

研究简报

热启动 PCR 快速制备地高辛标记探针*

李立家 张锡元 姜海波

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 介绍了一种在热启动 PCR 中, 以 Dig-11-dUTP 部分代替 dTTP, 从少量基因组 DNA 中快速制备大量的地高辛标记的探针的方法。此探针灵敏度达 0.03pg, 并只和相关的 DNA 特异杂交。

关键词 热启动 PCR, 基因组 DNA, 地高辛标记探针

常规方法从克隆的重组质粒制备探针既费时又低效。PCR 技术提供了一个从重组质粒直接快速生产标记插入片段的有效方法^[1,2]。

热启动 PCR (Hot Start PCR)^[3]是一种在起始循环反应液温度达到 70—80℃时才加 Taq 酶的方法。它能减少引物错配和引物二聚体形成, 并能增加专一性 DNA 扩增量。

本文介绍一种直接从人基因组 DNA 中扩增制备地高辛 (digoxigenin, Dig) 标记探针的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

地高辛杂交检测试剂均为 Boehringer Mannheim 公司产品, 人 Y 染色体上特异片段扩增引物 Y₃ 和 Y₄ 及 DNA Taq 酶等均购自上海复华实业股份有限公司, 杂交膜 (NC) 来自德国 Schleicher & Schuell 公司。

1.2 方法

1.2.1 人基因组 DNA 的提取 参见文献 [4]。

1.2.2 PCR 扩增制备地高辛标记探针 按下列次序在一个 Eppendorff 管中加样 (总体积 20μl): 双蒸水 9μl, 5×反应缓冲液 4μl, 引物混合物 2μl (终浓度各为 1μmol/L), dNTP 混合物 4μl (dCTP、dGTP 和 dATP 终浓度各为

200μmol/L, dTTP 为 130μmol/L, Dig-11-dUTP 为 70μmol/L), 人总 DNA 1μl (约 0.3μg), 混匀, 92.5℃变性 7min, 冷至 70—80℃迅速加入 1UTaq 酶, 再加 50μl 预热至 70—80℃的矿物油盖住液面。PCR 循环 30 次 (92.5℃变性 45s, 55℃退火 45s, 70℃延伸 90s), 最后一次 70℃延伸 5min, 然后取出矿物油, 再向溶液中加入 2.5μl 4mol/L LiCl 和 75μl 预冷的无水乙醇, -20℃过夜, 离心沉淀, 70%乙醇洗涤, 抽干溶于 TE 中 (10mmol/L Tris·HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0)。

1.2.3 膜杂交及检测 按 Boehringer Mannheim 公司产品说明书进行 DNA 斑点杂交, 68℃预杂交 2h, 杂交 8h 后显色检测。

2 结果

2.1 扩增产物电泳检测

分别以男女基因组 DNA 为模板进行地高辛掺入 PCR 扩增, 产物电泳结果见图 1。以女性 DNA 为模板无 PCR 产物, 而以男性 DNA 为模板 PCR 产生期望的一条约 446bp 的片段带。这表明结果是特异的。

* 国家自然科学基金资助课题。

收稿日期: 1993-11-29, 修回日期: 1994-03-22

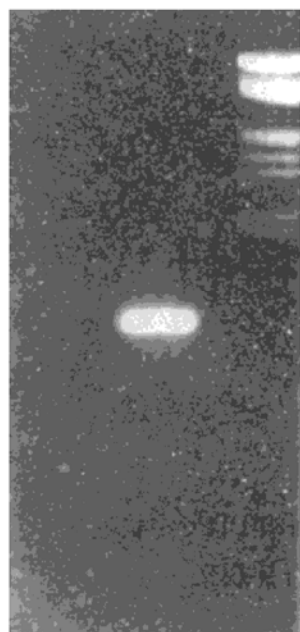


图1 PCR产物电泳图

1: 女性DNA扩增结果;
2: 男性DNA扩增结果;
3: λ Hind III.

2.2 探针灵敏度及专一性

图2表示探针与Y染色体特异扩增片段杂交结果, 显示出此探针检测的灵敏度为0.03pg. 图3表明探针与男性DNA杂交呈阳性, 而与女性DNA无杂交信号, 这进一步说明此探针杂交是特异的.

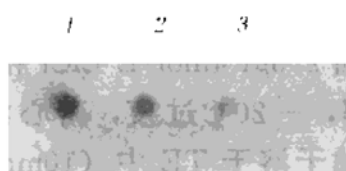


图2 探针灵敏度检测

1: 3pg; 2: 0.3pg; 3: 0.03pg.

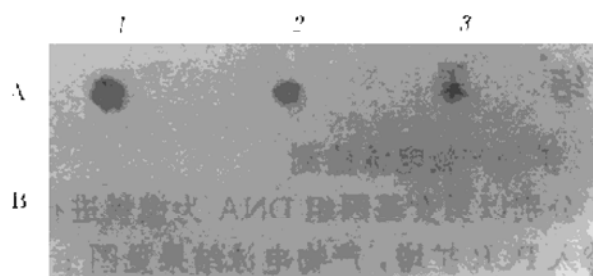


图3 探针专一性检测

A: 男性DNA; B: 女性DNA; 1: 5 μ g;
2: 1 μ g; 3: 0.1 μ g.

3 讨论

本实验直接以人基因组DNA为模板, 地高辛PCR掺入制备大量探针, 不需先克隆目的基因. 当然若有克隆的重组质粒也可以直接以它们为模板扩增制备探针^[1,2]. 本研究中热启动PCR扩增结果没有产生非特异片段和引物二聚体. 热启动PCR为高效简捷的PCR探针标记法的广泛应用提供一定的技术保证.

本研究中杂交温度68°C, 时间8h, 表明获得的探针灵敏度(0.03pg)和特异性是高的.

PCR扩增制备的探针可以不必纯化直接用于许多杂交试验. 它也可以通过乙醇沉淀(本试验)后溶解于TE中, 在4°C稳定保存1年以上.

此技术提供的探针长度一致, 专一性高, 片段较小, 能很好地适用于原位杂交技术^[5].

参考文献

- 1 Y-M D Lo, Mehal W Z, Fleming K A. *Nucleic Acids Res.* 1988; **16** (17): 8719
- 2 Tabibzadeh S, Bhat U G, Sun X. *Nucleic Acids Res.* 1991; **19** (10): 2783
- 3 D' Aquila R T, Bechtel L J, Videler J A *et al.* *Nucleic Acids Res.* 1991; **19** (13): 3749
- 4 Peasse M J, Morency C A, Holm M *et al.* *Immunol Lett.* 1988; **18**: 219
- 5 Koch J E, Kolvraa S, Petersen K B *et al.* *Chromosoma*, 1989; **98**: 259

nisms could be detected. This suggests that mycoplasma contamination to cell cultures can be detected by PCR.

Key words PCR (polymerase chain reaction), mycoplasma, contamination, cell culture

Rapid Production of Digoxigenin Labeled Probes by Hot Start PCR. Li Lijia, Zhang Xiyuan, Jiang Haibo. (*Life Science College of Wuhan University, Wu Han 430072*). *Prog.*

Biochem. Biophys. (China), 1994; 21 (6): 557—558

A method for generating a nonradioactive digoxigenin labeled probes is described. It was achieved by substituting the dTTP with Dig-11-dUTP and utilizing human genome DNA as template during the Hot Start PCR.

Key words Hot Start PCR, genome DNA, digoxigenin labeled probes

征订启事

《生物工程进展》

欢迎订阅

欢迎刊登广告

中国生物工程学会会刊《生物工程进展》，创刊于1976年，是我国第一家中央级综合性生物工程大型刊物。

《生物工程进展》综述报道国内外生物工程高技术领域的重大研究进展，刊载学术报告、动态、生物工程专利、国际学术交流信息、商业生物技术情报，介绍国内外生物工程政策、规划以及我国发展生物工程及产业化的对策，报道经济建设主战场上的生物工程消息、人物，宣传生物工程企事业单位和新技术新产品，为促进我国生物工程高技术及产业发展提供全方位多层次多侧面的服务。该刊物曾两次获得中国科学院科技进步奖。

《生物工程进展》的主要读者对象是：生物工程领域科研院所、大专院校、科技企业、大

中型企业和乡镇企业、各级科委、各地高新技术产业开发区以及生物工程计划决策与服务部门的科技工作者和管理人员。

《生物工程进展》为双月刊，16开64页，每期定价4.00元，全年订价24.00元，北京市邮局邮发代号82—673，全国各地邮局均可订阅。

编辑部现编辑有《生物工程信息快报》(月刊)，报道国内外生物工程科研与产业最新消息、最新成果、专利、商情动态，每期工本费8.00元，全年订价96.00元，订阅者请向《生物工程进展》编辑部(北京市中关村科学院南路8号，邮政编码100080)索取订单或直接汇款订阅。