

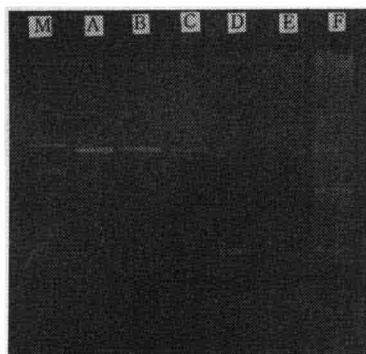


图1 PCR产物电泳结果

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 $^{\circ}$ C 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

环境,扩增至 10^8 个细胞 (大约 10 瓶),按照 Maniatis 等人的方法提取细胞总 RNA^[1],以 Oligo (dT) 纤维素柱层析分离富集其中的 mRNA^[4]后,采用 cDNA 合成药盒 (Promega 公司) 合成 cDNA 第一链及第二链,分别留小样加入同位素,合成完毕,测算同位素掺入率并以碱性琼脂糖凝胶电泳及放射自显影显示 cDNA 双链的大小。

Sephacrose CL-4B 以 STE 缓冲液 (含 10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA 和 0.1mmol/L NaCl, pH8.0) 悬浮洗涤后,灌入 1ml 塑料吸量管中 (尖端用硅化玻璃丝封堵)。将 λ DNA 标准 (Hind III) 以 TE 缓冲液 (含 10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0) 适度稀释加入 1 μ l 溴酚蓝溶液 (0.2% 溴酚蓝/30% 蔗糖),加上柱顶后以 STE 缓冲液进行洗脱。采用 Uvicord II 型紫外核酸蛋白检测仪 (Pharmacia 公司) 监测洗脱过程,每 0.2ml 收集一组分,分别加 20 μ g 酵母 tRNA 共同沉淀。用 TE 缓冲液重悬后,进行 2% 琼脂糖凝胶电泳观测 λ DNA 标准洗脱各组分的成分。按此确定的筛分条件分离合成的 PG 细胞 cDNA,用于构建 cDNA 文库。

DNA 印迹杂交过程参照 Maniatis 等人的方法^[1]。回收 cDNA 文库的总 DNA 后,经酶切处理及 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,转硝酸纤维素膜,转膜前照相以便于分析杂交后放射自显影的结果。杂交探针采用本研究室克隆并已测定全部序列的一段 DNA 活性片段 PLC-2,以随机引物法进行标记。

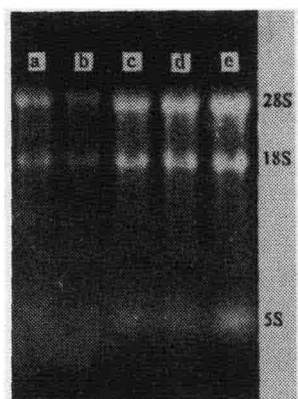


图1 变性琼脂糖凝胶电泳分析 PG 细胞总 RNA
a. 5 μ g RNA; b. 2.5 μ g RNA; c. 7 μ g RNA; d. 9 μ g RNA; e. 12 μ g RNA

2 结果及讨论

从 10^8 个细胞一般可获取 1—1.5mg 总 RNA。变性琼脂糖凝胶电泳分析显示 28S, 18S 和 5S 区带清晰,

28S 与 18S 比率超过 2.0 (图 1), 可用于 cDNA 的合成 (图 2)。

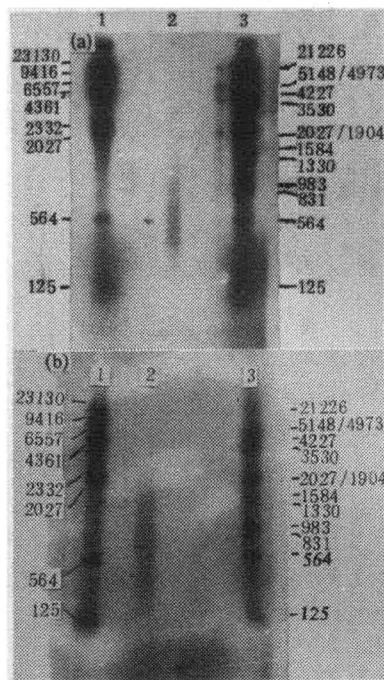


图2 碱性琼脂糖凝胶电泳/放射自显影显示 cDNA 第一链及第二链

(a) 1. λ DNA/Hind III; 2. cDNA 第一链; 3. λ DNA/Hind III + EcoR I.
(b) 1. λ DNA/Hind III; 2. cDNA 第二链; 3. λ DNA/Hind III + EcoR I

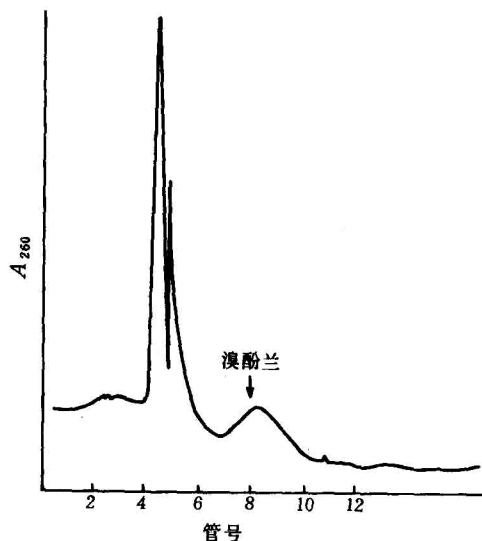


图3 Sepharose CL-4B 柱层析分离 λ DNA/Hind III 标准
0.2ml/组分

图3所示为 Sepharose CL-4B 柱层析分离 λ DNA/

Hind III 标准的情况,主要表现为两个峰,而溴酚蓝在组

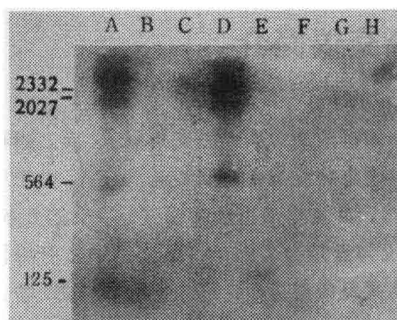


图 4 电泳显示各组分中 λ DNA/Hind III 标准的大小

A. λ DNA/Hind III 标准;
B, C, D, E, F, G, H 分别为
组分 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10

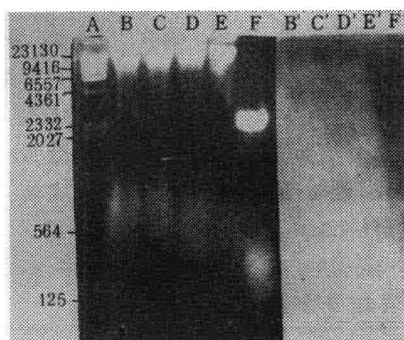


图 5 PG 细胞 cDNA 文库的初步鉴定 (文库总 DNA 的印迹杂交)

A. λ DNA/Hind III 标准;
B, C, D, E 为文库总 DNA/EcoR I (分别为
4 μ g, 3 μ g, 2 μ g, 1 μ g);
F. PLC-2 探针自身对照;
B', C', D', E', F' 为相应的印迹杂交结果

分 8 出现。电泳显示: 前峰 (包括两个尖峰) 及后峰前半部分 (组分 3—7 号) 主要为大于 500bp 部分, 而 125bp 则主要出现在组分 8 以后 (图 4)。

按图 3 和图 4 所确定的条件, 层析筛分 PG 细胞 cDNA 并构建成文库。回收文库总 DNA 加以酶切鉴定, 同时以 PLC-2 为探针进行 DNA 印迹杂交, 结果见图 5。显然与 PLC-2 呈阳性杂交的 DNA 片段不小于 3.5kb。

综上所述, 以 Sepharose CL-4B 对 cDNA 进行筛分, 以期获得全长 cDNA 是一个比较好的手段。而在上样时加入溴酚蓝示踪, 则可避免同位素材料的扩散, 并且简化了实验过程: 收集 3—7 组分 (0.2ml/组分) 进行沉淀即可获取 ≥ 500 bp 的 cDNA 片段。

参考文献

- 1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 2 Promega. *Technical Manual*. Madison: Promega Corporation, 1990
- 3 吴秉铨, 郑杰, 方伟岗等. 裸鼠体内建立的人类高转移癌系. 中华肿瘤杂志. 1985, 7 (5): 324
- 4 Jacobson A. Purification and fractionation of poly (A)⁺ RNA. In: Berger S L, Kimmel A R eds, *Methods in enzymology*. San Diego, California: Academic Press Inc, 1987; Vol. 152: 254

西德的制糖新技术 (925210[†])

本文为出国考察报告。文章从节能、B-MA 的塔式四层连续煮糖罐 (VKT) 和卧式连续煮糖罐 (VKH)、真空连续助晶机 (MET)、投粉起晶和冷却固晶的制晶种新技术、用糖浆式替洗水的分蜜法、过滤设备、用色层层析法从废蜜中生产液体精糖、用发酵蒸馏联合单

罐连续发酵法产生精酒、糖厂的三废处理等几方面对西德的制糖新技术作了全面的介绍。委托检索费: 单位 16 元, 个人 14 元。

[北京 867 信箱 20816 组李 群, 邮码: 100024 电话: 5762127, 5762194]