

经验交流

细胞内 RT-PCR 扩增免疫球蛋白重链可变区基因*

李昌龙 赵满仓** 王 抒 蒋 雷 李健斋

(卫生部北京老年医学研究所, 北京 100730)

摘要 通常, 逆转录 PCR (RT-PCR) 需要高质量的 mRNA, 操作过程复杂, 效率低且易受到 RNase 的破坏. 为了简化操作, 提高效率, 用 10% 甲醛盐溶液固定杂交瘤细胞, 以 NP-40 渗透化处理细胞后做 RT-PCR, 获得了大约 350 bp 的特异性免疫球蛋白重链可变区基因片段, 与用同一对引物得到的常规 RT-PCR 扩增产物一致. 这项技术可用于获得特定结构基因片段, 连结并扩增嵌合蛋白基因及构建多克隆免疫球蛋白文库等.

关键词 细胞内 RT-PCR, 重链可变区基因, 渗透化处理

在一般的 RT-PCR 中, 往往需要首先提取细胞总 RNA, 再纯化 mRNA, 这一过程复杂, 易受到 RNase 的破坏, 这种 RT-PCR 扩增特异片段的效率较低. 最近 Embleton 等^[1]和 Sarantopoulos 等^[2]探索出一种在细胞内进行 RT-PCR 的方法, 这种方法简化了操作程序, 提高了扩增效率. 本文就是利用稍加改动的细胞内 RT-PCR 技术扩增杂交瘤细胞内的特异免疫球蛋白重链可变区基因片段 (VH), 获得了大约 350 bp 的扩增产物, 与报道的 VH 长度一致.

1 材料与方法

细胞株: 分泌抗人 apoAI 单克隆抗体的杂交瘤细胞株来自于石家庄空军医院检验科, 在含 5% FBS 的 DMEM 中生长培养.

引物合成于医科院基础所, 序列为^[3]:

5' Primer (VH1BACK)

5' -AGGT(G/C)(A/C)A(G/A)CTGCAG(G/C)AGTC(T/A)GG-3'

3' Primer (VH1FOR)

5' -TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC-TTGGCCCCAG-3'

NP-40 购自 Serva 公司, 矿物油为 Sigma 产品, dNTPs, RNasin, AMV 逆转录酶及 Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司, 其他为国产分析纯试剂.

1.1 细胞的固定与渗透化

将培养瓶内液体倒掉并剩余 1 ml 左右, 用弯头吸管吹起细胞, 收集于离心管内. 5×10^7 左右的细胞通过 4℃、 $2000 \times g$ 离心 3 min 沉淀, 用 PBS (pH7.2) 5 ml/次 洗涤三遍, 将细胞悬浮于 1 ml 0.15 mol/L NaCl 溶液中并加入 1 ml 预冷的 20% 甲醛-0.15 mol/L NaCl 溶液, 在冰上放置 1 h, 并不时振荡混合. 4℃、 $10\,000 \times g$ 离心 90 s 收集细胞并用预冷的 PBS (pH7.2) 洗三遍, 每次都要用吸管剧烈吹打使细胞单个分散. 将细胞悬浮于 0.2 ml 0.5% NP-40/水中, 在冰上放置 1 h, 经常振荡防止

*国家自然科学基金资助项目.

**解放军石家庄空军医院, 石家庄 050081.

收稿日期: 1994-08-04, 修回日期: 1994-10-05

细胞粘连。用预冷 PBS (pH7.2) 洗三遍后再用冷的含 0.1 mol/L 甘氨酸的 PBS (PBS-0.1 mol/L 甘氨酸) 洗一遍, 将细胞悬浮于 0.5 ml PBS-0.1 mol/L 甘氨酸中, 用 1 ml 注射器反复吹打, 以镜下无细胞粘连为标准, 然后计数细胞, 分装于 0.5 ml 小管中, 10^6 细胞/管, 冻存于 -80°C 冰箱内可使用三周。

1.2 细胞内逆转录

将 10^6 细胞在 65°C 水浴保温 3 min, 取出后置冰上, 冷却后加入新鲜配制的“逆转录混合溶液”:

10 μl	5 $\times$ 1st strand buffer (Promega)
25 pmol	VH1FOR 引物
80 U	RNasin (Promega, 40 U/ μl)
50 U	AMV 逆转录酶 (Promega, 25 U/ μl)

加水至 30 μl 。

将试管内反应总体积调至 50 μl , 置 42°C 水浴 1 h, 4°C 离心收集细胞, 用 PBS-0.1 mol/L 甘氨酸洗一遍, 重悬在 20 μl 同一缓冲液中备用。

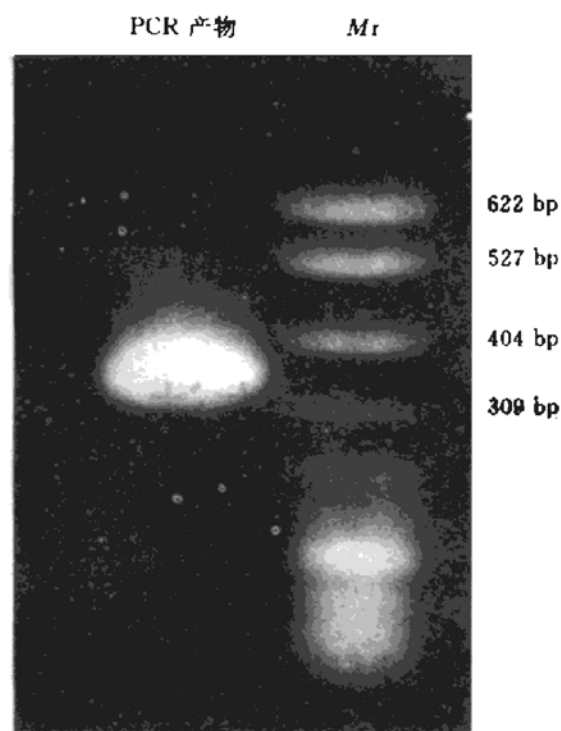


图1 细胞内 RT-PCR 产物电泳结果
琼脂糖浓度 1.5%, 电泳缓冲液 $0.5\times$ TBE,
上样量 20 μl 。Mr: DNA 分子量标准。

1.3 细胞内 PCR 扩增

在 0.5 ml 小管内加入:

10 μl	细胞内逆转录后的固定细胞
25 pmol	VH1BACK 引物
25 pmol	VH1FOR 引物
200 μmol	dNTPs
5 μl	10 $\times$ Taq DNA 多聚酶缓冲液 (Promega)
2.5 U	Taq DNA 多聚酶 (Promega)

加水至 50 μl , 反应在 PE-9600 型热循环仪中进行: 95°C 、60s; 42°C 、60s; 72°C 、90s。共 35 个循环, 扩增产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与讨论

Haase 等^[4]曾报告使用甲醛固定, 乙醇保存细胞并进行原位 PCR 扩增, 但后来的实验证明, 使用甲醛盐溶液固定, NP-40 渗透化处理及 PBS-0.1 mol/L 甘氨酸保存细胞能够产生更多的特异扩增产物^[1]。在我们的实验中, 所有实验管都检测到大约 350 bp 的扩增片段, 与我们使用同一对引物采用通常的 RT-PCR 方法所得到的结果一致 (待发表)。在这一过程中, 渗透化处理是必须的, 否则小分子不能进入细胞内, 难以产生扩增产物。

原位 PCR 最先应用于感染细胞内晶状病毒 (lentivirus) DNA 的扩增^[4], 近来又应用于人类免疫缺陷病毒 (HIV) 原病毒的检测^[5], 而在悬浮的细胞中进行 RT-PCR 的方法国内尚未见报道, 其应用潜力很大。

a. 可应用于细胞内某种蛋白质 mRNA 的逆转录扩增, 提高低拷贝 mRNA 的扩增效率, 用于探针制备、原核表达、序列测定等。

b. 细胞内逆转录扩增技术还可将细胞内两种或多种 mRNA 的扩增片段连接起来, 用于嵌合蛋白的生产, 如嵌合酶、单链抗体或 T 细胞受体等。

c. 将杂交瘤来源的 VL-VH 基因片段转移至真核表达载体, 用于抗体片段或完整抗体的表达^[2]。此系统的建立, 有助于构建真核表达的

抗体文库。

d. 据有关文献报道,从两种混合的杂交瘤细胞中获得的 PCR 产物互不干扰,这就是说,从免疫 B 淋巴细胞中获得的单链抗体基因片段完全等同于同一 B 细胞的杂交瘤来源的产物。这样,细胞内 RT-PCR 技术可以应用于全套抗体库的建立。

参 考 文 献

- 1 Embleton M J, Gorochov G, Jones P T *et al.* Nucl Acids Res, 1992; **20** (15): 3831
- 2 Sarantopoulos S, Kao C-Y Y, Den W *et al.* J Immunol, 1994; **152**: 5344
- 3 Orlandi R, Gussow D H, Jones P T *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989; **86** (5): 3833
- 4 Haase A T, Retzel E F, Staskus K A. Proc Natl Acad Sci USA, 1990; **87** (7): 4971
- 5 Bagasra O, Hauptman S P, Lischner H W *et al.* N Engl J Med, 1992; **326** (21): 1385

In-Cell Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (In-cell RT-PCR): Amplifying the Reverse Transcribed Immunoglobulin Heavy Chain Gene Fragment within Hybridoma Cells. Li Changlong, Wang Shu, Jiang Lei, Li Jianzhai (*Biochemistry Laboratory, Beijing Institute of Geriatrics, Ministry of Public Health, Beijing 100730, China*); Zhao

Mancang (*Department of Clinical Laboratory Medicine, Shijiazhuang Air Force Hospital, Shijiazhuang 050081, China*).

Abstract General reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) is a complicated process with low efficiency. And high quality mRNA is required and the mRNA is easily destroyed by RNase. The hybridoma cells were fixed with 10% formaldehyde solution in normal saline and permeabilised by 0.5% Nonidet P-40 in water. After the mRNA was reversely transcribed to cDNA and the cDNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR), a specific heavy chain variable region gene (VH) of immunoglobulin with length of about 350 bp, being consistent with the product amplified by normal RT-PCR, was obtained. This technique could be applied to prepare specific structure gene fragments, to link and amplify chimeric protein genes and to construct human antibody libraries.

Key words in-cell reverse transcription polymerase chain reaction (in-cell RT-PCR), heavy chain variable region gene (VH), permeabilization

一种转移非特异性蛋白带的染色方法

夏另朝 李金照 陈 燕

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 考马斯亮蓝是常用的聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳的染料,利用硝酸纤维素膜(NCF)对染料的吸附作用,将低浓度的考马斯亮蓝(0.025%)染色液直接对NCF上的转移蛋白带进行染色,经实验反复验证,它是一种较好的NCF上转移非特异性蛋白带的染色方法。

关键词 PAG电泳, 硝酸纤维素滤纸(NCF), 蛋白转移, 酶标抗体