

- [4] Sgonc R, et al., 1994, *Allergy Immunol.*, 105: 327—332.
 [5] Palayoor ST, et al., 1995, *Radiat Res.*, 141: 235—241.

- [6] Bicknell GR, et al., 1994, *J Cell Science.*, 107: 2483—2489.
 [7] Ling CC, et al., 1994, *Radiother Oncol.* 32: 129—36.

IRRADIATION-INDUCED APOPTOSIS OF BONE MARROW HEMATOPOIETIC CELLS IN MICE; A STUDY OF TIME- AND DOSE-EFFECT RELATIONSHIPS IN VIVO

ZOU Zhong Min et al.

(Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

ABSTRACT

By means of flow cytometry and DNA electrophoresis, in this experiment we investigate that in what extent apoptosis was taken by the radiation injured-bone marrow hematopoietic cells (BMHCs) of 4—10Gy γ -ray irradiated-mice. The significant time-and dose-effect relationships of radiation-induced apoptosis of BMHCs was found. The peak values of apoptosis induced by 6Gy and 8Gy radiation were about 30%, and by 4Gy and 10Gy radiation 20%. The time needed to reach the peak was shortened correspondingly when dose increased, shown as 12, 8, 4 and 4h for 4, 6, 8 and 10Gy irradiation respectively. The results demonstrate that apoptosis is an important cell death pathway taken by the radiation-injured BMHCs in vivo, so further investigation on the regulation of apoptosis would highlight the mechanism of radiation-induced hematopoiesis dysfunction.

Key Words: Radiation injury Hematopoietic cell Apoptosis Flow cytometry Mouse

影响反转录过程多种因素的探讨*

邢永娜 卢大儒 邱信芳 薛京伦

(复旦大学遗传学研究所 上海 200433)

离体反转录系统的研究是分子生物学中一项重要的实验技术。这一技术的完善对 RT-PCR 检测的特异性、准确性,以及构建 cDNA 文库的完整性,5'-RACE、3'-RACE 的精确性都很关键。随着 RT-PCR 技术在发育学、肿瘤研究、表达调控研究中的应用及推广,这一技术得到广泛的应用。我们在研究这一系统中体会到反转录过程的特异性、准确性除了决定于合适的温度、酶的特异性、RNA 模板的完整与纯度、RNA 二级结构的破坏以及引物的特异性等因素。特别值得一提的是,巢式引物可以很有效地避免 5'-RACE、3'-RACE 产生假阳性带,这

一点对基因的差异表达的研究^[1]以及新基因的克隆^[2]具有实际意义。本文即探讨影响反转录过程的各种因素。

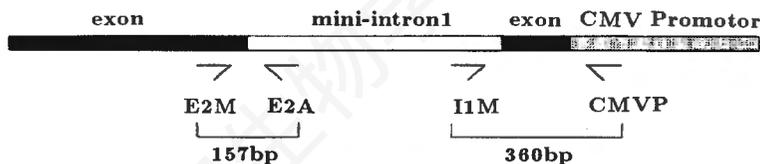
材料和方法

1. 材料

(1) DNA 引物 1) 反转录病毒载体 G1NaC-i'-IXR 上引物顺序^[3]CMVP; 5'-CGTTTAGTGAAC-CGTCAGATCGCC-3', 负链引物; iIM; 5'-ACTTAC-CAACCTGCGTGCTGGC-3', 正链引物; E2A; 5'-

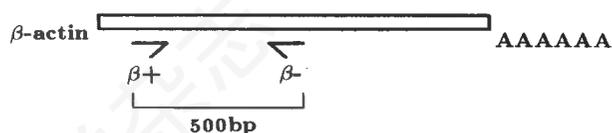
* 国家“863”高技术发展计划和国家自然科学基金资助项目

GAAATTGGCTTTCAGATTAT-3', 负链引物; 链引物。引物位置如下图所示。
E2M, 5'-GGCCGATTCAGAATTTTGTGGC-3', 正



反转录病毒载体的部分顺序及引物的位置

2) β -actin mRNA 引物顺序 +: 5' GTGGGC-CGCCTAGGCACCAA3', -: 5' CTCTTTGATGT-CACGC-ACGATTTC3'。引物位置如下图所示。



β -actin mRNA 上的引物位置

(2) 其他材料 FD 高温反转录酶(复旦大学遗传所提供), 该酶从高温温泉的一种耐热菌中提取, 该酶的特点是在高温时反转录活性稳定, Reverse Transcription System, 所用反转录酶为 AMV 反转录酶(Promega 公司); Taq 酶(复旦大学遗传所提供); 细胞总 RNA 样品, 一步抽提法制备^[4]; 反转录病毒载体(本实验室构建)。

2. 方法

(1) FD 高温反转录酶的 RT 反应 20 μ l RT 液中含 25mmol/L Tris-HCl (pH8.8)、25mmol/L (NH₄)₂SO₄、100 μ g/ml 明胶、dNTP(每种 dNTP 的浓度为 500 μ mol/L)、25pmol 引物、1mmol/L MgCl₂、1 μ l RNA 模板、2UFD 高温反转录酶, 混匀后 95 $^{\circ}$ C 温育 5min, 以适当的退火温度温育 5min, 65 $^{\circ}$ C 温育 10min 后立即置于冰浴中, 留待作 PCR 反应。由于 FD 高温反转录酶可以在高达 85 $^{\circ}$ C 的条件下反应, 所以 95 $^{\circ}$ C 变性后, 退火和延伸温度都适当提高。

(2) AMV 反转录酶的 RT 反应 RNA 模板、RNase free 的 dH₂O、负链引物(1 μ l)混合液 11 μ l, 置于 70 $^{\circ}$ C 水浴中变性 10min。然后立即置于冰浴中冷却 5min, 并在冰浴上加入 dNTP 混合液 2 μ l(每种 dNTP 的浓度为 10mmol/L, 终浓度为 1mmol/L), 25mmol/L MgCl₂ 4 μ l(终浓度为 5mmol/L), 10 \times RT buffer 2 μ l, 15U AMV RT 酶, 25U RNasin, 混匀。37 $^{\circ}$ C 反应 15min, 42 $^{\circ}$ C 反应 30min, 立即置于冰浴中 15min, 留待作 PCR

反应。

(3) PCR 反应 25 μ l PCR 反应液中含 25mmol/L Tris-HCl (pH8.8)、25mmol/L (NH₄)₂SO₄、100 μ g/ml 明胶、dNTP 混合液(每种 dNTP 的浓度为 200 μ mol/L)、15pmol 引物、1.5mmol/L MgCl₂、2 μ l RT 反应产物、5% 甲酰胺、2U Taq 酶, 混匀后 95 $^{\circ}$ C 温育 5min, 适当的退火温度退火 30 秒。然后以 70 $^{\circ}$ C 1.5min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 秒, 退火 30 秒为一循环, 扩增 30cycles。最后 70 $^{\circ}$ C 5min 补齐。PCR 产物上样 8 μ l 进行琼脂糖胶电泳检测。

结果和讨论

从 PA317 G1NaC-i'-IXR 包装细胞上清收集 G1NaC-i'-IXR 病毒粒子, 抽提得其 RNA 样品, 并以此为材料研究影响 RT-PCR 的各种因素; 利用抽提的细胞总 RNA 为材料, 研究 β -actin mRNA RT-PCR 的各种影响因素。下面从温度、酶的特异性、模板的处理以及引物方面总结了 RT-PCR 实验技术的体会。

1. 温度对反转录过程的影响

以 G1NaC-i'-IXR 病毒 RNA 为模板, E2A 为引物, 改变退火温度, 用高温反转录酶进行反转录实验。由于 E2A 引物用来作 PCR 反应时, 理想的退火温度为 45 $^{\circ}$ C, DNA 链和 RNA 链配对时的退火温度要高于相应的 DNA 链和 DNA 链的退火温度, 所以作反转录时, 要采用比较高的退火温度。实验分别采用 55 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C 两种退火温度, 延伸温度都为 65 $^{\circ}$ C。用反转录产物为模板, 进行 PCR 反应, 电泳结果如图版图 1 所示。当退火温度为 55 $^{\circ}$ C 时, 157bp 的片段比较淡, 还有 4 条杂带; 当退火

温度为 65℃ 时,只得到一条 157bp 的片段。所以该引物作反转录时,退火温度采用 65℃,反应的特异性和准确性都很好。温度低时,由于引物的非特异性结合而产生一些杂带。另外,高温可以破坏 RNA 的二级结构,避免其对反转录过程的影响,提高特异带的信号强度。

2. 酶的特异性对反转录过程的影响

当用细胞总 RNA 为模板反转录 β -actin mRNA 时,分别采用 FD 高温反转录酶和 Promega 公司 Reverse Transcription System 的 AMV 反转录酶。用高温反转录酶时,由于 β -actin 引物的高 G-C 比,因而退火温度采用 75℃。反转录产物为模板进行 PCR 反应,对比两种酶的反应结果。电泳结果如图版图 2 所示。

对细胞总 RNA 进行 β -actin mRNA 的 RT-PCR 反应时,应该得到 500 bp 的片段。用高温反转录酶时,500 bp 条带很弱,且有三条杂带。而用 AMV 反转录酶时,得到特异性很好的 500 bp 条带。由于退火温度在此过程中影响不大,所以非特异性带的出现可能是由于酶本身引起的。FD 高温酶是新开发的酶,尚需摸索其反应的最佳条件。

3. 模板的纯度和模板处理对反转录过程的影响

以细胞总 RNA 为模板,用 AMV 反转录酶反转录 β -actin mRNA。因为总 RNA 的抽提液 solD 成分比较复杂,若混入 RNA 样品,会影响反转录的效果而使产生杂带。将抽提的 RNA 样品用 1/10 体积的 3mol/L pH4.0 NaAc 和等体积的异丙醇重新沉淀,并用 75% 的乙醇洗净,这样的模板作反转录反应可以得到特异性很好的条带,如图 3 所示。用 AMV 反转录酶进行反转录时,由于反应温度比较低,为 37℃ 和 42℃,反应之前若处理不当,RNA 模板容易形成二级结构,或模板与引物之间有非特异性结合,所以,反应前的处理很重要。模板与引物混合液在 70℃ 处理 10min 可以充分破坏 RNA 的二级结构,且引物和模板可以准确配对。70℃ 处理后,样品要迅速置于冰水浴上冷却 5 min 以

上,反应体系的其它成分也要预先冷却,并在冰水浴上加入,以防止温度的变化引起二级结构重新形成或引物的非特异性结合。如果这一处理过程未做好,冷却不充分,其他样品未预先冷却即加入,也会使一些非特异性条带出现,如图版图 3 所示。

4. 巢式引物可以有效地提高反应的特异性

用反转录病毒 RNA 为模板,用 CMVP 作反转录引物,用 CMVP、I1M 作 PCR 引物,应得到 360 bp 的片段。用高温酶进行反转录时,退火及延伸温度从 75℃ 一直提高到 85℃,仍未消除杂带,360 bp 的带也不明显,图版图 4(b,c) 分别显示退火温度为 80℃ 及 85℃ 的情况。即使用 AMV 反转录酶,并严格地处理模板,尽管 360 bp 的带很明显,且用 BamHI 酶切特异性地得到 275 bp 和 85 bp 片段,但仍有淡的杂带出现,如图版图 4(a) 所示。为探讨 RT-PCR 反应的特异性,以 E2A、E2M 为引物,以不同退火温度得到的高温反转录酶反转录产物为模板,进行 PCR 反应,都得到唯一的 157 bp 的特异带,而无其它杂带,如图版图 4(d) 所示。AMV 反转录酶的反转录产物为模板进行 PCR 反应,也得到唯一的 157 bp 特异带(电泳图未示)。所以可以推得,PCR 过程采用与反转录过程不一样的引物(这里称为巢式引物)时,可以很有效地提高产物的特异性;而如果采用相同的引物时,由于反转录过程中产生的非特异性产物亦被同一引物扩增,而使整个 RT-PCR 过程的特异性大为降低。

摘 要

本文探讨了影响反转录反应的各种因素。温度的适当提高和模板的严格处理可以破坏 RNA 的二级结构,并提高引物的特异性结合;模板的纯度可以避免杂质对酶的特异性的影响;巢式引物可以在 PCR 过程中很有效地避免反转录过程中产生的非特异性产物的扩增,而

提高最终产物的特异性。

关键词:RT-PCR 巢式引物

参 考 文 献

[1] Elwyn Y. Loh, John F. Elliott, et al., 1989,

Science., **243**:217-220.

[2] Zhu Chen, Nigel J. Brand, et al., 1993, *The EMBO Journal.*, **12**:1161-1167.

[3] Shinji Yoshitake, et al., 1985, *Biochemistry.*, **24**:3736-3750.

[4] Chomczynski P, et al., 1987, *Analytical Biochemistry.*, **162**:156-159.

FACTORS EFFECT ON REVERSE TRANSCRIPTION PCR

XING Yong Na LU Da Ru QIU Xin Fang XUE Jing Lun

(*Institute of Genetics, Fudan University, 200433*)

ABSTRACT

This paper described several factors effect on reverse transcription PCR. The denaturing and annealing temperature, RNA template, reverse transcriptase and nested primer were described, discussed and recommended.

Key words: RT-PCR Nested primer

实验技术

用 NAG 酶活性荧光测定法检测 3T3 细胞增殖及其应用

丁焕文 何锡焯* 苏增贵

(广州军区广州总医院骨科 510010)

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是一种在体内分布广泛、生理功能重要的生长因子^[1],最近因发现其与多种组织如软组织^[2]、软骨组织^[3]、骨组织^[4]、神经组织^[5]等的损伤修复过程有关而愈来愈受到重视。在研究 bFGF 过程中,建立一种快速、敏感、有效的 bFGF 生物活性鉴定方法相当重要,本实验根据许多组织细胞中均含有一种溶酶体酶——N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl- β -D-glucosaminidase),该酶能使底物 4-甲基伞形酮-乙酰氨基葡萄糖苷(4-methyl-um-

belliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide, 4MU-NAG)分解产生荧光物质 4-甲基伞形酮(4-methyl-umbelliferyl, 4MU)的原理而建立一种新的 bFGF 生物活性鉴定法——3T3 细胞 NAG 酶活性荧光测定法,取得了较好的结果。现将实验方法及结果报告如下。

本课题受全军 95 青年基金部分资助,课题编号 96Q017。

* 第三军医大学西南医院外科教研室,重庆, 400038。