

## 经验交流

# 一种通用高效的聚合酶链反应产物克隆方法\*

王亚新 陆佩华 周光炎

(上海第二医科大学上海市免疫学研究所, 上海 200025)

**关键词** 聚合酶链反应, 分子克隆, M13噬菌体

聚合酶链反应(PCR)自问世以来已在生物学界、医学界等领域中得到广泛的应用。其中一个重要方面是将其产物克隆,然后测定核苷酸序列。常用的PCR产物克隆法是将PCR产物以粘性末端<sup>[1]</sup>或平头<sup>[2]</sup>连接于M13噬菌体或pUC质粒中,然后转染大肠杆菌。粘性末端连接克隆法效率高,但需在PCR产物两端有特定的限制性内切酶切点。且在酶切时易受到多种因素影响而不能得到理想的产物,平头连接克隆法无须酶切,可适用于任何PCR产物,但缺点是效率低,笔者在国外工作期间,将平头连接法<sup>[2]</sup>进行了改进,得到了令人满意的高效率克隆。

## 1 材料与方 法

### 1.1 PCR 扩增

一个DNA样品同时扩增二管,每管100 $\mu$ l,扩增后各取10 $\mu$ l在琼脂糖凝胶上电泳检验。

### 1.2 PCR 扩增产物处理

**1.2.1 修平末端:**合并二管放大产物约170 $\mu$ l,加dATP, dGTP, dCTP和dTTP各至终浓度0.2mmol/L, Klenow聚合酶10U,室温(约22 $^{\circ}$ C)放置30min。

**1.2.2 分离提纯:**上述产物加反应终止液,在1%—2%琼脂糖凝胶上电泳分离。切下含所需产物的凝胶条,冷冻后挤压成碎片。然后加在底部有孔及尼龙毛的0.5ml管中,外面套1.5ml试管,12000r/min离心0.5min。将过滤液移到另外管中,再离心原过滤管。这样反复多次,直至仅少量液体滤出,最后12000r/min离心5min。过滤液再用酚和氯仿各抽提一次,然后用乙醇沉淀。沉淀干燥后溶解于20 $\mu$ l双蒸水,取出1 $\mu$ l与已知浓度的Hind III水解的 $\lambda$ DNA片段一起在琼脂糖凝胶上电泳。根据荧光强度比较估计样品DNA的浓度。

**1.2.3 PCR产物磷酸化:**先配制10 $\times$ 反应缓冲液(可用Bio-Lab公司的连接酶所附连接缓冲液代替):500mmol/L Tris-HCl(pH7.5),100mmol/L MgCl<sub>2</sub>,100mmol/L二硫苏糖醇(DTT),10mmol/L ATP,250 $\mu$ g/ml牛血清白蛋白。在0.5ml管中加上上述提纯PCR产物8 $\mu$ l(250—400 $\mu$ g),1 $\mu$ l10 $\times$ 反应缓冲液,1.2 $\mu$ l亚精胺(spermidine,10mmol/L),多核苷酸激酶10U,用双蒸水补足到12 $\mu$ l。水浴37 $^{\circ}$ C,30min。然后65 $^{\circ}$ C,10min灭活酶反应。

### 1.3 PCR产物连接到M13噬菌体

取上述磷酸化PCR产物0.6—1.4 $\mu$ l(约5—30ng),加1 $\mu$ l10 $\times$ 反应缓冲液(与上述磷酸化所用相同),20ng已用Sma I切开并在5'端去磷酸的M13mp8(Amersham有商品),400连接单位连接酶(Bio-Lab产品,相当于6 Weiss单位),用水补足到10 $\mu$ l。在25 $^{\circ}$ C水浴保温过夜。然后68 $^{\circ}$ C,10min灭活酶反应。

### 1.4 PCR产物-M13转化大肠杆菌

大肠杆菌JM101经CaCl<sub>2</sub>处理活化后与PCR-M13混和置冰浴3h,然后与异丙基- $\beta$ -硫化半乳糖苷(IPTG),x-半乳糖(x-gal)及大肠杆菌一起做培养平板。培养过夜后透明小点即是阳性克隆。

## 2 结果与讨论

通常二管PCR放大产物经分离提纯可回收约1 $\mu$ gDNA,因此方法熟练后每次用一管产物即可满足克隆需要。由于PCR产物的末端并不是真正平齐,往往在3'端多一个A<sup>[3]</sup>,因此需用Klenow聚合酶进行填充、切除修平,这样才可取得较高连接效率。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分离提纯,可去掉大部分非特异扩

\*国家自然科学基金资助项目。

增产物. 这有利于以后序列分析, 使之不致于出现较高比例的“垃圾”序列. PCR产物的5'端一般都是引物部分, 而大多数引物都是DNA自动合成仪合成, 其5'端无磷酸分子. 因此PCR产物在连接前需先在5'端由多核苷酸激酶催化加上一个磷酸. 为简便起见, 磷酸化所用 $10\times$ 反应缓冲液与连接反应缓冲液相同. 虽然磷酸化时所用亚精胺被认为有碍于平头连接, 但在我们的实验条件下, 亚精胺浓度在连接时已被稀释到约 $0.1\text{mmol/L}$ , 并没对连接效率产生很大影响. 因此我们就直接用磷酸化后反应液做连接反应, 而不再用低熔点琼脂糖凝胶分离. 我们曾同时比较过这二种方法, 直接连接克隆的效率高于琼脂糖凝胶分离后连接克隆, 且节省不少时间和试剂. M13噬菌体5'端去磷酸可防止自身连接, 提高与插入DNA连接的效率. 此种M13噬菌体已有商品, 也可自己用碱性磷酸酶处理回收. 根据我们的实验结果, 插入DNA(约200bp)的量与M13DNA的量之比以 $20\text{ng}:20\text{ng}$ 效率最高. 但各人所

用DNA大小不同, 在估计DNA浓度时也有误差, 因此每次可试几个不同的比例. 我们已用此法反复多次克隆了5种不同的PCR产物, 结果显示每块平板可得到50—100个透明斑点, 即阳性克隆. 虽然现在已有一些新的PCR产物克隆方法出现, 但有的技术复杂, 有的需要特殊的酶或载体. 而此法只用普通载体, 一般实验室均能进行, 且通用高效, 因此值得推广.

## 参 考 文 献

- 1 Scharf S J, Horn G T, Erlich H A. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*, 1986; **233**: 1076
- 2 Hemsley A, Arnheim N, Toney M D *et al.* A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1989; **17**: 6545
- 3 Clark J M. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, 1988; **16**: 9677

# 尿蛋白快速 SDS-PAGE 测定及临床应用

唐志毅 许维桂 杨振华 黄一明 毛利民 吴华

(北京医院检验科, 北京 100730) (北京医院内科, 北京 100730)

**关键词** 尿蛋白分子量测定, SDS-PAGE, 蛋白尿

蛋白尿是肾脏病最常见的表现. 应用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行尿蛋白分子量的测定, 对于肾脏病的定位、评估和预后判断有较高的临床价值. 最近我们使用Pharmacia公司的Phast-System全自动电泳仪和Phast Image扫描仪以及改进的银染色法<sup>[1,2]</sup>对30例肾病患者的尿标本进行蛋白分子量的测定, 尿标本不需浓缩, 蛋白浓度 $0.05\text{g/L}$ 即可检出. 包括银染色在内的全部实验只需1.5h. 本法在快速和灵敏度方面优于国内已报道的SDS-PAGE方法<sup>[3,4]</sup>.

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器

瑞典Pharmacia公司生产的PhastSystem全自动电泳仪. PhastImage凝胶扫描仪. 凝胶: PhastGel Gradient 8-25聚丙烯酰胺薄层凝胶板及PhastGel SDS Buffer Strip(缓冲凝胶条).

### 1.2 试剂

分子量标准品处理用缓冲液:  $10\text{mmol/L}$  Tris-HCl 缓冲液(pH8.0), 其中含 $1\text{mmol/L}$  EDTA,  $2.5\%$  SDS,  $5\%$  巯基乙醇,  $0.2\%$  溴酚蓝.

银染试剂: Pharmacia公司试剂盒或实验室配置.

低分子量蛋白质标准: Pharmacia公司试剂盒. 每瓶加入 $100\mu\text{l}$  缓冲液溶解, 临用前 $20\mu\text{l}$  用缓冲液按 $1:3$ 稀释, 于 $100^\circ\text{C}$ 煮沸3min, 冷却后离心取上清液点样.

### 1.3 尿标本的收集处理

收集肾病患者晨尿 $10\text{ml}$  离心( $3000\text{r/min}$ ,  $10\text{min}$ ), 取上清液用考马斯亮蓝G250结合法<sup>[5]</sup>定量蛋白, 尿标本用去离子水稀释蛋白含量为 $1-2.5\text{g/L}$ 之间, 按 $1:50$ 加入 $1\%$ 叠氮钠溶液于 $-20^\circ\text{C}$ 冰箱备用. 健康人取晨尿 $30\text{ml}$ , 用去离子水透析4h, 再用聚乙二醇