

## 技术与方法

# 一种优化的 PCR 方法 —— 降落 PCR 扩增目的基因

万 兵<sup>1</sup> 闫 杰<sup>2</sup> 季明春<sup>1</sup> 张利宁<sup>3</sup> 申厚凤<sup>1</sup> 陈志琳<sup>1</sup>

(1,扬州大学医学院,扬州,225001; 2,北京地坛医院,北京,100011)

(3,山东大学医学院,济南,250012)

**摘 要** 目的:尝试用一种新的 PCR 方法——降落 PCR 扩增目的基因。方法:在构建人 CD137 - hIgG1Fc - pCDNA3 融合蛋白真核表达载体以及在检测 HBV 多聚酶 YMDD 变异的过程中运用降落 PCR 扩增目的基因。结果:扩增出的特异性条带与目的基因大小一致。结论:降落 PCR 省却了常规 PCR 中摸索最适退火温度的过程,对一些 T<sub>m</sub> 值相近的 PCR 反应可应用一套温度程序扩增,是一种行之有效的 PCR 方法。

**关键词** 优化;降落 PCR;退火温度

中图分类号:R446.61 文献标识码:A 文章编号:1007 - 6514(2002)02 - 0127 - 03

多聚酶链式反应(PCR)是在模板 DNA、引物和 4 种脱氧核糖核苷酸存在的条件下依赖 DNA 聚合酶的酶促反应<sup>[1]</sup>。在实验室日常工作中经常出现两种情况:一种是因未找到最佳扩增条件导致产生大量非特异性产物,另一种情况是未扩增出任何产物。影响 PCR 的因素很多,除了受 PCR 仪器性能的制约外,也取决于反应体系和反应条件的设置,其中 Mg<sup>2+</sup> 浓度、缓冲液 pH 值、循环条件等因素尤为重要,而循环条件中的退火温度又是至关重要的因素。降落 PCR 是一种设计多循环以使相连循环的退火温度越来越低<sup>[2]</sup>,从而达到最佳扩增条件的方法。我们在构建人 CD137 - hIgG1Fc - pCDNA3 融合蛋白真核表达载体以及在检测 HBV DNA 多聚酶基因突变的过程中运用降落 PCR 进行了扩增目的基因的尝试。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒

含有人 CD137 全长 cDNA 序列的 pCDNA3 质粒(CD137 - pCDNA3),由 Herbert Schwarz 教授惠赠;含 hIgG1 Fc cDNA 的 PGEM - T 质粒由

第二军医大学曹雪涛教授惠赠;HBV DNA,从 6 位慢性 HBV 感染者血清中抽提获得。试剂:PCR 试剂盒购自上海生工生物工程公司。引物:扩增人 CD137 胞膜外区的引物 P1:5'CCC AAG CTT ATG GGA AAC AGC TGT TAC 3',P2:5'AAA CTG CAG CTG CGG AGA GTG TCC TG 3';扩增 hIgG1Fc 的引物 P3:5'AAA CTG CAG TCT TGT GAC AAA ACT CAC 3',P4:5'CCC GAA TTC TCA TTT ACC CGG AGA CAG 3',扩增 HBV DNA 多聚酶的第一轮引物 P5:5'TTC CCC CAC TGT CTG GCT TTC AGT CAT 3',P6:5'ATA CCC AAA GAC AAA AGA AAA 3',第二轮引物 P7:5'TTC CCC CAC TGT CTG GCT TTC AGT CAT 3',P8:5'ATA CCC AAA GAC AAA AGA AAA 3'由上海生工生物工程公司合成。

### 1.2 降落 PCR 扩增目的基因

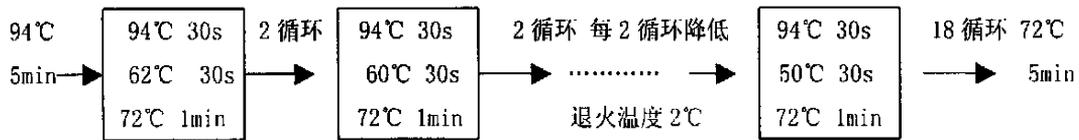
反应体积为 50μl,人 CD137 胞膜外区基因的 PCR 扩增体系:CD137 - pCDNA3 质粒 4μl,P1,P2 各 0.5μmol/L,MgCl<sub>2</sub> 2mmol/L,dNTP0.4mmol/L,Taq 5U;hIgG1Fc 片段的 PCR 扩增体系:含人 hIgG1Fc 的 PGEM - T 质粒 4μl,P3、P4 各 0.4μmol/L,MgCl<sub>2</sub> 2mmol/L,dNTP0.4mmol/L,Taq 5U;HBV DNA 多聚酶基因的 PCR 扩增体系,第一轮:HBV DNA 模板 4μl,P5、P6 各 0.25μmol/L,MgCl<sub>2</sub> 1.5mmol/L,

收稿日期:2001 - 11 - 13

作者简介:万 兵(1975 - ),男,江苏江都市人,硕士研究生,发表论文 3 篇。

dNTP0. 2mmol/L ,Taq 0. 8U ,第二轮:取 5 倍稀释的第一轮 PCR 产物 4μl 为模板 ,P7、P8 各 0. 25μmol/L ,MgCl2 1. 5mmol/L ,dNTP0. 2mmol/

L ,Taq 0. 8U。 分别在各灭菌 PCR 管加入上述各反应成分 ,100 煮沸 5min ,立即冰浴 5min ,加入 Taq DNA 聚合酶 ,混匀 ,离心 ,PCR 程序如下 :



取 10μl PCR 扩增产物 ,在 2 %或 3 %琼脂糖凝胶上电泳 ,紫外灯下观察扩增产物。

### 2 结果

分别扩增出大小为 558bp、708bp 和大小为 116bp 的特异性片段 ,与人 CD137 胞膜外区、hIgG1Fc 片段和 HBV DNA 聚合酶基因大小一致。见图 1、2。

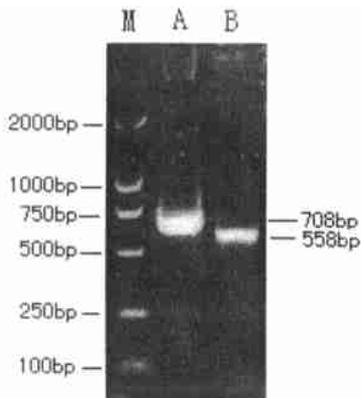


图 1 降落 PCR 扩增目的基因

M:marker ,A:人 CD137 胞膜外区 ,B: hIgG1Fc 片段 ,琼脂糖浓度为 2 %

的退火温度越来越低 ,从而达到最佳扩增条件的方法<sup>[3]</sup> ,反应过程中起始退火温度高于 T<sub>m</sub> 值 ,随着循环的进行 ,退火温度逐渐降低到 T<sub>m</sub> 值 ,从而确保第一个引物 - 模板杂交事件发生在最互补的反应物之间 ,退火温度最终低于 T<sub>m</sub> 值。退火温度的范围可跨越 15 ,从高于 T<sub>m</sub> 5 至低于 T<sub>m</sub> 10 左右 ,条件允许的话 ,退火温度可以 1 或 0.5 递降。尽管退火温度最终会降低到非特异性杂交的 T<sub>m</sub> 值 ,但此时目的扩增产物已开始几何扩增 ,在剩余循环中将超过任何非特异性产物的扩增量。降落 PCR 是一种潜在的一步法找到最佳退火温度的方法<sup>[4]</sup> ,对于 T<sub>m</sub> 值相近的 PCR 反应可在同一循环条件下进行 ,大大提高了工作效率<sup>[5]</sup>。

在降落 PCR 过程中需要采用热启动的方法<sup>[6]</sup> ,模板量一般为 10<sup>4</sup> ~ 10<sup>5</sup> 拷贝。如果未检测到产物或产物带很弱 ,可以采取以下措施 :将反应产物在恒定退火温度下再反应 10 个循环并重新分析 ;在恒定的退火温度下对起始 DT PCR 产物的 10 倍稀释物 (1:10 ~ 1:1000) 重新作 30 个循环的扩增 ;使用更多的模板量 ,并在原始 PCR 混合物中掺入一定稀释度的阳性模板检测其中是否存在抑制物 ;改变缓冲液各成分的浓度 (pH、Taq 聚合酶、dNTP、引物) ;在 PCR 混合物中加入增强剂 ;用嵌套式引物重新扩增第 1 次 PCR 产物的稀释物 (1:10 ~ 1:1000) ;放弃此套引物 ,重新设计引物扩增。

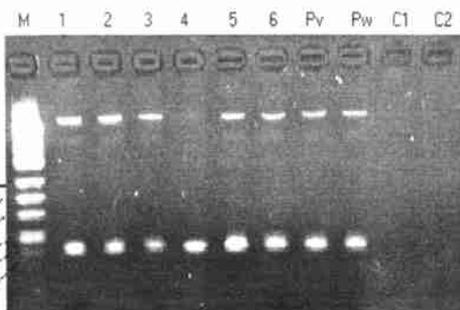


图 2 降落 PCR 检测 HBV DNA 聚合酶基因突变

M:marker ,1 ~ 6:从 6 位慢性 HBV 感染者血清中抽提 HBV DNA 进行 PCR 电泳条带 ,Pv:变异株对照质粒 ,Pw:野毒株对照质粒 ,C1:第一轮 PCR 空白对照 ,C2:第二轮 PCR 空白对照 ,琼脂糖浓度为 3 %

如果观察到许多产物带或高分子量成片产物 ,可采取以下措施 :提高 DT PCR 的最高退火温度和最低退火温度 ,使其范围上移 ;减少最低退火温度条件下的循环次数 ;使各退火温度下的循环数增加一个 ,如 3 个循环 1 ,同时减少较低退火温度或恒定退火温度循环的次数以防过多循环形成成片产物 ;改变缓冲液各成分的浓度 (pH、Taq 聚合酶、dNTP、引物) ;纯化产物带后重新扩增 ;用嵌套式引物重新扩增第 1 次 PCR 产物的稀释物

### 3 讨论

降落 PCR 是一种设计多循环以使相连循环

(1:104 ~ 1:105);放弃此套引物,重新设计引物扩增。

参考文献

[1] 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术[M]. 第2版. 北京: 中国协和医科大学出版社,1999,388

[2] C. W. 迪芬巴赫, G. S. 德维克斯勒. PCR 技术实验指南[M]. 北京:科学出版社,1998,33

[3] Helweg - Larsen J ,Jensen JS ,Benfield T ,et al. Diagnostic use of PCR for detection of Pneumocystis carinii in oral wash sam-

ples[J]. J Clin Microbiol ,1998 ,36(7) :2068

[4] 唐恩洁,杨宗琪,赵明才,等. 用人肝细胞 cDNA 文库制备 Dig - Fas 探针[J]. 川北医学院学报,2000,3(15):160

[5] Komura J ,Ikehata H ,Hosoi Y ,et al. Mapping psoralen cross - links at the nucleotide level in mammalian cells: suppression of cross - linking at transcription factor - or nucleosome - binding sites[J]. Biochemistry ,2001 ,40(13) :4096

[6] Arlt VM ,Schmeiser HH ,Pfeifer GP. Sequence - specific detection of aristolochic acid - DNA adducts in the human p53 gene by terminal transferase - dependent PCR[J]. Carcinogenesis , 2001 ,22(1) :133

## TD PCR——AN AMELIORATIVE PCR FOR AMPLIFICATION OF TARGET GENES

WAN bing ,YAN Jie ,JI Ming - chun ,et al.

**ABSTRACT Objective :**To try to get target genes by an ameliorative PCR method——TD PCR. **Methods :**Did TD PCR to expand target genes. **Results :**Target genes were gotten by TD PCR. **Conclusion :** There is no need to probe optimal annealing temperature in TD PCR ,and a similar ,temperature program could be used for amplifying a group of genes. It proved to be an efficient PCR method.

**KEY WORDS** Amelioration ;TD PCR ;Annealing temperature

(上接 126 页)

## A STUDY ON PROTHROMBIN GENE MUTATION IN THE BUDD - CHIARI SYROME PATIENTS

ZHAO Guang - sheng ,GU Jian ,ZHANG Yu ,et al

**ABSTRACT Objective :**To investigate the ratio of prothrombin gene mutation in selected Budd - Chiari syndrome patients. **Methods :**Twelve patients with BCS diagnosed by clinical features and corresponding laboratory findings and fifty controls were detected by using polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphisms(PCR - RFLP). **Results :**The G20210A was not observed in the twelve patients with BCS and fifty controls. **Conclusion :**There is no evidence of the prevalence between G20210A and BCS. The existence G20210A of BCS in China is still to be explored.

**KEY WORDS** Prothrombin ;Mutation ;Budd - Chiari syndrome (BCS)