

被转录, 导致形成又一组 10 个大小不同的片段如 76 nt、146 nt、...、706 nt 等 (图 2b), 图 2a 表明, 核酶自切割产物大小与理论推算值是相符的。由此可见, 这种等梯度分子质量大小排列带可以作为其他 RNA 小分子的分子质量参照物。

3 讨 论

RNA 分子质量标记制备方法通常由体外转录工程质粒获得, 在传统的制备方法中, 每个标准分子均来自不同的质粒载体转录获得, 因此非常耗时而且成本昂贵。尽管 Audic 等^[2]用同一载体在不同的限制酶作用后转录获得了不同长度的 RNA 分子质量标记, 似乎在一定程度上能满足实验的要求。但因一个转录反应中同时含有几种模板, 转录产物背景混杂, 作为分子质量标记不很理想, 而且需要先纯化每种模板, 再按比例混合, 也是一种很费时费钱的方法。有些研究者^[3]曾经利用顺式切割核酶也制备出 RNA 小分子质量标记, 而因其克隆策略的缺陷不能提供较大范围的分子质量标记。在本实验中, 利用某些限制酶的作用特点巧妙地克隆了多体自切割核酶基因的质粒, 体外转录后, 10 体核酶发生自切割。成功地制备了 70 nt 至 706 nt 的 RNA 分子质量标记范围, 若以 70 nt、76 nt 为一组带, 那么每组带之间均相差 70 nt, 是一套等距离 RNA 分子质量参照物。由于它们是由一个全长转录物自切割形成的小分子, 因此, 带形整齐美观, 避免了因模板过多转录带来的不利背景。总之, 从整个制备过程看, 制备方法简单, 快速, 省时省钱, 是一种非常实用的 RNA 小分子质量标记制备方法。

参 考 文 献

- 1 Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 644~ 647
- 2 Audic Y, Omilli F, Osborne H B, *et al.* Design and use of easily mad RNA size markers. *BioTechnique*, 1997, **23** (4): 612~ 616
- 3 Boreman J, Altschuler M. Simple method to produce RNA size markers using cis ribozymes. *BioTechnique*, 1995, **18** (3): 404 ~ 406

A New Method for Quickly Preparing Small RNA Molecular Mass Marker. DENG Wen-Sheng, YANG Xi-Cai, KANG Liang-Yi (*Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*); ZHANG Feng-Xue, FU Lin-Chun (*Institute of Tropical Medicine, Guangzhou Traditional Chinese Medicine University, Guangzhou 510407, China*).

Abstract A self-cleaving ribozyme was comprised of a hammerhead ribozyme and its target sequence located the downstream of the hammerhead ribozyme. The self-cleaving ribozyme gene was synthesized, amplified and cloned into the Bluescript SK plasmid. The construct harboring 10 copies of the self-cleaving ribozyme gene was obtained through successively cloning for four times. The result of polyacrylamid denatured gel electrophoresis showed: the multimeric ribozymes caused self-cleaving during the transcription reaction *in vitro* and formed RNA step ladders from 70 nt to 706 nt, which indicates that the self-cleavage ribozyme transcripts can be used as RNA molecular mass markers.

Key words hammerhead ribozyme, self-cleaving, transcription *in vitro*, RNA molecular mass marker

用均匀设计优化 apo E 基因的 PCR 扩增方案*

朱 滨¹⁾ 王国荃 陈 坚

(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054)

摘要 由于 PCR 影响因素多, 获得理想扩增结果比较困难, 有必要寻找一种简单有效的方法建立最佳扩增体系。针对 Mg^{2+} 浓度、二甲基亚砜 (DMSO) 浓度、变性时间、延伸时间、循环次数等因素进行 4 因素 6 水平和 6 因素 10 水平均匀设计实验优化 apo E 基因 244 bp 片段的 PCR 扩增条件。采用纯化模板和简易模板, 只需 6~

* 国家卫生部青年科技人才基金和新疆卫生厅科技人才基金共同资助项目。

¹⁾ 中国科学院上海冶金研究所 8710 室, 上海 200050. Tel: (021) 62511070-8710, E-mail: zhubin@itsvr.sim.ac.cn

收稿日期: 1999-06-21, 修回日期: 1999-10-08

10 次实验即可获得特异性、高产率扩增结果。研究表明, 将均匀设计用于 PCR 条件优化以及有关的样品处理、试剂选择等研究方面可以避免盲目性, 迅速获得满意结果。

关键词 均匀设计, PCR, 基因, apo E, 优化

学科分类号 Q781

以基因组 DNA 为模板进行选定片段的 PCR 扩增已成为生命科学日常研究工作的重要内容之一^[1]。虽然 PCR 的概念是简单的, 但由于影响因素有许多, 扩增效果却很难把握。为了获得理想的扩增效果, 目前普遍的做法是根据经验确定一个起始条件, 然后根据实验结果调整某一个或某几个因素, 使结果逐步接近最佳^[2]。由于许多影响因素的可变范围较大, 彼此间又存在着交互影响, 实验结果常常存在极大的偶然性。

实验设计是解决这类问题的有效途径。对于多因素、多水平的试验来讲, 利用人们熟悉的正交实验设计来安排实验虽然比全面试验次数大大地减少了(需进行水平数的平方次实验), 但仍嫌过多。而在正交设计的基础上发展的均匀设计(uniform design)^[3]由于具有实验次数少(与水平数相等)、布点均匀、结果可靠、易学易用等特点更适合于像 PCR 这样多因素多水平实验的优选方案设计。本文利用均匀设计对人 apo E 基因的 PCR 扩增条件进行了优化研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 仪器: Gene CyclerTM PCR 扩增仪和 Power Pac 3000 电泳仪均为美国 Bio-Rad 公司产品, Imaging Master VDS 凝胶成像系统为美国 Pharmacia 公司产品。

1.1.2 试剂: 细胞裂解液、核酸裂解液、蛋白质沉淀剂和 DNA 分子质量标准均购自 Promega 公司。Taq 酶、RNase、Hha I 内切酶、4 × dNTP 以及二甲基亚砜(DMSO)均购自华美生物工程公

司。MgCl₂, 分析纯, 成都化学试剂厂。其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 的制备: 取全血 300 μl 加入 900 μl 细胞裂解液, 上下转动离心管 5~6 次, 室温放置 10 min, 13 000 g 离心 20 s。弃上清液, 离心管内留 10~20 μl 液体, 震动管壁, 悬起沉淀的白细胞。加入 300 μl 核酸裂解液, 吸打 5~6 次, 以裂解白细胞。加入 0.5 μl RNase, 上下转动离心管, 37 °C 放置 15 min。待反应液冷至室温, 加入 1 000 μl 蛋白质沉淀液剧烈震荡 10~20 s。室温 13 000 g 离心 3 min, 将上清液转至一新离心管中。加入 300 μl 异丙醇, 轻轻转动离心管至白色丝状沉淀出现, 13 000 g 离心 1 min。小心吸去上清, 然后加入 70% 乙醇 300 μl, 温和地上下转动数次, 室温 13 000 g 离心 1 min, 小心地吸去乙醇, 室温放置 10~15 min, 加入 100 μl TE 缓冲液, 放置过夜使溶。将上述溶液在 260 nm 处测定吸光度(A), 按 A 值 × 50 mg/L 换算为浓度。

1.2.2 PCR 扩增: 利用扩增引物 5'-ACAGAAT-TCGCCCCGGCCTGGTACAC-3' 和 5'-TAAGCTTG-GCACGGCTGTCCAAGGA-3', 本文主要考察了 Mg²⁺、DMSO 浓度以及复性温度和循环次数等四个因素对 apo E 基因 244 bp 片段扩增结果的影响。根据试验要求, 将每个因素分成 6 个水平(表 1)。对于 4 因素 6 水平的均匀实验设计, 可以选择 U₇(7⁶) 的均匀表来安排实验, 具体扩增条件列入表 2 中 1~6 管。取 PCR 扩增产物 15 μl 上样至 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 25 mA 恒流电泳 3 h, 用 0.5 mg/L EB 染色约 30 min, 紫外灯下观察, 拍照。

表 1 利用均匀设计优化 apo E 基因 PCR 扩增方案的因素和水平

因素	水 平					
	1	2	3	4	5	6
c (Mg ²⁺) / mmol·L ⁻¹	1.50	1.75	2.00	2.25	2.50	2.75
t (复性温度) / °C	50	53	56	59	62	65
循环次数/次	23	26	29	32	35	38
DMSO 浓度/ %	0	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5

表 2 apo E 基因片段的 PCR 扩增条件

条件	扩增管编号										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
10 × buffer/ μl	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
c(4 × dNTP)/ μmol·L ⁻¹	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
c(Mg ²⁺)/ mmol·L ⁻¹	1.50	1.75	2.00	2.25	2.50	2.75	2.25	2.25	2.00	2.25	2.50
DMSO 浓度/ %	12.5	10.0	7.5	5.0	2.5	0	7.5	5.0	5.0	5.0	7.5
引物 1/ pmol	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
引物 2/ pmol	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
模板 DNA/ μg	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Taq 酶/ U	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
V (终体积) / μl	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
循环次数	29	38	26	35	23	32	35	25	35	35	25
t (变性温度) / °C	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94
t (变性时间) / s	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
t (复性温度) / °C	53	59	65	50	56	62	50	50	50	60	60
t (复性时间) / s	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
t (延伸温度) / °C	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72
t (延伸时间) / s	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60

2 结 果

以基因组 DNA 为模板进行 4 因素 6 水平 PCR 优化实验的结果见图 1a。从图 1a 可见，泳道 4 的 244 bp 条带清晰、明亮，且非特异扩增带较少，

对该扩增产物用内切酶 *Hha* I 切割，可以得到 91 bp、83 bp、48 bp 等特征条带，与文献 [4] 一致，这证明图中 244 bp 条带确为特异的 apo E 基因扩增产物。

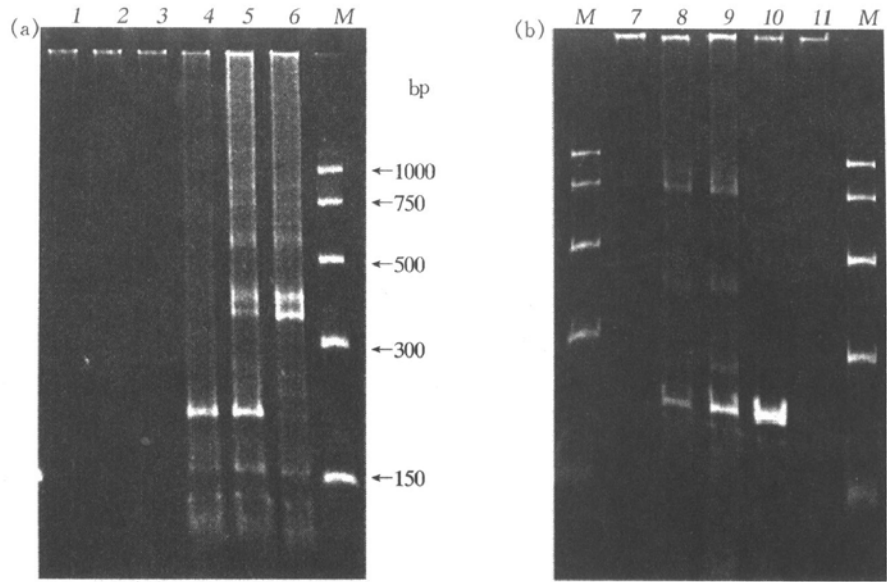


图 1 不同条件对 apo E 基因片段 PCR 扩增结果的影响

(a) 用均匀实验设计进行第一次优化的实验结果; (b) 第二次优化的实验结果。1~11 泳道的 apo E 基因片段 PCR 产物扩增条件对应于表 2 中 1~11 管所列条件; M: 分子质量标准。

虽然同一 PCR 扩增结果可能因为扩增目的不同而导致不同评价结果，但单一的特异性高产率扩增结果无论对于何种扩增目的都是十分理想的。由于影响 PCR 结果的因素很多，每个因素的可变范

围大。当更换样品来源、制备方法、仪器、试剂或当需要扩增某种新基因片段时，常常需要重新建立合适的 PCR 扩增条件。若从经验出发，当扩增结果不理想时特别是当扩增结果为阴性时，确定进一

步优化的方向是十分困难的,有时需要为此进行数十次试验.而均匀设计由于在多因素多水平间均匀布点,可以只用很少的试验获得优化方向,经进一步优化后可迅速找到最优扩增条件.本研究通过均匀设计,经6次PCR试验获得了图1a所示结果.在3个阳性扩增结果中以泳道4结果最好,因此可以假定最佳扩增条件就在泳道4对应的条件周围.由于各种条件的交互影响,可以肯定最优解不是唯一的.改善泳道4的扩增效果可以采用提高复性温度、增加变性剂DMSO的浓度、减小 Mg^{2+} 浓度或减小扩增次数等方法.为此经第2次寻优试验(表2中7~11管)获得了图1b所示的扩增结果.显然泳道10的扩增结果无论对于何种扩增目的都是比较理想的.

3 讨 论

将均匀设计用于PCR反应,需解决的首要问题是如何选择确定因素和水平.虽然影响PCR的因素有许多,但Finckh等^[5]将主要因素归纳为9种,并给出了推荐值.在一定范围内优化上述条件是十分必要的,但由于这些因素之间存在着较强的交互作用,只要具体问题具体分析,可以只对较少的因素进行优化而获得理想的扩增效果.在本研究中,考虑到a.模板DNA中常可能混有一些可与 Mg^{2+} 形成络合物或复合物而降低其有效浓度的大分子物质,使Taq酶的聚合活性受到影响.此外,不同大小、结构片段的扩增对酶活性的要求不同,

间接要求 Mg^{2+} 浓度不同;b.模板DNA有时会由于空间结构的原因而被封闭,难以启动特异性的PCR反应.适量的DMSO不仅可以破坏空间封闭效应而增加这些片段扩增的灵敏度和效率,还可减小非特异扩增.但过量的DMSO会阻断引物与模板的退火,使扩增失败;c.较高的复性温度可以提高引物与模板的复性严格性而减小非特异扩增.但若复性温度过高,则导致扩增失败.此外,DMSO的存在与否对复性温度的影响也不相同;d.循环次数不仅影响目的片段的扩增产量,也影响非特异扩增的多少;我们选取了 Mg^{2+} 浓度、DMSO的浓度以及复性温度、循环次数等四个因素为apo E基因片段扩增时优化对象.对于大于5 000 bp的长片段DNA的扩增,在因素的选择上还应当加上Taq酶浓度和延伸时间等因素.对于某些特殊样品,在因素的选择上也应具体分析.例如我们曾将一长期冷冻存放的抗凝血样融化,离心分离白细胞,加双蒸水裂解,高速离心,取上清液作为模板,按前述方案扩增,结果为阴性.考虑到长期贮存的血样只经简单方法处理,所得模板可能夹杂有许多抑制扩增的物质,可采用高变性温度削弱其活性.但高变性温度会使Taq酶活性下降影响延伸速度,因此变性时间和延伸时间也需优化.加上前边提到的4个因素,应进行6因素10水平均匀设计实验(表3).结果在管1上对应的条件下获得了244 bp的阳性扩增产物.

表3 简易模板 apo E 基因片段的 PCR 扩增条件

条件	扩增管编号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$c (Mg^{2+}) / mmol \cdot L^{-1}$	1.5	1.75	2.0	2.25	2.5	2.75	3.0	3.25	3.5	3.75
DMSO/%	1.5	4.5	7.5	10.5	13.5	0	3.0	6.0	9.0	12.5
循环次数	36	34	32	30	28	26	24	22	20	18
t (变性温度) / $^{\circ}C$	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96
t (变性时间) / s	14	20	26	10	16	22	28	12	18	24
t (复性温度) / $^{\circ}C$	56	66	54	64	52	62	50	60	48	58
t (延伸时间) / s	50	30	65	45	25	60	40	20	55	35

注: 其他扩增条件同表2.

决定了因素数以后,根据文献、经验或预实验确定各因素的考察范围.若考察范围较大,在实验中又能做到,可将各因素水平数分成均匀表中确定的 n 个水平.若考察范围较小,不宜分成 n 个水平时可以将水平数少者循环一次或多次达到 n 个水平.在水平的划分上还应注意在实验中能控制的精

度,若水平的控制精度差,则可能导致水平间无差异,无法获得正确优化结果.

均匀实验设计用于与PCR有关的样品处理方法、试剂选择等研究方面可以避免盲目性,获得事半功倍的效果.

参 考 文 献

- 1 Collins F S, Patrinos A, Jordon E, *et al.* New goals for the U. S. human genome project: 1998 ~ 2003. *Science*, 1998, **282** (5389): 682~ 689
- 2 Rychlik W, Spence W J, Rhoach R E, *et al.* Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucl Acids Res*, 1990, **18** (21): 6409~ 6412
- 3 曾昭钧. 均匀设计及其应用. 沈阳: 辽宁人民卫生出版社, 1994. 1~ 219
Zeng Z J. Uniform Design and Its Application. Shenyang: Liaoning People's Health Press, 1994. 1~ 219
- 4 Schachter F, Faure Delanef L, Guenof F, *et al.* Genetic associations with human longevity at the Apo E and AEC-loci. *Nature Genetics*, 1994, **6** (1): 29~ 32
- 5 Finckh U, Rolf A. PCR optimization strategies. In: Boehringer Mannheim ed. PCR Application Manual. Mannheim: Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, 1995. 36~ 41

Optimization of the Amplified Conditions for Human Apo E Gene Fragment by Uniform Design.

ZHU Bin, WANG Guo-Quan, CHEN Jian
(Pharmacy College, Xinjiang Medical University,
Urumuqi 830054, China).

Abstract PCR is now one of the key procedure in the field of molecular biology, but too many things affect the PCR result. Sometimes, a lot of PCR optimization experiments must be done before satisfactory results are obtained. So an optimization project with minimum times of test is needed. Uniform Design is what can meet this requirement. For 244 bp fragment in human apo E gene, the optimization of the amplified conditions included concentration of Mg^{2+} , concentration of DMSO, denature time, annealing temperature, elongation time, number of cycles based on Uniform Design was reported. The results show that a set of PCR conditions with specific, high yield amplified product can be obtained for purified template or simple-treated template by 6~ 10 times of optimization experiment. The Uniform Design is useful for the optimization of PCR conditions.

Key words uniform design, PCR, gene, apo E, optimization

定量 RT-PCR 中人干细胞因子的 RNA-CRS 的构建*

谭文斌 聂怡玲 罗赛群 郭小珊 成光杰 陈汉春 朱定尔¹⁾

(湖南医科大学分子生物学研究中心, 长沙 410078)

摘要 一种适用于定量 RT-PCR、用 Exonuclease III 部分酶切剔除技术, 构建人干细胞因子 (hSCF) 基因的 RNA 竞争性参考标准 (RNA-CRS) 的新方法: 用 RT-PCR 技术, 从 HepG2 细胞中扩增出全长人 hSCF cDNA, 并克隆入质粒 pGEM-T 获重组的 pGEMSCF 载体, 经 Exonuclease III 和 S1 核酸酶适当处理, 以导致 hSCF cDNA 中一小片段缺失, 由此获得重组 pGEMSCF 模拟体 (mimic), 经体外转录得到 hSCF RNA-CRS. 测序表明: 该 RNA-CRS 与 hSCF mRNA 比较, 缺失了从第 499 位至 608 位共 110 个核苷酸, 但二者 RT-PCR 反应可用同一对扩增引物, 反应动力学极为相似. 这种 hSCF RNA-CRS 可作为一种较理想的竞争性参考标准, 适用于定量 RT-PCR 中, 以对重组 hSCF 在真核细胞中的表达水平进行准确的定量分析. 此方法亦可推广应用于其他真核基因的表达水平及/或调控的检测和研究.

关键词 基因表达定量, 定量 RT-PCR, 人干细胞因子基因

学科分类号 Q7

定量 RT-PCR 是当前精确定量分析基因表达的一种快速、敏感的方法, 它与传统的 RNA 分析法相比具有许多优越性: a. 敏感性高, 比传统 RNA 印迹杂交技术敏感 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 倍; b. 特异性高, 在扩增过程中选用一严格的内标准可以使相差仅一个核苷酸的两个模板区分; c. 能快速分析大量样本, 比其他技术更能满足当今发展的需要^[1].

由于在 PCR 扩增的指数期内很小的扩增效率

会极大地影响产量, 所以定量 RT-PCR 必须设立一定的 RNA 竞争性参考标准 (RNA competitive reference standard, RNA-CRS) 与目的基因一同进行逆转录和扩增才能获得可靠的定量信息.

* 国家自然科学基金 (39700050) 和 China Medical Board (CMB No. 99-698) 资助项目.

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (0731) 4474411-2547, E-mail: mbrc@public.cs.hn.cn

收稿日期: 1999-06-07, 修回日期: 1999-10-15