维普资讯 http://www.cqvip.com

②
101—105
R587.102

PCR技术在糖尿病研究中的应用

生物化学教研室 刘先俊 吕懿娟 杜建国* 冯佑民*

提 要 本文应用PCR技术从人基因组DNA中扩增出胰岛素基因片段(1128bp)，将扩增产物直接克隆到M_{13}载体中去，用双脱氧链终止法作DNA序列分析。是鉴定胰岛素基因中前肽、A链、B链和C肽编码区域有无碱基突变的一种简便、有效的方法

关键词 PCR；DNA序列分析；人胰岛素基因；非胰岛素依赖型糖尿病
中图分类号 R587.1；Q78

非胰岛素依赖型糖尿病的病因甚为复杂。早期研究表明[1]，胰岛素基因的碱基突变为非胰岛素依赖型糖尿病的病因之一。到目前为止，国外已报道了10个家族存在着胰岛素基因的碱基突变[2]。研究胰岛素的结构变异，不仅可对糖尿病患者作出病因诊断，为以后可能开展的基因治疗提供理论依据；而且可进一步研究胰岛素的结构与功能的关系，对阐明非胰岛素依赖型糖尿病的病因及发病机制无疑具有重要意义。

要从基因水平确定结构变异胰岛素的存在，需从外周血中分离到人基因组DNA (Genomic DNA)。采用鸟枪克隆(Shotgun cloning)，筛选和核苷酸序列分析以确定胰岛素基因的结构变异部位[1]。不仅所需样品量大而且操作复杂费时。

PCR(Polymerase Chain Reaction)是近年来发展起来的用于体外扩增DNA片段的方法[3,4]。这种体外扩增过程基于下列三个步骤的重复循环：模板DNA变性；寡核苷酸引物退火到模板单链DNA的相应互补序列上；用DNA聚合酶介导的引物延伸。短时间内导致特异片段呈指数级扩增。1988年，Miyano等人[5]应用PCR技术扩增出胰岛素基因的部分片段(165bp和40bp)结合寡核苷酸杂交技术来确定胰岛素基因的结构变异，但该法仅用于检测有无特定位点的突变。我们应用PCR方法从人

* 中国科学院上海生化所

developed for simultaneously estimating metoprolol and its metabolite α-hydroxymetoprolol in human plasma, saliva and urine. The extraction efficiency was above 90% in urine for both compounds. This assay procedure was reproducible and precise for metoprolol and α-hydroxymetoprolol, as judged by the coefficient of variation<6.4% on inter-day and intra-day determinatios at all concontrarions examined. The minimum detection limit of metoprolol was 10 ng/ml in plasma, saliva and urine; and that of α-hydroxymetoprolol was 50 ng/ml in plasma and 10 ng/ml in saliva and urine. The calibration curves over the range of 0.1-10 μg/ml for both compounds had high linear relationship and reproducibility, either by external standard method or internal standard method using propranolol as the internal standard

KEY WORDS HPLC; metoprolol; α-hydroxymetoprolol

基因组DNA中扩增出胰岛素基因片段(1128 bp)，并将扩增产物直接克隆到M_{13}载体中，用双脱氧链终止法测定胰岛素基因中前肽、A链、B链和C肽编码区域的核苷酸序列，从而可对上述区域有无结构变异进行分析和鉴别。现报道如下：

材料和方法

1. 标本收集 取外周静脉血5ml，ACD(25 mmol柠檬酸，50mmol柠檬酸钠，80mmol葡萄糖或EDTA抗凝（2%EDTA，0.85%NaCl）。用含1% TritonX—100溶细胞缓冲液（0.32mol蔗糖，10mmol Tris—HCl pH7.5，5mmol$MgCl_2$，1% TritonX—100）破碎细胞膜[6]，离心收集细胞核沉淀，经Proteinase K（Boehringer Mannheim）处理后提取白细胞DNA[7]，溶于TE缓冲液中（10mmol Tris—HCl pH8.0，0.1 mmol EDTA），4℃保存。

2. PCR 用于扩增人胰岛素基因的PCR引物为两个30聚寡核苷酸，其5'端分别引入了限制性内切酶BamHI(GGATCC)和EcoRI(GAATTC)的酶切位点。引物的核苷酸序列及其在胰岛素基因中的位置如下（图1）。

5′ GTGGATCCGCCTCCTGCCCCTGCTGGCGCT 3′
BamHI

5′ TGGAATTCAGGCTGCGTCTAGTTGCAGTAG 3′
EcoRI

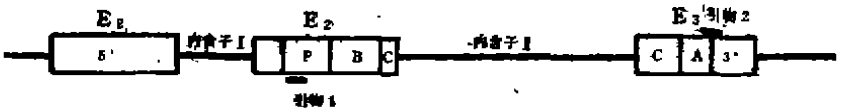


图1 PCR引物序列及其在胰岛素基因中的位置

上述引物用美国Applied Biosystem Inc的ABIA型DNA合成仪合成，分别用含7M尿素的聚丙烯酰胺凝胶（16%）电泳纯化得到目的片段，经Sephadex G—25柱脱盐后，冰冻干燥浓缩，溶于灭菌的重蒸水中，−20℃保存。

PCR在100μl反应体系中进行，内含25mmol Tris—HCl pH8.2，25mmol $(NH_4)_2SO_4$，1.5 mmol $MgCl_2$，2mg/ml明胶，各25pmol引物，200μmol每种脱氧核糖核苷三磷酸(Sigma)和1.5—2μg人基因组DNA，2单位耐热DNA聚合酶(F.D. DNA聚合酶，复旦大学遗传所)和100μl石蜡油。反应按94℃1min（变性），55℃2min（退火）和70℃3min（延伸）手工完成30轮扩增，最后一轮在70℃延伸10min。1%琼脂糖凝胶（含溴化乙锭0.5μg/ml)电泳分离，紫外灯下观察结果。Southern杂交按文献[8]进行，探针为[a-^{32}P]dCTP（10 μci/μl，Amersham）标记的人胰岛素基因(phins 214/BamHI片段，Bell，G.I.赠送[9]。

2. M_{13}克隆 克隆载体为M_{13}mp18/M_{13}mp19 RFDNA(Biolabs or Boehringer Mannheim)，按文献[10]转化经氯化钙处理后的E.coliJM103(上海生化所保存与提供)，在含有异丙醇硫代半乳糖苷(IPTG，Sigma)和5-溴-4-氯-3-吲哚β-D-半乳糖苷(X—gal，Promega)的培养基中培养过夜长出兰色噬菌斑。按文献[2]大量制备M_{13}mp18/M_{13}mp19 RFDNA，用Sepharose 2B柱纯化，限制性内切酶EcoRI和BamHI(Biolabs或Boehringer Mannheim)同时酶切后，DEAE纤维素滤纸法[8]回收，−20℃保存。

PCR混合物经Sephadex G—50旋转柱去除反应体系中过量的小分子物质[6]，乙醇沉淀后，用限制性内切酶EcoRI和BamHI同时酶切，EDTA终止反应。

将酶切后的M_{13}mp18/M_{13}mp19 RFDNA与PCR扩增片段在16℃进行连接，DNA连接酶为噬菌体T_4DNA连接酶（Boehringer Mannheim）

重组噬菌体M_{13}转化按前述方法进行，宿主菌为E.coliJM103，培养基为2YT固体培养基[8]，37℃培养过夜。

4. M_{13}重组体的筛选 按文献[8]进行噬菌斑原位杂交，探针同前，用随机引物法标记探针(Pharmacia—LKB随机引物标记试剂盒）。预杂交和杂交在68℃进行。按文献[7]洗膜，−20℃放射自显影。

5. M_{13}单链DNA制备 挑取原位杂交阳性的白色噬菌斑按文献[8]在2ml 2YT中37℃振荡培养6～7h，离心取上清液在0.7%琼脂糖凝胶电泳，用蓝色噬菌斑的相应培养液作标准，凡DNA带迁

维普资讯 http://www.cqvip.com

移率慢于蓝色噬菌斑的DNA带者，其相应的上清液（1.2ml）用于制备DNA序列分析的单链DNA模板[8]。

6. 核苷酸序列分析 用双脱氧链终止法作DNA序列分析（Pharmacia—LKB T₇序列分析试剂盒）。序列分析中所用的同位素为[α—³⁵S]dATP（10μci/μl，Amersham），反应按厂家推荐的条件进行。用含7mol尿素的6%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离片段，室温下进行放射自显影。

结果与讨论

1. 从人基因组DNA中加引物1，2用PCR法直接扩增，凝胶电泳显示扩增产物为单一条带，片段大小与预计（1128bp）相符（图2右）。用人胰岛素基因作探针，Southern杂交呈现阳性（图2左）。说明用我们设计的引物能从人基因组DNA中直接扩增出胰岛素基因片段。

2. 在设计引物时，分别在引物的5′端引入限制性内切酶BamHI与EcoRI的识别序列。尽管这些引入序列与模板DNA不完全匹配，但只要对PCR扩增的特异性不造成太大的影响，仍可成功地扩增[11]。随着PCR的进行，这些引入到引物中的限制性内切酶位点会掺入到产物中去，以便于随后的克隆。

3. 我们用作PCR模板的人基因组DNA为常规制备纯化的外周血细胞DNA。由于PCR具有对模板纯度要求不高的优点，可不必事先提取纯化DNA，按下述方法制备粗模板（Crude Extraction）简单易行。取外周抗凝血0.5ml，加入0.5ml溶细胞缓冲液[6]，短暂离心。用1ml溶细胞缓冲液反复洗涤沉淀2～3次。将沉淀悬浮于0.5ml PCR缓冲液中（25mmol Tris—HCl pH 8.2，25mmol $(NH_4)_2SO_4$，1.5mmol $MgCl_2$，2mg/ml明胶），加入Proteinase K使终浓度达70—100μg/ml，55℃保温1～2h。94℃加热10min使蛋白酶失活。此溶液可直接用作PCR模板（资料未显示）。

4. 以重组的M_{13}mp18/M_{13}mp19 RFDNA分别转化受体菌株E.coli JM103，在IPTG与X—gal存在时，非重组体形成兰色噬菌斑，而重组体形成白色噬菌斑。噬菌斑原位杂交显示约有7%的白色噬菌斑呈现杂交阳性（见附表）。可能由于PCR混合物中除扩增了的胰岛素基因DNA片段外，尚有一定量的基因组DNA（模板DNA），它们经限制性内切酶BamHI与EcoRI酶切后也可克隆到M_{13}载体中去而呈现白色噬菌斑。若将PCR产物用DEAE纤维素滤纸法[8]回收后再进行克隆，则噬菌斑原位杂交的阳性率可达50%左右（见表）

表1 PCR产物的直接克隆与用DEAE纤维素滤纸法回收后克隆的比较

类型	直接克隆		DEAE滤纸法回收后克隆	
	数目	百分数(%)	数目	百分数(%)
总噬菌斑	119	100	353	100
白色噬菌斑	112	94	328	93
原位杂交阳性	8	7	165	50

5. 尽管噬菌斑原位杂交筛选阳性重组体较准确且一次可筛选较多的白色噬菌斑，但原位杂交操作繁琐，花费时间多。我们克隆的人胰岛素基因片段长达1.1Kb，重组体与非重组体分子大小相差也达1.1Kb。因此，也可用直接电泳（0.7%琼脂糖凝胶）法筛选阳性重组体[8]。电泳后，由于重组体分子量较大而比非重组体泳动缓慢（图3）。若将PCR产物经DEAE纤维素滤纸法回收后克隆，结合直接电泳法筛选，则可省去原位杂交一步并缩短实验时间。

维普资讯 http://www.cqvip.com

6. 用于克隆的M_{13}载体(M_{13}mp18/M_{13}mp19 RFDNA)是一对限制性位点相同但方向相反的载体[6]。因此，胰岛素基因片段在这两个载体上的克隆方向不同。将胰岛素基因片段克隆到M_{13}mp18 RFDNA中，序列分析可得出胰岛素基因5′端序列(包括前肽、B链和部份C肽编码区域序列)；若用M_{13}mp19 RFDNA为克隆载体，DNA序列分析可得出胰岛素基因片段3′端序列(包括A链和其余C肽编码序列，资料未显示)。

7. 在PCR中，由于近年来耐热DNA聚合酶(Taq DNA Polymerase)的应用[4]，不仅使PCR操作过程大为简化，并且DNA复制的准确性也大大提高。但仍有极低的错误率(10^{-5}～10^{-6}/碱基)发生[12]。错误率发生的高低与PCR扩增条件有关。我们按厂家推荐的条件扩增了10个样品(取自一例正常人与九例非胰岛素依赖型糖尿病人)，其中一例糖尿病人的扩增样品经DNA序列分析显示有突变存在。但又按原来的扩增条件重复PCR扩增，M_{13}克隆和DNA序列分析，未能再次发现突变体[13]。因此，我们认为，PCR过程中发生复制错误应值得注意。

目前，由于对胰岛素基因结构变异的检测尚无常规适用的手段，故其发病情况也属未知。我们采用本文方法分析了九例任意取样的非胰岛素依赖型糖尿病人，未能发现结构变异胰岛素的存在。基于胰岛素结构变异呈常染色体显性遗传。从国外已报道的病例，都具有糖尿病家族史或血浆C肽：胰岛素比率降低。因此，今后准备从家系调查着手，选择具有上述特征的病例，应用本方法作进一步的研究。

(致谢：本文工作在中国科学院上海生化所分子生物学国家重点实验室中完成。得到张友尚主任的指导和401组全体同志的大力支持和帮助，在此表示感谢。)

参考文献

[1] Kowk, et al. Diabetes 1983; 32:872
[2] Steiner, et al. Diabetes CARE 1990; 13:600
[3] Saiki R.K, et al. Science 1985; 230: 1350
[4] Saiki R.K, et al. Science 1988; 239: 437
[5] Miyano M, et al. Diabetes 1988; 37: 882
[6] Buffone R.K, et al. Ciin Chem 1985; 30:164
[7] 吴冠芸，等. 基因诊断人民卫生出版社北京 1988
[8] Sambrook, et al. Molecular Cloning-a Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour 1989
[9] Bell G.I, et al. Diabetes 1984; 33: 176
[10] Messing J, et al. Meth In Enzym 1983; 101:20
[11] Sommer R, et al. Nucleic Acids Res 1989; 17:6740
[12] Eckert K.A, et al. Nucleic Acids Res 1990; 18:3739
[13] 刘先俊，等. 重庆医科大学学报 1992; 17 (3):252

(收稿日期 1992-05-11)

维普资讯 http://www.cqvip.com

③ 105—108

重庆医科大学学报 1993年第18卷第2期

粘附培养的人单核巨噬细胞之酶活性及吞噬功能的观察

R329.26

组胚教研室 汪维伟 赵 玲 陆 明

摘 要 本文观察了粘附培养的人单核巨噬细胞的琥珀酸脱氢酶（SDH）、α-萘酚醋酸酯酶（ANAE）、过氧化酶（PO）等酶活性及其鸡红细胞吞噬率之差异。结果培养前粘附细胞的SDH、ANAE活性均高于不粘附细胞（$P<0.01$和0.05）。粘附细胞培养24、48h后仍粘附的细胞和悬浮细胞间酶活性差异均无显著性。培养48h的粘附和悬浮细胞之PO活性均低于培养24h的相同细胞（$P<0.01$）。上述各组细胞间鸡红细胞吞噬率均未见有统计意义的差异。这提示：在无人血清刺激时，单核巨噬细胞粘附能力的不同似乎与细胞分化成熟或功能活化状态有关

关键词 人单核巨噬细胞；粘附；吞噬；SDH；ANAE；PO 单核细胞，酶

中图分类号 R329、26

人周围血单核细胞在形态、功能等多方面表现出异质性[1]。单核细胞在玻璃和其它粘附面上粘附能力不同，在同一粘附面上也表现为粘附、不粘附和粘附后又脱离粘附面等[2]。本文拟观察在同一粘附面上，粘附培养后单核巨噬细胞的酶活性及吞噬功能的差异及其意义。

材料方法

单核细胞的分离培养 取10例正常人肝素抗凝血，淋巴细胞分离液分离出周围血单个核细胞（PBMC）。以10%小牛血清RPMI1640培养液（后同）配成3～5×10⁶/ml细胞悬液。取直径3cm玻璃培养皿，分别加入细胞悬液5ml，室温下粘附1h，收集悬浮的不粘附细胞（含大量淋巴细胞）。用胰酶和橡胶刮剥离一个培养皿的粘附细胞，主要为单核细胞（NSE阳性率为80～90%），其余培养皿各加入5ml培养液，37℃、5%CO_2培养，不换液。分别于第2、3、4d按上述方法收集培养后仍粘附和悬浮起来的细胞，存活率为80～97%，第4天存活率低于70%，弃之。

吞噬鸡红细胞试验 常规鸡翼下取血，配成

THE APPLICATION OF PCR TO DIABETES RESEARCH

Liu Xianjun, et al

Dept of Biochemistry

The polymerase chain reaction(PCR) was used to amplify insulin gene fragment (1128bp) in human genomic DNA. The amplified product was directly cloned to MI3 vector, and DNA sequencing was carried out by Sanger dideoxy-mediated chain termination method. This is a simple and effective method for identifying mutations in the coding region of prepeptide, A chain, B chain and C peptide of insulin gene

KEY WORDS PCR; DNA sequencing human insulin gene; NIDDM