DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.058

[2] Barnes P J, Adcock I M. NF-κB: a pivotal role in asthma and a new target for therapy[J]. Trends Pharmacol Sci, 1997, 18(2): 46—50.
[3] Schreiber E, Matthias P, Muller M M, *et al*. Rapid detection of octamer binding proteins with "mini-extracts" prepared from a small number of cells [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(15): 6 419.
[4] 孙志贤 主编. 现代生物化学理论与研究技术[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1995. 392—394.
[5] Shenkar R, Schwartz M D, Terada L S, *et al*. Hemorrhage activates NF-κB in murine lung mononuclear cells *in vivo*[J]. Am J Physiol, 1996, 270(5 Pt 1): L729—L735.
[6] Schmitz M L, Baeuerle P A. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-κB[J]. EMBO J, 1991, 10(12): 3 805—3 817.
[7] Delude R L, Fenton M J, Savedra R Jr, *et al*. CD14-mediated translocation of nuclear factor-κB induced by lipopolysaccharide does not require tyrosine kinase activity[J]. J Biol Chem, 1994, 269(35): 22 253—22 260.
[8] Fan C M, Maniatis T. Generation of P50 subunit of NF-κB by processing of P105 through an ATP-dependent pathway[J]. Nature, 1991, 354(6 352): 395—398.

(编辑 陈聪连)

技术方法

文章编号: 1000-5404(2001)06-0745-02

介绍一种快速反转录聚合酶链反应

Introduction of an access of reverse transcription polymerase chain reaction

张敬如 (第三军医大学基础医学部病原生物学教研室, 重庆 400038)

提 要: 目的 介绍一种特异、高效的快速PCR方法。方法 总RNA分成2份, 采用相同反应体系, 分别用普通PCR方法和快速PCR方法同时扩增FasL。结果 虽然两种方法均能成功扩增FasL基因, 但普通PCR方法耗时3 h 48 min, 而且还存在非特异性片段; 而快速PCR方法耗时仅2 h 6 min, 而且没有出现非特异片段。结论 快速PCR方法不仅极大的缩短了反应时间, 同时提高了反应的特异性。

快速对于反转录聚合酶链反应(Reverse transcription and polymerase chain reaction, RT-PCR)或聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)而言不仅意味着省时, 更重要的是增加了反应的特异性。一步法RT-PCR实现了用一个试管, 两种酶(AMV逆转录酶和 *Tfl* DNA聚合酶)不间断的实现反转录和PCR扩增, 节省了时间, 由于反转录和PCR均由特异性引物引导进行, 增加了反应的特异性。但其PCR每一步持续时间仍需0.5~2 min。我们利用快速PCR仪大幅度降低了PCR每一步持续时间, 不仅实现了一步完成RT-PCR且每一步持续时间仅需5 s, 反应的特异性进一步提高, 现介绍如下。

1 材料和方法

1.1 实验设计

用1台快速PCR仪和实验室常用的普通PCR仪分别按常规程序和我们设计的快速程序对同一来源的总RNA模板进行RT-PCR, 以扩增存在于人类非小细胞肺癌组织中的FasL基因转录产物[1], 比较两种方法所需的时间和产物的特异性, 每种方法重复3次。

1.2 实验材料

PCR引物: 上游引物5'-CTGGGGATGTTTCAGCTCTTC-3', 下游引物5'-CTTCACTCCAGAAAGCAGGAC-3'(上海生工生物工程有限公司合成); Access RT-PCR试剂盒, PCR相关试剂均购自Promega; 快速PCR仪为HYBAID公司出品的PCR EXPRESS, 普通PCR仪为Amplitron II型; 凝胶电泳扫描仪(Gel Doc 2000, Bio Rad)。

1.3 实验方法

手术切除直径4 cm非小细胞肺癌组织, 按试剂说明用TriPure提取总RNA。总RNA分成2份, 采用相同反应体系, 分别用普通PCR方法和快速PCR扩增FasL。50 μl反应总体积含: 总RNA 2.28 μg, 上下游引物各0.5 μmol/L, 每种dNTP 0.2 mmol/L, Mg^{2+}浓度2.5 mmol/L, AMV反转录酶和 *Tfl* DNA聚合酶各5 U。

普通PCR仪运行程序1: 48 ℃ 45 min反转录; 94 ℃ 2 min灭活AMV; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1.5 min, 35个循环; 72 ℃最后延伸7 min。

快速PCR仪运行程序2: 48 ℃ 45 min反转录; 94 ℃ 2 min灭活AMV反转录酶; 94 ℃ 5 s, 55 ℃ 5 s, 72 ℃ 5 s, 共35个循环; 72 ℃最后延伸10 s。

1%琼脂糖凝胶电泳同时检测两种方法获得的PCR产物, 凝胶电泳扫描仪读取电泳结果, 比较两种情况下产物的特异性。上述过程重复3次。

2 结果

两种方法均扩增获得大约230 bp的片段, 与FasL的理论长度(231 bp)基本符合[2]。但是, 程序1耗时3 h 48 min, 而程序2仅需2 h 6 min。程序1所得产物电泳结果存在明显的非特异性拖尾条带, 而程序2消除了产物中非特异性条带, 见图1。共进行3次实验, 结果一致。

作者简介: 张敬如(1972—), 女, 河北省深泽县人, 助理实验师。电话: (023) 68752243
收稿日期: 2001-03-17; 修回日期: 2001-05-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

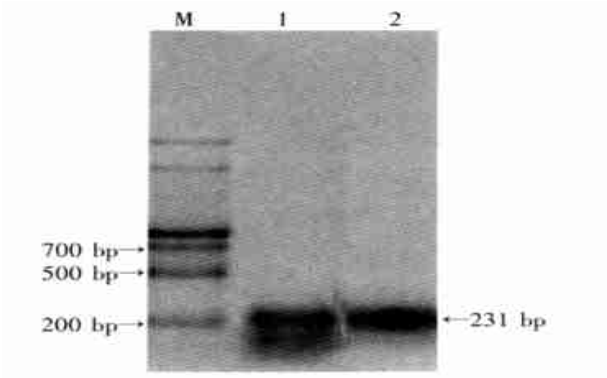


图 1 快速 PCR 方法与普通 PCR 方法扩增 FasL 基因转录产物泳道比较

M: PCR Marker; 1: 普通 PCR 方法扩增产物泳道; 2: 快速 PCR 方法扩增产物泳道

3 讨论

两种方法的主要区别在于程序 2 中 PCR 循环每一步的持续时间只有 5 s, 最后延伸仅 10 s, 与程序 1 相比省时近 2 h, 更重要的是扩增产物的特异性明显提高。PCR 循环的方式(温度和每一步持续时间)、缓冲条件和 DNA 聚合酶是影响 PCR 特异性、有效性和忠实性的重要因素; 另外, 模板长度(或待扩增目的序列的长度)是一关键因素[3]。但实际工作中缓冲条件和 DNA 聚合酶较易调整, PCR 每一步持续时间的调整却难以做到。原因是, 普通 PCR 仪只能测量加热板(Heating block)的温度, 进行温度反馈调节, 因此每一步持续时间最短不少于 30 s 才能抵消温度的延迟误差。已证实 DNA 聚合酶(如 Taq 酶)具有很高的持续合成能力, 反应混合物在 50~94 ℃之间过渡时即达到聚合酶的最佳反应条件, 在短暂的时间内快速 PCR 与普通 PCR 的产量一样多(1×10^{12}~5×10^{12}拷贝), 因此每一步反应的持续时间太长不仅是浪费, 而且不利于 DNA 聚合酶的活性, 并可能出现非特异性产物。比较图中 1 和 2 提示增加热循环速度(降低坡道时间)增加了反应的特异性。快速 PCR 仪利用一根精细的反应管内热敏传感器(Tube sensor)直接探测反应体系的温度, 反馈给 PCR 仪中的微电脑调控温度变化, 因而能够大幅度降低坡道时间。文献[3]提出快速 PCR 每一个循环包括 94 ℃变性不超过 1 s, 45 ℃退火不超过 1 s, 72 ℃延伸 10 s 三步, 反应体系总体积不超过 10 μl。但我们的实验提示, 反应体系总体积为 50 μl, 将 PCR 三步均设为 5 s, 扩增效果满意, 并且 50 μl 能够满足绝大多数 PCR 或 RT-PCR 的反应要求, 在一定程度上克服了体积限制。另外, 本实验采用 *Tfl* DNA 聚合酶, 实践说明它亦具有良好的持续合成能力, 适宜用于快速 PCR。总之, 我们利用快速 PCR 仪揉合了一步法 RT-PCR 和快速 PCR 的优点, 不仅极大的缩短了反应时间, 而且增加了反应的特异性和有效性。

关键词: 反转录聚合酶链反应; 快速
中图法分类号: R446.9 文献标识码: B

参考文献:

[1] Kawasaki M, Kuwano K, Nakanishi Y, *et al*. Analysis of Fas and Fas ligand expression and function in lung cancer cell lines[J]. Eur J Cancer, 2000, 36(5): 656-663.

[2] Shiraki K, Tsuji N, Shioda T, *et al*. Expression of Fas ligand in liver metastases of human colonic adenocarcinomas[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(12): 6 420-6 425.

[3] CW 迪芬巴赫, GS 德维克斯勒 主编. PCR 实验技术指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 23-27.

(编辑 王 红)

技术方法

文章编号: 1000-5404(2001)06-0746-02

医学论文中绘制线图与条图时常见的错误分析

Analysis of common mistakes in drawing line and bar charts in medical papers

张 蔚, 王文昌, 颜 杰 (第三军医大学高原军事医学系卫生统计学教研室, 重庆 400038)

提 要: 目的 讨论医学科研论文中线图与条图绘制时常见的错误类型, 分析其错误原因。方法 对某核心期刊 1999 年 1 期至 2000 年第 10 期中的统计图进行分类、整理, 统计出错误图形及其类型。结果 错误主要集中在条图与线图的选择和绘制上, 多表现为绘制线图时横轴刻度间距不等, 立体条图纵轴刻度的选择错误。结论 通过几个典型错误图形分析, 指出了改正方法及绘图时的注意事项。

统计图是表现数字语言的重要工具[1], 它可以直观地反应出事物的数量关系, 又是医学信息的重要描述形式之一, 是科研论文的重要组成部分。一幅好的

作者简介: 张 蔚(1960-), 女, 江苏省南京市人, 实验师, 主要从事医学统计学与统计数字处理方面的研究。发表论文 6 篇。电话: (023)68752343

收稿日期: 2000-12-08; 修回日期: 2001-05-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net