 国家“八五”攻关项目资助课题.

收稿日期: 1992-03-06 修回日期: 1992-04-16