

研究快报

单引物预掺入 PCR 与抗体可变区基因的体外放大*

兰风华

(南京军区福州总医院医学检验中心, 福州 350001)

梅田真郷 井上圭三

(东京大学药学部, 日本东京 113)

摘要 用针对引导序列的 5'-引物和针对恒定区的 3'-引物, 常规 PCR 程序只使所选 5 株单抗 10 个可变区 cDNA 中的 4 个得到放大. 新设计的程序增设了一个反应时相: 94℃ 1min, 37℃ 6—8min, 循环 1—3 次, 只加入 5'-引物. 补充 3'-引物后, 转入常规 PCR 循环. 10 个可变区 cDNA 均获放大. 此程序被命名为“单引物预掺入 PCR”.

关键词 PCR, 抗体, 可变区基因, 引物

为进行抗体可变区基因的 PCR 放大, 需设计针对引导序列 (leader sequence) 和恒定区 (靠近可变区部分) 的引物. 1991 年以来, 美国 Novagen 公司以 Larrick 等^[1,2]的研究为基础, 以试剂盒形式推出一组小鼠抗体 (含轻、重链) 可变区基因的 PCR 引物 (Ig-prime Kit Protocols, Novagen, 800-526-7319), 如表 1 所

示. 其中, 5'-引物针对引导序列, 与 mRNA 同义; 3'-引物针对恒定区, 与 mRNA 反义. 已经证明, 由于在设计时参考了 Kabat^[3]数据库中大量已知的小鼠免疫球蛋白序列, 并引进了简并性——在引物的某些位点可以是一种以上的碱基, 这组引物具有通用性.

表 1 小鼠抗体可变区基因的 PCR 引物

引物名	碱基序列 (5' 至 3')
重链 5'-A	GGAATTCATG(AG)A(CG)TT(CG)(GT)GG(CT)T(AC)A(AG)CT(GT)G(AG)TTT
重链 5'-B	GGAATTCATG(AG)AATG(CG)A(CG)CTGGGT(CT)(AT)T(CT)CTCTT
IgM 重链 3'	CCCAAGCTTACGAGGGGAAGACATTTGGGAA
IgG 重链 3'	CCCAAGCTTCCAGGG(AG)CCA(AG)(GT)GGATA(AG)ACIG(AG)TGG
轻链 5'-A	GGAATTCATG(AG)AG(AT)CACA(GT)(AT)C(CT)CAGGTCTTT
轻链 5'-B	GGAATTCATGGAGACAGACACTCCTGCTAT
轻链 3'	CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA

注: 1. 括号示简并位点, 在引物合成时, 括号内的碱基等机会掺入此位点; 2. 划线部分为附设的 EcoR I 或 Hind III 识别顺序; 3. I=inosine.

在研究一组 (共 5 株) 正常 BALB/C 小鼠来源的单克隆自身抗体时, 我们试图解析其可变区的基因序列. 为此首先需对可变区 cDNA

进行 PCR 放大. 实验完全按 Larrick 等及 No-

* 日本 Sasagawa 医学奖学金资助.

收稿日期: 1994-08-04, 修回日期: 1994-09-08

vagen 公司说明书提供的方法进行, 即: 以总 RNA 为模板、Oligo (dT) 为引物合成 cDNA; PCR 体系: cDNA 5 μ l, dNTP 各 0.2mmol/L, 5'-引物 50pmol, 3'-引物 25pmol, Taq 酶 1U, 总体积 50 μ l, 循环参数: 94 $^{\circ}$ C, 1min; 50 $^{\circ}$ C, 2min; 72 $^{\circ}$ C, 2min; 共 25—35 循环。结果是 5 株单抗的 10 个可变区 cDNA 中只有 4 个得到体外放大, 说明上述方法和引物并非完全“通用”。

究其原因, 我们认为有些免疫球蛋白的引导序列变异稍大, 使 5'-引物在通常的退火温度 (50 $^{\circ}$ C) 下不能与相应第一 cDNA 链有效退火。我们设想, 应先在低退火及延伸温度下, 让 5'-引物掺入第二 cDNA 链 (second strand cDNA)。一旦产生掺入了 5'-引物的第二 cDNA 链, PCR 放大便无需再依赖第一 cDNA 链, 排除了引导序列变异性的影响。据此, 我们在常规 PCR 循环前增设一个反应时相: 94 $^{\circ}$ C, 1min; 37 $^{\circ}$ C, 6—8min; 循环 1—3 次。在低至 37 $^{\circ}$ C 的退火延伸温度下, 5'-引物的退火将可耐受引导序列的变异, 凭保守序列形成有效退火, 引导第二 cDNA 链合成; 因 Taq 酶在 37 $^{\circ}$ C 下的延伸速度仅每秒钟为 1.5 个核苷酸^[4], 而可变区一般长 350 碱基左右, 故退火延伸时间合定为 6—8min; 增加循环次数, 可提高第二 cDNA

链拷贝数; 为保证特异性, 暂不加入 3'-引物。此时相之后, 将反应管骤冷至 4 $^{\circ}$ C, 补入 3'-引物, 进入常规 PCR 循环。图 1 是采用上述设想的实验结果: 所有 10 个可变区 cDNA (重、轻链各半) 均获得放大。

至此, 我们实际上设计并验证了一个新的 PCR 程序, 它有四个特点: a. 大体上分为两个反应时相; b. 在第一反应时相里, 退火及延伸在 37 $^{\circ}$ C 下进行; c. 两个引物在不同时间点进入反应体系; d. 特异性主要由稍后加入的一侧引物来保证。简言之, 先让一侧引物在低温下掺入目的 DNA 的互补链, 然后补入另一侧引物, 依常规 PCR 循环将目的 DNA 放大。综合这些特点, 我们将此新程序命名为“单引物预掺入 PCR”。新程序不仅扩展了表 1 所列引物的通用性, 还为引物设计及其它基因的 PCR 提供了思路。

参 考 文 献

- 1 Larrick J W, Danielsson L, Brenner C A *et al.* Biochem Biophys Res Com, 1989; 160: 1250
- 2 Coloma M J, Larrick J W, Ayala M *et al.* Biotechniques, 1991; 11: 156
- 3 Kabat E A, Wu T T, Reid-Miller M *et al.* Sequences of proteins of immunological interest, 4th ed. Washington: US Department of Health and Human Services, 1987
- 4 Innis M A, Myambo K B, Gelfand D H *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1988; 85: 9436

Single Primer Pre-incorporation PCR and Amplification of Antibody Variable Region Gene. Lan Fenghua (Clinical Laboratory Diagnostics Center, PLA Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350001, China); Masato Umeda, Keizo Inoue (Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Tokyo 113, Japan).

Abstract Using 5'-primers corresponding to leader sequence, 3'-primers to constant region, and conventional PCR protocol, only 4 out of 10 variable region cDNAs of the 5 monoclonal antibodies were amplified. A novel

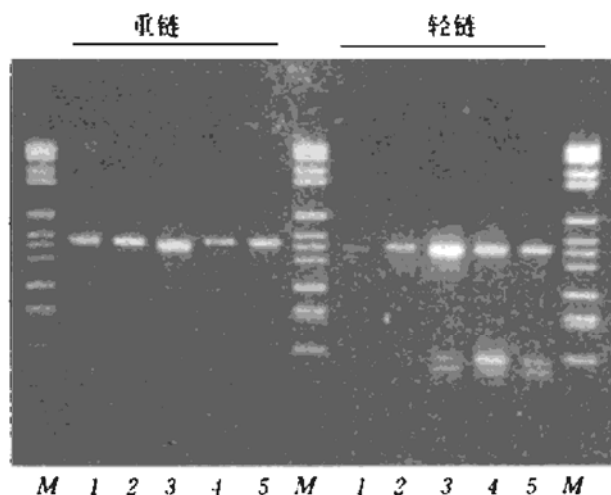


图 1 5 株单抗的单引物预掺入 PCR

1—5 为 5 株单抗代号; M 为 DNA 分子量对照, 自下而上: 154, 220, 234, 298, 394, 453, 517, 653, 1033, 1230, 1766, 2176bp。

protocol was designed and tested which included one more time phase of reaction: 94°C 1min, 37°C 6—8min, 1—3 cycles, with 5'-primer but no 3'-primer. Conventional PCR cycles started after 3'-primer was supplemented. As a result, all 10 variable region

cDNAs were successfully amplified. This novel protocol was named "single primer pre-incorporation PCR".

Key words PCR, antibody, variable region gene, primer

Ca²⁺对蝮蛇蛇毒溶血毒素构象的影响

郑 乐 冯 波 周元聪 阮康成

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 利用荧光光谱学对 BPLA₂ 和 Ca²⁺ 相互作用的研究表明, Ca²⁺ 在 BPLA₂ 中十分重要. 在 Ca²⁺ 存在时, 底物与 BPLA₂ 的结合使酶中色氨酸残基周围的环境变得较为疏水, 荧光发射谱蓝移达 9nm, 而无 Ca²⁺ 存在时却无此现象发生; 实验证明 BPLA₂ 分子中有一较强的疏水区, Ca²⁺ 可明显增强这一区域的疏水性; 另外, 我们还发现 Ca²⁺ 与酶的结合与酶中唯一的 His 残基有关.

关键词 溶血毒素, 荧光光谱, 构象

近来, 我们^[1,2]在研究中性及酸性磷脂酶 A₂ 的基础上, 用荧光光谱学方法研究了蝮蛇蛇毒溶血毒素即碱性磷脂酶 A₂ (BPLA₂), 发现 Ca²⁺ 与 BPLA₂ 的构象及功能明显有关, 且与我们在酸性和中性磷脂酶 A₂ 的研究中观察到的结果显著不同, 也与 Ohno 等在研究来自黄绿烙铁头蛇 (*Trimeresurus flavoviridis*) 的磷脂酶 A₂ 有明显不同, 现特作简要报导如下:

研究中所用的 BPLA₂ 系按武祥福等^[3]报道的方法从江浙产蝮蛇 (*Agkistrodon halys Pallas*) 蛇毒中分离, 经 RP-HPLC、毛细管电泳及分析型等电聚焦鉴定为一高纯度蛋白. 用 NBS 滴定的方法测得 BPLA₂ 分子中含 2 个 Trp. 荧光测定系在 Hitachi F-4010 上进行.

1 在 Ca²⁺ 存在时, BPLA₂ 的底物卵磷脂与酶的结合明显改变酶的内源荧光特性 (图 1), 使其荧光发射谱最大值从 348nm 移至 339nm, 表明在此条件下 BPLA₂ 中色氨酸残基周围的环境变得较为疏水; 而无 Ca²⁺ 或只有 Ca²⁺ 而无卵磷脂时, 则没有上述现象发生 (图

中没有给出). 这表明底物卵磷脂与 BPLA₂ 的

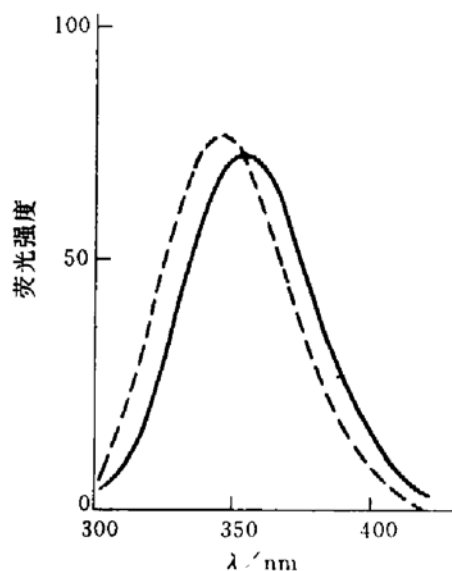


图 1 卵磷脂对 BPLA₂ 荧光谱的影响

——: 无卵磷脂, ---: 含卵磷脂, BPLA₂ 浓度: 7.1 μmol/L, Ca²⁺ 浓度: 10 mmol/L, 激发光波长: 295 nm.