

## 参 考 文 献

- 1 Meyer K, Palmer J W. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem*, 1934, **107**: 629~ 633
- 2 凌沛学, 张天民 (Ling P X, Zhang T M). 羊眼玻璃体透明质酸钠的制备与分析. *山东医科大学学报 (Acta of Shandong Medical University)*, 1986, **24** (3): 50~ 57
- 3 沈渤江, 张天民, 张子纲 (Shen B J, Zhang T M, Zhang Z G). 鸡冠透明质酸的制备及理化性质. *医药工业 (Pharceutical Industry)*, 1987, (7): 295~ 299
- 4 李良涛, 由永金, 卢盛华. 生化制药学. 北京: 中国医药科技出版社, (Li L T, You Y J, Lu S H. *Biochemistrical Pharceutic*. Beijing: Pharceutic Science and Technology Press), 1991. 286
- 5 沈渤江, 张天民 (Shen B J, Zhang T M). 人脐带眼科透明质酸的制备和分析检验. *山东医学院学报 (Acta of Shandong Medical College)*, 1985, **23** (4): 15~ 19
- 6 郭子平, 王春喜, 崔大鹏 (Guo Z P, Wang C X, Cui D P). 发酵法制备透明质酸. *日用化学工业 (J Chem Indus Everyday Use)*, 1994, (2): 47~ 49
- 7 凌沛学, 张天民, 张子纲 (Ling P X, Zhang T M, Zhang Z G). 牛眼玻璃体透明质酸的研究及应用. *医药工业 (Pharceutical Industry)*, 1987, (7): 295~ 299
- 8 罗 曼 (Luo M). 牛眼透明质酸分级制备. *天然产物研究与开发 (Natur Prud Resear Devel)*, 1998, **10** (2): 86~ 89
- 9 郭学平 (Guo X P). 透明质酸及其发酵生产概述. *中国生物药物杂志 (Chin J Biochem Pharmaceutics)*, 1998, **19** (4): 209~ 211

**A Study on the Separation and Character of Hyaluronic Acid from Ox Eyes.** LUO Man, JIANG Li Ke (*Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China*); XI Jun (*Hefei Shenlu Medicines-limited Company, Hefei 230036, China*).

**Abstract** A method for purifying HA from ox eyes was studied. Using 0.125 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> other than 0.1 mol/L NaCl to dissolve the semifinished product, Two HA forms in Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'s solution were found. One in staple could be absorbed by CBP, and the other in powder could be returned by fractional dilution afterwards. In 0.1 mol/L NaCl solution, HA could only be recovered by CBP absorption. It displayed staple. The recoverable rate of the method was 1.7 times than others. The physical and chemical characters of the product were analysed. It was proved that higher purity recovery and lower cost than other methods were gained.

**Key words** ox eye, hyaluronic acid, fractionation physical and chemical character, quality

## 改进的反向 PCR 技术克隆转移基因的旁侧序列\*

李竹红 刘德培<sup>1)</sup> 梁植权

(中国医学科学院基础医学研究所 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)  
 (中国协和医科大学基础医学院)

**摘要** 对传统的反向 PCR 技术作了一些改进: 用巢式 PCR 扩增含量极少的靶序列; PCR 反应体系中加入 5% 的甲酰胺以减少非特异性扩增. 结果表明, 改进的反向 PCR 体系是克隆人基因组已知片段旁侧序列的高度灵敏、高度特异的方法.

**关键词** 反向 PCR, 旁侧序列, 克隆

**学科分类号** Q78

反向 PCR 技术可以对一个已知序列 DNA 的两侧未知序列进行扩增和研究, 又称染色体缓移 (chromosome walking). 其程序是: 选择已知序列内部没有切点的限制性内切酶对此段 DNA 进行酶切, 然后在 DNA 连接酶作用下自连形成环状 DNA 分子. 设计合适方向并与已知序列两端互补的引物, 以连接成环的 DNA 为模板, 经 PCR 扩增后, 可以得到已知序列的旁侧 DNA 片段<sup>[1]</sup>. 此方法常用于检测病毒、转座子等在基因组中的整合位点,

建立基因组步移文库及研究基因的上游调控元件, 在分子生物学研究中有广泛应用.

用反向 PCR 技术克隆质粒及细菌基因组的旁侧序列较为简单, 因为靶序列在质粒、细菌基因组中丰度较高, 易扩增. 但当用反向 PCR 克隆人及其他哺乳动物细胞基因组已知序列的旁侧片段时,

\* 国家“863”计划 (BH-03-02-02) 资助课题.

<sup>1)</sup> 通讯联系人.

收稿日期: 1998-10-23, 修回日期: 1999-01-08

由于待扩增的靶序列在基因组中含量极微, 再加上连接效率有限, 很难一步直接克隆到所需片段. 因此有些实验室首先用限制性内切酶酶切, DNA 印迹杂交, 确定含靶序列的酶切片段长度, 再通过电泳回收富集靶序列<sup>[2]</sup>; 或经反向 PCR 扩增后, 利用已知序列设计寡核苷酸, 通过杂交方法来确定克隆的旁侧片段<sup>[3]</sup>. 这些改进步骤繁琐, 费时费钱. 本文利用巢式 PCR 扩增哺乳动物基因组中含量极微的靶序列, 反应体系中加入 5% 甲酰胺以降低非特异性扩增. 结果表明改进的反向 PCR 具有高度的特异性和高度的灵敏性.

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系与细胞培养

KB 细胞为人口腔癌上皮细胞. 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养细胞. 用 0.25% 的胰酶消化传代.

### 1.2 质粒构建

质粒 pRP466-NEO 构建如图 1 所示.

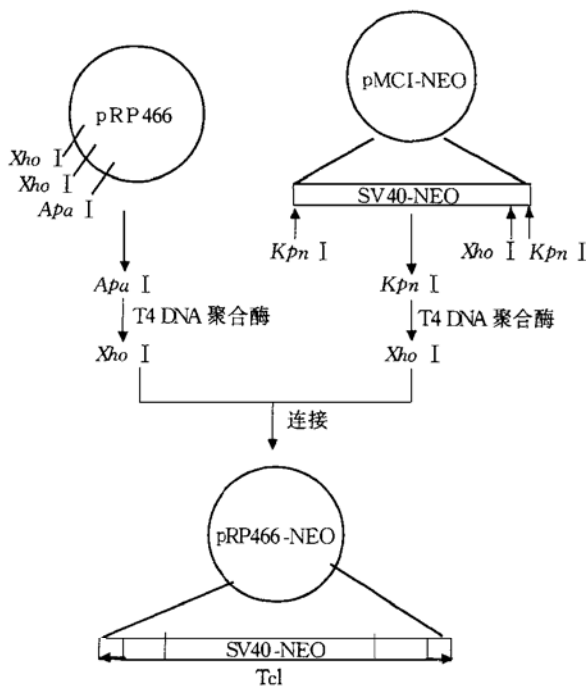


图 1 质粒 pRP466-NEO 的构建图

### 1.3 基因转染

KB 细胞转染前一天传代. 转染前用胰酶消化, 离心收集, 无血清培养基洗两次. 计数,  $4 \times 10^6$ /ml 重新悬于无血清培养基中. 取 0.5 ml 置于电转杯中, 加入质粒 pRP466-NEO, 冰上放置

10 min, 于 330 V、960  $\mu$ F 电击. 电击后于冰上放置 10 min, 然后 1:25 稀释传于细胞培养皿中. 2 d 后用含 500 mg/L G418 的选择培养基筛选, 2~4 d 换液一次, 直至抗性克隆形成. 用胰酶消化抗性克隆, 扩增培养<sup>[4]</sup>.

### 1.4 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取参照文献 [5].

### 1.5 反向 PCR 克隆 Tc1 转座子左侧反转重复序列的旁侧序列

1  $\mu$ g 基因组 DNA 用 TaqI 65℃ 消化 2 h, 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀. 取 10 ng DNA 以 20  $\mu$ l 体系, 1  $\mu$ l T4 DNA 连接酶于 12℃ 连接过夜. 取 1  $\mu$ l 连接产物作为反向 PCR 第一轮模板. 反向 PCR 的引物设计如图 2 所示. 第一轮 PCR 为 50  $\mu$ l 体系: 含 30 pmol 的引物 2、3 和 5% 的甲酰胺. 扩增条件为 94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 45 s 扩增 30 个循环. 取 1  $\mu$ l 第一轮 PCR 产物, 稀释 500 倍, 再取 1  $\mu$ l 作第二轮 PCR 的模板. 第二轮 PCR 用引物 1、4 替代引物 2、3, 其余扩增条件与第一轮相同. 扩增后于 2% 琼脂糖电泳分析 PCR 产物.

```

CA GTGCTGGCCAAAAAGATATCCACTTTT
GGTTTTTTGTGTGTAACCTTTTTT CTCAAGC
ATCCATTGACTTGAATTTTT CCGTGTGC
ATAAAGCGAAATGTTACGCCAAATTT GCG
GACCAAACATTACATGATTTA TCGA

```

引物 1: 5'-GGATATCTTTTTGGCCAGCAG-3'  
引物 2: 5'-CAAGTCAAATGGATGCTTGAG-3'  
引物 3: 5'-CCGTGTGCATAAAGCGAAATG-3'  
引物 4: 5'-GCGGACCAAACATTACATGATT-3'

图 2 Tc1 左侧末端序列及反向 PCR 引物序列  
下划线为引物序列, 四碱基为 TaqI 识别序列.

### 1.6 PCR 产物连接、测序

PCR 产物经电泳分离回收. T4 DNA 聚合酶削平, 与用 Sma I 线性化的 pBSK+ 连接, 转化 DH5 $\alpha$  细菌. 重组子经鉴定、扩增、纯化后荧光法测序.

## 2 结果与讨论

### 2.1 反向 PCR

质粒 pRP466-NEO 克隆有一个真核筛选标记 NEO 插入失活的线虫转座子 Tc1, 其两个反转重复末端旁侧各含 400 bp 的线虫基因组 DNA. pRP466-NEO 通过电穿孔法导入 KB 细胞, G418 筛选 2 周后挑取抗性克隆扩增培养, 提取基因组

DNA, 用反向 PCR 技术克隆已整合至基因组的标记转座子左侧末端的旁侧序列. 如图 3 所示, 反应体系不含甲酰胺, 一、二轮都出现许多非特异扩增条带, 而且与未连接的对照 DNA 扩增结果相似. 加入 5% 的甲酰胺后, 第一轮无扩增条带, 第二轮 PCR 能扩出单一条带, 而对照组两轮 PCR 都无扩增条带. 表明经改进的反向 PCR 特异性较高.

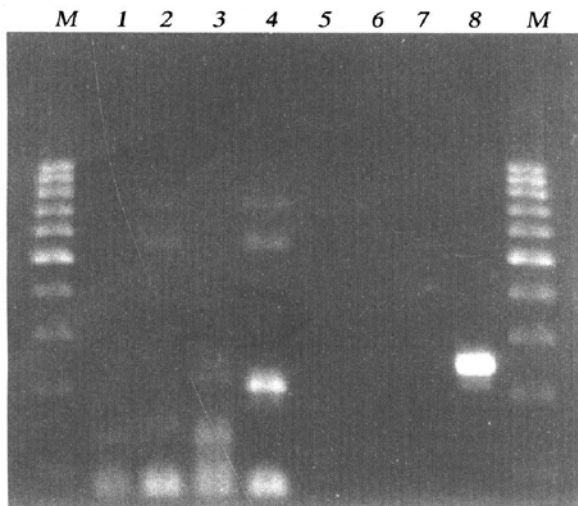


图 3 反向 PCR 电泳结果

M: 100 bp DNA ladder, 1~4: 未加甲酰胺, 5~8: 反应体系中加入 5% 甲酰胺. 1、5: 对照 DNA, 第一轮 PCR; 2、6: 对照 DNA, 第二轮 PCR; 3、7: 连接 DNA, 第一轮 PCR; 4、8: 连接 DNA, 第二轮 PCR.

## 2.2 克隆测序

回收第二轮 PCR 扩出的特异条带. 克隆至 pBSK+. 测序结果如图 4a 所示 (见图版 I). 根据测得的序列设计引物 5: 5'-AGTACGCGAC-GAGTTCTTGT-3', 用引物 1、5 扩增基因组 DNA, 连接于 T-vector 测序 (图 4b, 图版 I). 结果表明所克隆的反向 PCR 片段为 Tc1 左侧末端的旁侧序列. 图 4a 中所示, 克隆的片段包含一段 50 bp 的 Taq I 酶切片段, 表明所克隆的片段并非自连. 上网检索表明该片段为一凋亡相关基因 (Accession No. U58662) 的一部分, 由于在人基因组中该基因所占比例极小, 与我们所检测的片段连接的几率极低, 本实验能扩出这样低拷贝的模板, 说明改进的反向 PCR 体系具有较高的灵敏性.

## 2.3 讨论

巢式 PCR 技术能提高 PCR 的特异性和灵敏

度, 而甲酰胺、二甲基亚砜 (DMSO) 等能够在不影响 Taq 酶活力的情况下降低非特异性扩增, 依据以上原理改进反向 PCR 方法. 结果表明, 改进的反向 PCR 体系具有较高的灵敏性和特异性. 我们应用改进的反向 PCR 成功地克隆了另外两个 KB 细胞中 Tc1 转座子左侧末端的旁侧序列 (结果未显示), 表明该方法的重复性较好. 应用改进的反向 PCR 技术可以在两天内克隆哺乳动物基因组 DNA 的旁侧序列. 可望应用于克隆哺乳动物基因组中其他已知序列的旁侧序列.

## 参 考 文 献

- 1 Triglia T, Peterson M G, Kemp D J. A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res*, 1988, **16** (16): 8186
- 2 MacGregor G R, Overbeek P A. Use of a simplified single-site PCR to facilitate cloning of genomic DNA sequences flanking a transgene integration site. *PCR Methods Appl*, 1991, **1** (2): 129~135
- 3 Luo G, Ivics Z, Izsv k Z, *et al.* Chromosomal transposition of a Tc1/mariner-like element in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (18): 10769~10773
- 4 Lake-Bullock H, Dailey H A. Biphasic ordered induction of heme synthesis in differentiating murine erythroleukemia cells: role of erythroid 5-aminolevulinic synthase. *Mol Cell Biol*, 1993, **13** (11): 7122~7132
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 9.14~9.30

**A Modified Inverse PCR Method for Cloning the Flanking Sequences Adjacent to the Known Sequence in Human Genome.** LI Zhu-Hong, LIU De-Pei, LIANG Chih-Chuan (*National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China*).

**Abstract** A nested PCR was used to amplify the rare target sequence and 5% formamide was used to eliminate the nonspecific amplification. These modifications make clone the flanking sequence adjacent to the known sequence of human genome very effective and highly specific.

**Key words** inverse PCR, flanking sequences, clone

