

结果见表1。

表1  $\alpha_1$ -AT纯化过程中蛋白质含量和抑制剂活力的回收情况

步骤	总蛋白 mg	总活力 BAEE 单位 $\times 10^3$	比活 BAEE 单位/mg	活力回 收率 %	纯化倍数
血浆 (50ml)	3270	8.00	2.4	100	1
硫酸铵 沉淀	1590	7.10	4.5	88.7	1.9
离子交 换层析	215	4.45	20.6	55.6	8.3
亲和层析	36	3.75	104.3	46.8	43.4
凝胶过滤	19	2.32	122.1	29.0	50.8

由于  $\alpha_1$ -AT 是糖蛋白, 它又与血浆清蛋白的分子量大小, 电泳行为等很相似, 采用一般的层析和电泳很难把二者分开。本文利用 ConA 与糖蛋白中甘露糖的亲性和性能而建立的亲和层析, 达到了将  $\alpha_1$ -AT 与血清蛋白分离的目的。本方法运用于猪血浆  $\alpha_1$ -AT 的纯化在国内外尚属首次。从国内外纯化人  $\alpha_1$ -AT 的工作来看, 要使活力回收率和纯化倍数都较高是比较困难的, 有人曾反复用各种离子交换层析和分子筛层析, 其结果并不令人满意<sup>[11]</sup>, 即使有人在各种层析的基础上加上电泳切割, 虽说提高了纯化倍数, 但活力回收率很低<sup>[12]</sup>。本方法与 R Geiger 纯化猪  $\alpha_1$ -AT 的方法相比较具有简便、快速、稳定性好、纯化倍数和活力回收率高等优点。

用 ConA-sepharose 4B 亲和层析时, 开始用的洗

脱液中含 0.2mol/L NaCl, 0.1mol/L  $\alpha$ -甲基 D-葡萄糖苷, 结果洗脱效果不佳, 后来增加 NaCl 浓度到 0.5 mol/L, 增加  $\alpha$ -甲基 D-葡萄糖苷的浓度到 0.2mol/L, 结果结合在柱上的蛋白质几乎全部被洗下来。

本实验用的 ConA-sepharose 4B 亲和凝胶由自己制备, 经测定 Sepharose 4B 对 ConA 的偶联效率达 85%。从 DEAE 柱到 ConA 柱后主要包括清蛋白在内的杂蛋白有 83% 被除去。合成的 ConA-sepharose 4B 亲和凝胶的稳定性较好, 室温下放置 5 个月仍具较好的亲和性能。

## 参 考 文 献

- 1 Bangh R *et al.* *Biochemistry*, 1976; 15: 495
- 2 Matheson N R *et al.* *Biochem J*, 1976; 159: 495
- 3 Geiger R *et al.* *J Clin Chem Clin Biochem*, 1985; 23 (10): 637
- 4 Lowry OH. *J Biol Chem*, 1951; 195: 265
- 5 张龙翔等. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1981: 141
- 6 袁晓华等. 植物生理生化实验. 北京: 高等教育出版社, 1983: 48
- 7 莽克强等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京: 科学出版社, 1975: 32
- 8 Piero M *et al.* *Biochemistry*, 1976; 15: 4
- 9 Irvin E L *et al.* *Biochem Biophys Commun*, 1973; 51(2): 436
- 10 彭启明. 生物化学与生物物理进展, 1982; (3): 59
- 11 Crowford L P. *Arch Biochem Biophys*, 1973; 156: 215
- 12 顾学范等. 生物化学与生物物理进展, 1985; (5): 59

## 利用聚合酶链反应扩增基因片段

邹民吉 王嘉玺 任启生 李满 马贤凯

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

**关键词** PCR, 亚磷酸胺法, 引物, 模板

聚合酶链反应 (PCR) 是一种模拟天然 DNA 复制过程的核酸扩增法, 具有敏感特异、产率高、操作简单、容易自动化等特点。由于它有成指数倍 ( $2^n$ ) 扩增靶序列的能力, 又被称之为“无细胞分子克隆”或“试管内分子克隆”<sup>[1]</sup>。我们以化学合成的寡核苷酸的粗提物为引物, 含目的基因片段的重组质粒 DNA 为模板, 利用 PCR 技术成功地扩增出数百至 3544bp 的特异性

DNA 片段。这些片段均容易定位组入特定载体, 使分子克隆过程大为简化。现将实验方法和结果简报如下:

1 寡核苷酸引物的设计 尽量遵循以下原则:

a. 碱基分布, GC 含量与待扩增序列类似, 避免多聚

嘌呤与多聚嘧啶; b. 避免带有明显的二级结构, 尤其是 3' 端; c. 两个引物之间不应有互补性, 尤应避免 3' 端重叠, 以期减少引物二聚体的形成. 如欲加入限制性酶切位点与调控元件等模板不互补的序列, 则加在引物的 5' 端. 引物浓度 0.05—0.5 μmol/L<sup>[22]</sup>, 退火温度以公式  $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$  估计, 括号内为碱基数之和<sup>[3]</sup>. 按上述原则我们设计了三组 8 个引物. 第一组供扩增白细胞介素 2 受体基因 (1L2R) 编码区 830bp 之用, 在 5' 端各加一个酶切位点, 以便定位重组. 左侧引物为 5'-G G'AA TTC ATG GAG

EcoRI  
CTC TGT GAC GAT GAC CCG CCA-3'; 右侧引物 5'-G-G'TC GAC TAG ATT GTT CTT CTA CT-3'.  
Sall

第二组引物供扩增白细胞介素 6(1L-6) 基因编码区 636bp 之用, 左侧引物 5' 端引入 BamHI, BglII 两个位点, 右侧加入 BglII 与 HindIII 两个位点, 以便组入 2 个不同载体. 左侧引物 5'-CGG G'GA TCC A'GA TCT  
BamHI BglII

ACC ATG GAC TCC TTC TCC ACA AG-3', 右侧引物 5'-GGA A'GA TCT A'AG CTT TAC TAC A-  
BglII HindIII

TT TGC CGA A-3'. 第三组 4 个引物供扩增肾综合征出血热病毒 (HFRSV) 膜蛋白基因全序列 3544bp, 及其组分 G1 1842 bp, G2 1514bp, 膜蛋白全序列左侧引物与 G1 左侧引物相同, 右侧引物与 G2 右侧引物相同, 故 4 个引物可扩增 3 个序列. 膜蛋白 (M) 与 G1 左侧引物: 5'-G G'CT AGC ATG GGG ATA  
NheI

JGG AAG TGG CTA-3'; G1 右侧引物 5'-G G'TC GAC  
Sall

CTA ACA TCC TGG TGT AAA ATT TTG-3'; G2 左侧引物 5'-G G'CT AGC ATG TGG ATA TTT  
NheI

CTT CTT GTC-3'; 膜蛋白 (M) 与 G2 右侧引物 5'-G G'TC GAC CTA TGA TTT TTT ATG CTT CCT-3'  
Sall

**2 寡核苷酸引物的合成** 利用 Milligen/Bioserarch 公司 Cyclone Plus DNA 合成仪及其成套试剂, 按亚磷酸胺法 (phosphoramidite) 合成寡核苷酸引物, 在合成的最后一步可去除或保留二对甲氧三苯甲基 (DMT), 保留 DMT 的寡核苷酸则采用 Oligo-Pak 柱纯化, 这是一种可用于纯化长达 100 个核苷酸的寡核苷酸的简便快速方法<sup>[4]</sup>, 但是费用昂贵. 我们用更为简单的程序达到了同样的目的. 在合成的最后一步去除 5'-DMT 保护基, 从合成仪上取下装有可控孔径玻璃填料 (CPG) 的柱子, 从一端穿刺将 CPG 倒入一硅化灭菌的带螺丝盖的 3ml 小玻璃瓶内, 加 2ml 新鲜浓缩氨水, 密封瓶口, 55℃ 水浴过夜将合成产物从 CPG 上切割下来并脱去保护基. 冷却至室温, 分

装在 1.5ml 硅化灭菌之 Eppendorf 管内, 离心去除残留的 CPG, 含寡核苷酸的上清液倾入硅化灭菌的 Eppendorf 管内, 每管 1ml 测  $A_{260}$  值, 后用真空冷冻离心干燥仪 (Speed Vac) 干燥, -20℃ 保存备用. 此粗提物即可直接用作 PCR 反应的引物以及杂交探针, 而不必作 PAGE 及 HPLC 纯化. PCR 反应的寡核苷酸引物配成 20 μmol/L 母液, 按  $1A_{260} = 20\mu\text{g}$  用灭菌双蒸水配制, 20 μmol/L 母液配制公式:

$$\frac{A \text{ 值}}{\text{碱基数}} \times 3030 \mu\text{l}$$

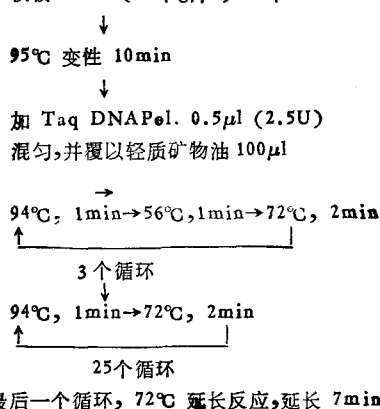
**3 PCR 反应扩增基因片段** PCR 反应是一个比较复杂的生化过程, 几个成分之间始终变化着的动态相互作用决定产物的质和质量, 标准反应条件如下:

DNA 样品:  $10^2$ — $10^3$  模板拷贝; 50mmol/L KCl; 10mmol/L Tris · HCl (pH8.4, R.T.); 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>; 100 μg/ml 明胶; 0.25 μmol/L 各种引物; 200 μmol/L 各种 dNTP; 2.5U Taq DNA 聚合酶, 总体积 100 μl, 加几滴矿物油, 防止蒸发浓缩.

10 × 反应缓冲液组成: 100mmol/L Tris-HCl, pH8.4, 500mmol/L KCl, 15mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.01% (W/V) 明胶. dNTP 浓度各为 200 μmol/L 时 Mg<sup>++</sup> 1.5mmol/L 为宜, 过高引致非特异性产物积累, 过低则降低产量. dNTP 过高过低也会引起同样后果. 100 μl 反应体积加 1—4 个单位的 Taq DNA 聚合酶, 过多则造成非特异性 PCR 产物.

反应混合物装配如下:

灭菌去离子水	67.5 μl
10 × 反应缓冲液	10 μl
dNTPs (1.25mmol/L)	16 μl
左侧引物 (20 μmol/L)	2.5 μl
右侧引物 (20 μmol/L)	2.5 μl
模板 DNA (0.1 μg/μl)	1 μl



反应按上述循环参数, 在 BioMed 热循环水浴 (Thermocycler 60) 中进行. 反应终止后, 将反应混合物转移至新灭菌硅化的 1.5 ml Eppendorf 试管内, 如混有少量矿物油则离心去除. 取 5 μl 反应混合物在

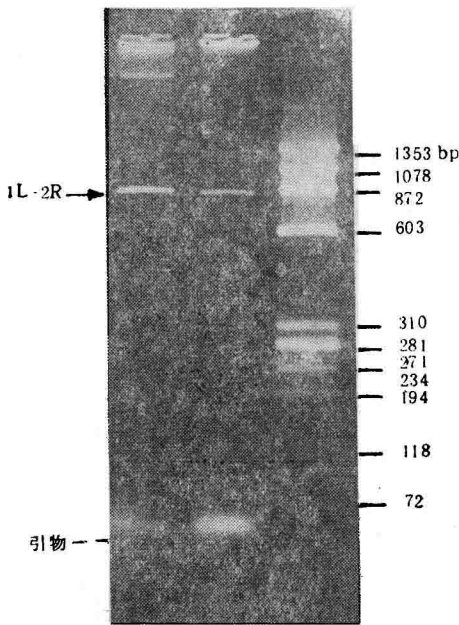


图1 IL-2R 编码区 PCR 扩增结果

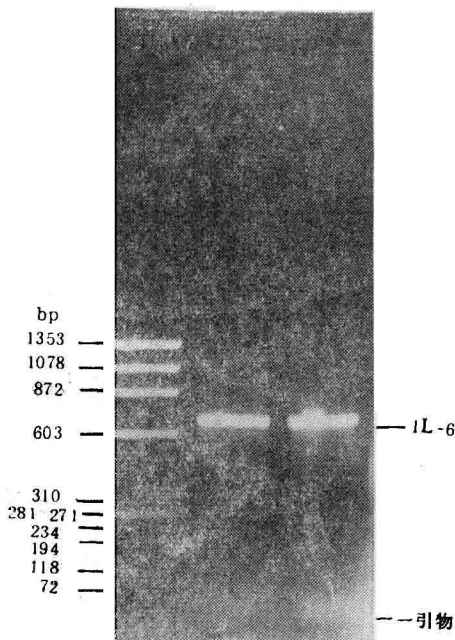


图2 IL-6 编码区 PCR 扩增结果

1% 琼脂糖凝胶上电泳检测反应情况。其余扩增产物加等体积 10mol/L NH<sub>4</sub>Ac 混匀, 再加等体积异丙醇混匀, 室温沉淀 10min, 12000r/min 离心 10min, 倾去上清, 70% 乙醇离心洗沉淀 1—2 次, 真空干燥备用。

4 结果与讨论 各次 PCR 反应混合物各取 5μl

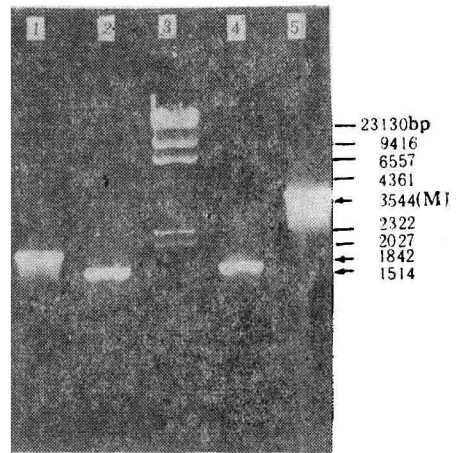


图3 PCR 扩增 HFRSV 的 M, G1, G2 编码区的结果

1: G1; 2: G2; 3: λDNA<sub>Hind</sub> III; 4: M

电泳检测结果见图 1—3, 从这些照片可以看出, 我们采用的 PCR 反应条件及循环参数较为合适, 3 组 4 对引物合成了 5 个基因片段即 IL-2R (830bp), IL-6 (636pb), G1 (1842bp), G2 (1514bp) 及 M (3544bp)。图 1, 2 可见残留的引物带, 而图 3 几乎看不见引物带。由此推测我们提取寡核苷酸引物可用于 PCR 反应, 不需特殊设备和试剂, 从电泳图型看产率很高, 估计 100ng 模板得 IL-2R 编码区片段 5μg, IL-6 编码区片段 8μg, G1, G2, M 各约 10 μg, 这些扩增片段经双酶切后顺利编入特定载体, 其中 IL-2R 与 IL-6 已获高效表达。本工作 PCR 反应特异性较高, 主要是调整了退火温度。各引物 5' 端均加入酶切位点, 因而与模板不配对区域长约 7—15 碱基, 故在前三个循环中采用 56°C 退火, 以保证足够的起始材料; 在以后的 25 个循环中采用 72°C 退火温度, 使退火与延伸同步进行, 可使在 56°C 退火时产生的非特异性产物不能退火延伸, 既提高特异性又节省了反应时间。由于引物序列来自模板 DNA, 不可能完全符合在设计一节中所提原则, 但是通过调整反应条件及循环参数亦可达特异性扩增之目的。

参 考 文 献

- 1 王嘉玺. 国外医学(遗传分册), 1989;4: 181
- 2 Saiki R K. in: Erlich Henry A ed. *PCR technology Principles and applications for DNA amplification*, New York: Stockton Press, 1989: 7
- 3 Vosberg H P. *Human Genetics*, 1989; 83:1
- 4 MilliGen/Biosearch. *Cyclone Plus DNA Synthesizer Manual*, Burlington, MA: MilliGen/Biosearch Division of Millipore, 7:1—7, 10