

从体外扩增约2 kb长的DNA片段看四种dNTPs和TaqDNA聚合酶对PCR的影响

袁亚萍 蒋志成* 聂慧玲

(中科院上海细胞生物学研究所 200031)

PCR(聚合酶链反应)是1985年才问世的一项体外选择性基因扩增技术^[1]。它具有简便、快速、特异、灵敏的特点,因而在分子生物学的基础研究、应用研究、医学和法医学等许多领域中都得到了广泛的应用。关于其原理和应用国内外已有许多报道^[2-5]。

PCR扩增DNA片段的特异性基于两个寡聚核苷酸引物。影响PCR产物特异性和得率的因素很多^[2-3];如退火温度、退火和延伸的时间、引物和酶的浓度、 Mg^{2+} 浓度、四种dNTPs的浓度等。

我们利用PCR扩增正常人生长激素基因旁侧的两个约1.9 kb长的DNA片段和两个单纯性生长激素缺乏症1A型(IGHD 1A,这种病是由于两个生长激素等位基因的缺失引起的)病人的1918 bp片段,发现四种dNTPs和Taq DNA聚合酶对PCR产物的特异性和得率有较大的影响,适当地控制dNTPs和TaqDNA聚合酶的浓度,可以得到理想的结果。

材料和方法

一、材料和试剂

两个IGHD 1A型病人外周血,由瑞金医院儿科实验室王德芬教授提供。

引物:(1) 5'GGATCCAGCCTCAAAGAGCTTAC 3'

(2) 5'GAATTCCCAGAGCCTTGAGCAATGGA 3'

由上海细胞所王应魁老师化学合成。

PCR所用Taq DNA聚合酶和试剂为Promega

公司产品,四种dNTPs是Sigma公司产品,由自己配制而成。

二、方法

从正常人和IGHD 1A型病人的外周血白细胞制备基因组总DNA,PCR在100 μ l体积中进行:1 μ g的基因组总DNA,两个引物各1 μ M, dATP、dGTP、dCTP和TTP各240 μ M, 50 mM KCl, 10 mM Tris·HCl(25 $^{\circ}$ C时pH 9.0), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% gelatin (W/V), 0.1% Triton X-100, 样品上面覆盖一层矿物油, 样品置94 $^{\circ}$ C变性10分钟, 然后加入2.5 u的Taq DNA聚合酶进行循环反应。整个PCR过程是手工操作,所用仪器为上海医疗器械七厂的DKB-8 D型电热恒温水槽。每个循环包括1.5分钟60 $^{\circ}$ C退火, 3分钟72 $^{\circ}$ C延伸和1.5分钟94 $^{\circ}$ C变性。在反应进行到15—20个循环时,补加60 μ M的四种dNTPs混合物和2.5 u的Taq DNA聚合酶。30个循环反应结束后,在72 $^{\circ}$ C延伸10分钟,从PCR产物中取出5 μ l用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

结果与讨论

在所述条件下,我们可看到清晰的1900 bp左右的一条电泳带(图1),正常人PCR产生1900 bp和1921 bp两片段,在1%琼脂糖凝胶电泳上分不开,病人只出现1918 bp一条带。这三种大小相近的不同片段可用SmaI酶切检测(结果未附),我们用这种条件一直可以得到比较稳定而理想的结果。

如果反应中不补充60 μ M的四种dNTPs和2.5 u的Taq DNA聚合酶,得到的产物量

* 瑞金医院儿科实验室。