

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。

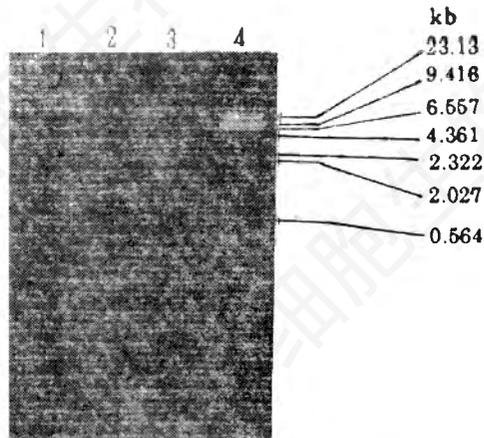


图 1 PCR 产物的电泳检测

4. λ DNA (Hind III) (0.5 μ g); DNA 分子量标记
3. 正常人, 1900 bp, 1921 bp (重叠在一起)
- 1, 2 两个 IGHD1 A 型病人, 1918 bp

非常少, 这是因为在扩增较长片段的反应后期循环中, 实际参与反应的四种 dNTPs 和 Taq DNA 聚合酶不足所致; 如果只在第 15—20 个循环时补充 2.5 u 的 Taq DNA 聚合酶, 得到的产物量也较少 (图 2); 如果在第 15—20 个循环时补充 60 μ M 的四种 dNTPs, 但反应中酶活力不够时, 得到的产物量也很少, 而且分子量较小的产物相对很多 (图 3)。这说明反应确实需要较多的 Taq DNA 聚合酶和四种 dNTPs, 其中之一的不足都导致所需产物量的减少。而如在反应开始时一次性地加入 5 u 的 Taq DNA 聚合酶, 在第 15—20 个循环时补加 60 μ M 的四种 dNTPs, 除得到 1900 bp 的主要产物外, 还得到约 900 bp 的一条带 (关于这一条带所含的 DNA 情况, 尚待进一步分析)。这表明在有充足的 dNTPs 量的情况下, 反应开始时一次性加入较多酶, 会增加引物和模板 DNA 错配的机会, 使非特异性的 DNA 片段得到扩增 (图 4)。从图 3 的 PCR 产物中取出 1 μ l 作为模板, 再按所述“标准条件”进行一次 PCR 反应, 结果 900 bp 左右的产物甚至要多于 1900 bp 左右的产物。这可能是因为在第一次 PCR 的产物中已含有一定量的约 900 bp 的 DNA, 在第二次 PCR 中, 由于其片段较短,

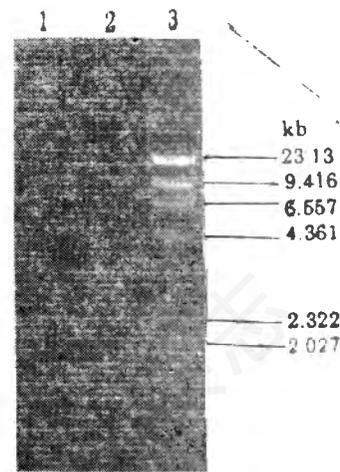


图 2 不同条件下的 PCR 结果

3. λ DNA (Hind III) (0.5 μ g); DNA 分子量标记
2. 4 \times dNTPs 240 μ M, Taq DNA 聚合酶 2.5 u, 在第 15 个循环时再补充 2.5 u 的 Taq DNA 聚合酶
1. 4 \times dNTPs 240 μ M, Taq DNA 聚合酶 2.5 u, 反应过程中不再补充 Taq DNA 聚合酶和四种 dNTPs

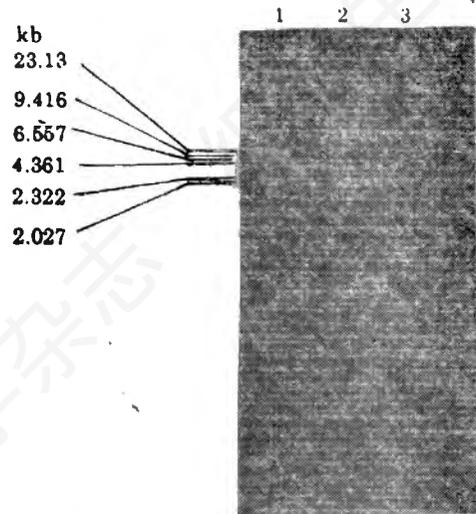


图 3 不同条件下的 PCR 结果

1. λ DNA (Hind III) (0.5 μ g); DNA 分子量标记
- 2, 3. Taq DNA 聚合酶活力不足, 但循环过程中补充 60 μ M 的四种 dNTPs

在同样的条件下扩增得到更多的产物 (图 4)。

因此我们认为: 进行 PCR 时不应墨守文献中的现成条件, 而应根据自己的情况对实验条件重新进行优化。对于要扩增比较长的 DNA 片段, PCR 所需四种 dNTPs 和 Taq DNA 聚

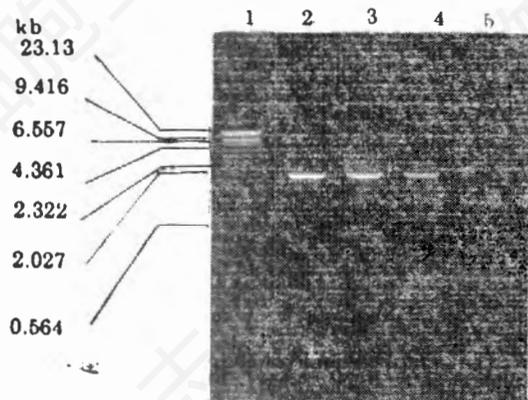


图4 不同条件下的PCR结果

1. λ DNA(Hind III)(0.5 μ g); 分子量标记
2. 先加 2.5 u Taq DNA 聚合酶, 在第 15 个循环时补加 2.5 u Taq DNA 聚合酶和 60 μ M 的 4 \times dNTPs.
- 3,4. 反开应 始时一次性加入 5 u Taq DNA 聚合酶, 在第 15 循环时补加 60 μ M 的 4 \times dNTPs
5. 从图 3 的 PCR 产物中取 1 μ l 代替模板 DNA 再进行一次 PCR 反应

注: 图中各孔是从 100 μ l 反应体积中取 14 μ l 电泳检测

合酶量要多一些, 我们采用在循环反应过程中间补加适量的 dNTPs 和 Taq DNA 聚合酶, 得

到的产物基本上就是我们所需的 DNA 片段。这种做法也许对用 PCR 扩增较长的 DNA 片段有借鉴作用。

摘 要

影响 PCR 产物特异性和得率的因素很多, 本文从实验得到的结果出发, 对用 PCR 钓出较长 DNA 片段时 dNTPs 和 Taq DNA 聚合酶对其特异性和得率的影响进行了讨论。

参 考 文 献

- [1] Saiki R. K. et al., 1985, *Science*, 230: 1350.
- [2] Henry A. Erlich, 1989, "PCR Technology-Principles and Applications for DNA Amplification" Stockton Press; p 7-15.
- [3] Michael A. Innis et al., 1990, "PCR Protocols -A Guide to Methods and Applications" Copyright © by Academic Press, Inc. p 3-13.
- [4] Cindy L. Vnencak-Jones et al, 1990, *J Clin Endocrinol Metab.*, 70: 1550-1551.
- [5] 杨香娇等, 1990, 中国科学(B辑) 5: 497-502.

人体骨髓长期培养基质细胞中 AgNOR 染色方法的应用

洪华山 陈志哲 吕联煌

(福州, 福建省血液病研究所 350001)

人体骨髓细胞长期培养(HLTBMC)方法为体外研究造血及造血细胞和基质细胞之间的关系提供了最好的模型, 近 10 年来, 国内外对基质细胞进行了形态学、细胞化学、免疫学、细胞外基质及超微结构等多方面的研究^[1]。但尚未见应用 AgNOR (核仁组成区嗜银蛋白^[2]) 染色于 HLTBMC 中的报道。AgNOR 能反映细胞核结构及功能变化, 平均每个核内 AgNOR 数目的多少与细胞增殖活性及 rDNA 转录等有关^[3,4]。因此应用 AgNOR 染色于 HLTBMC

动态观察基质细胞核结构与功能变化, 可能成为探讨基质细胞的增殖、分化、成熟以及基质细胞之间关系的一种新的方法。本文报道 AgNOR 于 HLTBMC 基质细胞动态变化的方法学应用并就有关问题进行讨论。

材 料 与 方 法

一、研究对象 5 例正常骨髓按常规在本所抽取并经肝素抗凝的髂后上棘骨髓液。

二、人体骨髓细胞长期培养 按 Dexter 培养体系

稍改进,具体方法见陈志哲等^[5]报道。我们用6孔培养板(Nunc Denmark)培养,接种前每孔先放入一无菌盖玻片,接种的细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,每孔植入3 ml。置 33°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 饱和温度的二氧化碳培养箱培养,每周换半液。

三、于培养的第2、4、6周分别取出一盖玻片,轻轻以PBS(pH 7.2)冲洗,丙酮固定5分钟后行AgNOR染色。

四、AgNOR染色按Crocker^[6]报道稍改进,过程如下:

1. 染色液配制: A、2克明胶(上海明胶厂)溶于1%甲酸溶液使之成为2%甲酸明胶溶液。B. 硝酸银配制成50%溶液。

2. 将上述A、B两溶液以1:2体积比混匀后滴加于固定后的细胞上。在室温下避光染色15—20分钟后以去离子水冲洗,再以Mayer's苏木素复染。在油镜下观察基质细胞核内的AgNOR颗粒数目及其类型、分布。

结 果

一、正常骨髓经培养后,基质细胞即贴壁生长至3—4周呈融合状态(Confluence)。基质细胞的形态可分为多角扁平细胞、纤维母细胞、巨噬细胞等。

二、基质细胞核内的AgNOR颗粒呈黑色小颗粒,有主核仁颗粒(相当于核仁部位)和卫星核仁颗粒(分散于核内)两种类型。培养2周时(细胞未融合),基质细胞的AgNOR比培养4周时(细胞已融合)的多(见图版图1,2)同时多角扁平细胞的AgNOR比纤维母细胞多(见图版图1)。巨噬细胞的AgNOR大多为1个,亦有多达4—6个者。6周与4周比较无明显变化。

讨 论

正常骨髓细胞在体外培养的基质细胞生长过程与文献报道一致^[1],即培养3—4周基质细胞就融合。Underwood^[4]认为某群细胞AgNOR数目的多少与其细胞增殖活性、rDNA转录活动和细胞倍体数等有关。本文培养2周时基质细胞AgNOR数目比4周多可能是基质细胞在体外的分化成熟导致其增殖活性及rDNA转录活动下降所致,或是由于细胞的融

合产生接触性抑制所引起。另外,多角扁平细胞的AgNOR比纤维母细胞多,可能是前者的增殖活性较高。巨噬细胞的AgNOR数目的不同,或许与这种细胞的异质性或者处于不同的功能状态有关^[7]。在染色方法方面,有两点值得注意:

一、细胞固定剂的选择

我们曾比较了应用甲醇或丙酮作为固定剂的效果,以丙酮固定效果更好,固定时间3—5分钟,待丙酮未完全干前以去离子水冲洗后再做AgNOR染色。这是基质细胞AgNOR染色的重要环节之一。按上述步骤固定、染色后,核内的AgNOR颗粒清晰可见,否则,可能由于培养体系中含有小牛血清和马血清以及解体细胞的碎片聚集,影响结果的清晰度。

二、AgNOR染色的时间

文献报道在组织切片上染色时间多在30—60分钟。但在基质细胞中的应用,本文方法以20分钟左右效果最佳。染色时间过长,会引起AgNOR颗粒聚集影响其数目的计算。究其原因可能是切片的组织比培养的贴壁单层细胞厚而所需的染色时间较长。

摘 要

本文报道在长期培养的人体骨髓基质细胞的AgNOR的染色方法,讨论了AgNOR染色过程中的某些注意事项,并认为AgNOR可作研究体外骨髓基质细胞的增生、分化、成熟及其它们之间关系的一种新手段。

参 考 文 献

- [1] Charbord, P et al., 1986, *Nour. Rev. Fr. Hematol.*: 28. 65.
- [2] Ploton, D et al., 1986, *Histochem. J.*, 18: 5.
- [3] 王瑞年等, 1989, 国外医学肿瘤学分册, 16: 22.
- [4] Underwood, J. C. E., et al., 1983, *J. Pathol.*, 155: 95.
- [5] 陈志哲等, 1991, 细胞生物学杂志, 13(4): 182.
- [6] Crocker, J et al., 1987, *J. Pathol.*, 151: 111.
- [7] 高玉民等, 1987, 白求恩医科大学学报, 13(5): 472.