维普资讯 http://www.cqvip.com

技术出版社 1979;403
4.徐昌喜,等.中华器官移植杂志 1986;7(4):188
5.钮 振,等.生物医学工程学杂志 1986;5(4):242
6.Du Xiang-nan et al. Biomat Art. Cells, Art. Org 1987;15(1):229
7.沈建民,等.药物结构与制剂 北京:中国医药科技出版社 1989:407
8.Lange's Handbook of Chemistry Thirteenth Edition 1985;Sec 5:60

(收稿日期 1998-01-22)

The study of capacities for hemopurification the adsorption attapulgite clay(CAA) of crosslinked agar beads entrapped

Ma Yu, et al
Department of chemistry, college of basic medical sciences

The adsorption capacities of Crosslinked Agar beads entrapped Attapulgite clay(CAA) for certain poisoning drugs, such as chlorpromazine, promethazine, diazepam, quinidine, phenobarbital are reported. The results revealed that CAA possesed different absorptivity for the different drugs, and possesed strong adsorption capacities for some cations, such as phenothiazine derivatives. It is a selective adsorbent with good adsorption capacities

KEY WORDS Adsorbent; Attpaulgite clay; Agar

73-75

加工过的假基因影响RT-PCR的可靠性

(26)

临床学院检验科 张玉洪* 胥 飚
临床学院胸外科 葛明建

R392.2

提 要 为了探讨加工过的假基因对RT-PCR的干扰以及克服的方法.运用RT-PCR技术扩增各种组织中的β-actin基因序列.通过设立各种对照可以发现加工过的假基因的存在,在RNA中残存有0.1%的DNA均可引起其结果的假阳性.哺乳类动物中加工过的假基因可能普遍存在,在cDNA合成前用DNase消化RNA样品,对于提高RT-PCR的可靠性极为重要.

关键词 加工过的假基因; 反转录聚合酶链式反应; β-肌动蛋白
中图分类号 R392.2

逆转录聚合酶链式反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction,RT-PCR)是当前分析基因表达的一种最快速敏感的方法.它与传统的RNA分析法相比具有敏感性高,特异性强,能快速分析大量样本等特点,因此它有逐渐取代Northern印迹杂交技术和核酸保护分析法在RNA水平定量分析中的趋势.然而在扩增哺乳动物的一些目的基因时,普遍存在一种加工过的假基因(Processed Pseudogene)的干扰,常引起扩增的假信号,影响RT-PCR结果的可靠性,本文以β-肌动蛋白(β-actin)基因为例进行有关探讨.

1 材料和方法

1.1 材料来源及RNA提取 分别收集肺磷癌组织,淋巴结组织,外周血白细胞,分别用异硫氰酸胍、酚、氯仿"一步法"抽提提纯RNA[1].

* 男,1963—07出生,主管技师

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 引物设计及合成 按β－actin基因序列[3]设计:β－actin A(467—491)5'－CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGAC－3'B(1589－1565)5'－AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGAC－3'跨跃2个内含子,其cDNA扩增片段为589bp,引物和Oligo(dT)$_{18}$均由北京赛百盛生物工程公司合成。

1.3 RT－PCR 取灭菌后无RNase的0.2ml的离心管依次加入:5×RT缓冲液4μl,2.5mmol/L dNTP 4μl,Oligo(dT)$_{18}$120pmol,RNasin 20U,总RNA100ng,AMV 5U(Promega产品)加无RNase水至终体积20μl混匀,42℃60min,95℃加热5min灭活逆转录酶,立即置冰浴.取反转录产物2μl于含Tris·HCl(pH8.3)10mmol/L,KCl 50mmol/L,$MgCl_2$ 1.5mmol/L,dNTP各200μmol/L,β.actin引物各20pmol,Taq DNA聚合酶1U(华美生物工程公司产品)终体积25μl的反应体系中,于PCR循环仪(PE9600型),94℃45s,65℃45s,72℃60s循环35次,最后72℃充分延伸5min。取10μlPCR产物在1.5%琼脂糖凝胶中电泳,经溴化乙锭(EB)染色后,在紫外透射反射仪上观察结果并拍照。

2 结果

2.1 加工过的假基因对RT－PCR干扰的存在及证实

将肺磷癌组织、淋巴结组织、外周血白细胞分别提取RNA,在逆转录过程中分别加入AMV(+RT)逆转录和不加入AMV(－RT)作为对照,经PCR扩增,结果每份RNA标本是否经逆转录均产生与目的片段相一致的扩增产物。再将RNA标本经无RNase活性的DNase消化残存的DNA.(华美生物工程公司产品,每微克DNA用0.1 U DNase.37℃20min)再提纯RNA,经RT和－RT进行PCR扩增,结果显示只有经RT的RNA才出现589bp的扩增带,见图1。

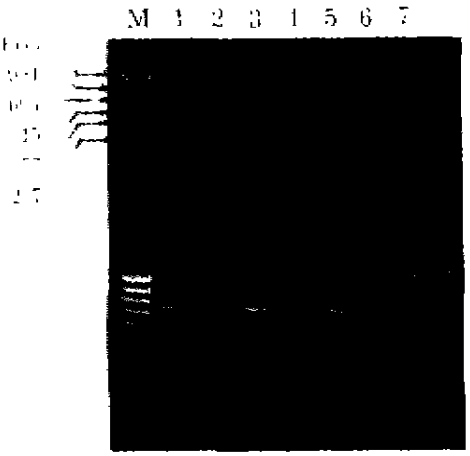


图1 β－actin RT－PCR产物
上图RNA未经DNase处理
下图RNA经DNase处理
M:PCR Marker
1,2:外周血白细胞RNA经＋RT,－RT后产物
3,4:淋巴结组织RNA经＋RT,－RT后产物
5,6:肺鳞癌组织RNA经＋RT,－RT后产物
7:阴性对照

2.2 RNA中残存的DNA量对RT－PCR的干扰

为了研究基因组DNA(含假基因)对RT－PCR干扰的程度,将基因组DNA(DNA提取过程中用RNase已消化RNA)经一系列定量稀释,经RT－PCR扩增,结果如图2,显示0.1ng的DNA均可引起该实验的阳性结果,相当于该法RNA样本中混合0.1%的DNA即可出现假基因的干扰,因而在RNA常规提取过程中,假基因的污染是不可避免的。

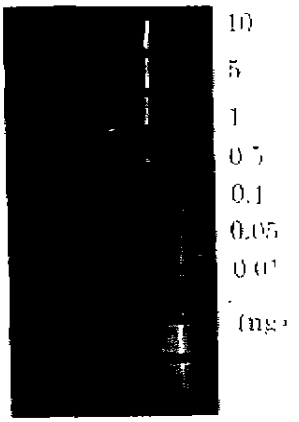


图2 系列稀释的基因组DNA β－actin扩增结果

3 讨论

假基因(Pseudogene)是相对于功能基因(Functional Gene)而言的,它是与相应的功能基因相关的基因,但由于存在某些基因缺陷而不能编码产生相应的多肽链,因其含有插入序列,所以在扩增片段上易与目的基因相区别。加工过的假基因是指假基因不含插入序列即内含子的部分,它来

维普资讯 http://www.cqvip.com

源于成熟的mRNA，因而它与相应的功能基因的cDNA具有高度同源性，而且由于它嵌合在细胞的基因组中，且片段大小几乎不能与相应的功能基因转录本的cDNA拷贝相区别[3]，因而在实验中很容易被误认为是扩增到的目的基因的cDNA片段。本实验探讨了β－actin的加工过的假基因对RT－PCR干扰的存在及影响，另外在甘油醛－3－磷酸脱氢酶(GAPDH)的实验中也得到相似的结果，加工过的假基因的存在可能普遍存在于哺乳动物的基因中[3]如，r－actin，α－管状蛋白，细胞色素C基因家族，角蛋白18，19[4]等。

尽管加工过的假基因普遍存在于哺乳动物基因组中，但可以通过设立各种阴性对照来发现其干扰，并排除是否为PCR的污染。为了克服假基因的干扰首先考虑到尽量提纯RNA，通过我们的实验，RNA纯化中只要污染有0.1%的残存DNA 就可导致其假阳性，所以一般提纯方法是难以达到的。Datta YH等[5]扩增Ck19基因设计的引物，采用目的基因与假基因最大错配处设计、严格反应条件，退火温度增加至72℃，可以完全克服其干扰。而一些加工过的假基因与目的基因的同源性极高，且不止一种，有报道β－actin的假基因至少在20种以上[6]。因此要通过引物设计，反应条件的改变来消除其干扰是不太现实的。因此我们推荐由于极微量的基因组DNA将引起随后PCR扩增的假信号，在cDNA合成以前用DNase消化RNA样品。这对于低丰度的mRNA的RT－PCR极为重要。

在进行RT－PCR时为保证RNA提取的完整性及RT和PCR步骤的可靠性，常需选用在组织细胞中普遍表达，表达量比较恒定的一类mRNA作为内源性基因模板标准，编码这些mRNA的基因都是一些保守性强的"管家"基因。将这些表达量恒定的mRNA与样本中的目的mRNA在各自不同引物引导下共同逆转录共同扩增，可以达到半定量的目的，同时可以消除不同样本分别扩增时的"管效"差异而产生的误差，这些内源性基因模板可能存在着加工过的假基因干扰。而一些商用试剂盒也未能解决这类问题，因而影响着RT－PCR的可靠性。因此我们建议设立－RT，基因组DNA及空白对照是十分必要的。

参 考 文 献

1.Chomzynski P, et al. Anal Biochem, 1987;162:156
2.Nakajima.Iijima S, et al. Proc Natl Acacl Sci USA, 1985;82:133
3.Vanin EF. Ann Rev Genet, 1985;19:253
4.Savtchenko ES, et al. Am J Hum Genet, 1988;43:630
5.Datta YH, et al. J Clin Oncol, 1994;12:475
6.Dirnbofer S, et al. Trend Genet, 1995;11:380

(收稿日期 1998－05－05)

Processed pseudogenes interfere with the reliability of reverse transcriptase－polymerase chain reaction

Zhang Yuhong, et al
Department of clinical laboratories, college of clinical medicine

To find and overcome the interference of processed pseudogene in reverse transcriptase－polymerase chain reaction(RT－PCR), the author amplified thesequence of β－acting ene in several tissues. with RT－PCR metheod. The influence of β－actin processed pseudogene could be found by performing certain controls. Genomic DNA contaminations as low as, 0.1%, in given RNA samples could givefalse－positive signal. The false－positive results generated by processed pseudogene in mammal genome is universal for RT－PCR. By digesting the extracted RNA samples with DNase before cDNA synthesis, the problem could be effectively solved. This is of great importance for promoting the reliaility of RT－PCR.

KEY WORDS Processed pseudogence; Reverse transcriptase－polymerase; Chain reaction β－actin gene