DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.01.010

小鼠 RAPD-PCR反应体系及扩增程序的筛选*

吴丰春** 魏 泓 (第三军医大学实验动物中心) 重庆, 400038

提 要 目的: 筛选优化小鼠 RAPD-PCR反应体系及扩增程序。方法: 以 40条引物对 9个品系的小鼠基因组 DNA在各种不同条件下进行 RAPD-PCR,分析比较扩增结果。结果: 在下列反应体系及扩增程序下结果较好: 在 25μl的反应体系中含有 10× buffer 2.5μl, dNTP 200μmol/L, Mg^{2+} 2.5 mmol/L,引物 0.2 μmol/L, Taq酶 1.5 U,模板 DNA 20 ng,扩增程序为 94℃变性 1 min, 38℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 40个循环后接 10 min延伸。结论: 以上述反应体系及扩增程序进行小鼠 RAPD-PCR,扩增结果稳定。

关键词 随机扩增多态性 DNA;筛选
中图法分类号 Q751

RAPD(Random amplified polymorphic, DNA)是近几年发展起来的一项 DNA多态检测技术,由于其快速、简单、方便、经济、规范等优点,在动物、植物、微生物种属鉴定、亲缘关系的划分及多态性分析中得到广泛应用[1]。然而 RAPD技术还不成熟,亦有一定缺点,主要表现在各实验室结果可比性差,重复性差,这是因为 RAPD技术对实验条件要求十分严格, RAPD图谱受诸多因素影响[2]。为此本实验对小鼠 RAPD-PCR的反应体系及扩增程序进行了筛选及分析,以便获得稳定的扩增结果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 TA1、BALB/c、DBA/2、615、BALB/c-nu/nu、T739、SCID近交系小鼠和昆明鼠、NIH封闭群小鼠各5只,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 试剂 10× buffer、Taq酶、Mg^{2+}、dNTP均为德国 BM公司产品。

1.1.3 PCR仪 美国 PE2400型。

1.1.4 引物 采用美国 Operon Technologies公司的两套试剂盒: Primer kits for RAPDS AB-0320-kitN 及 AB-0320-kit2,每套试剂盒含 20条引物,共 40条引物。

1.2 方法

1.2.1 DNA的提取 取小鼠尾部组织 100 mg剪碎,匀浆,加消化液 (10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L NaCl, 1.0% SDS, 200μg/ml蛋白酶 K, pH8.0)消化,按常规方法提取 DNA,乙醇沉淀, TE(10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 1 mmol/L EDTA)溶解,各品系内小鼠 DNA样品混匀,构成 DNA样品池[3]。

1.2.2 RAPD-PCR反应体系及扩增程序的筛选 在 RAPD-PCR反应体系及扩增程序基本模式的基础上,分析改变预变性时间、退火温度、循环次数、dNTP的浓度、Mg^{2+} 的浓度、Taq的浓度、引物浓度、分析其对结果的影响。

2 结果

2.1 模板 DNA预变性时间对 RAPD-PCR的影响

实验中我们分别采用对模板 DNA进行预变性 10、8、5、3、2、1 min,以及不进行预变性 94℃直接启动的方法进行 RAPD-PCR,结果显示,模板 DNA预变性时间的长短,以及是否预变性,对扩增结果影响不大, 94℃直接启动变性 1 min后足以扩增出较好的结果,见图 1。

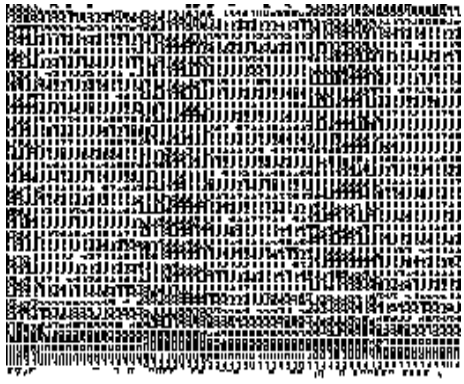


图 1 预变性时间对 RAPD-PCR的影响

Fig 1 Effects of pre-denaturation time on RAPD-PCR

a. 10 min; b. 8 min; c. 5 min; d. 3 min; e. 2 min; f. 1 min; g. 0 min; DNA BALB/c小鼠; 引物: ABN-05; 1. Amplified DNA: DNA of BALB/c mouse genome; 2. Primer used ABN-05

2.2 退火温度对 RAPD-PCR的影响

在 RAPD-PCR体系中不同模板 DNA,不同引物,其最适退火温度不同[4],实验中我们采用 ABN-11引物分别与上述 9品系小鼠的模板 DNA反应和 DBA/2小鼠的模板 DNA分别

* 国家自然科学基金资助项目, No. 3960079 全军"九五"医药卫生科研基金资助项目, No. 96M038 重庆市攻关项目资助
** 吴丰春 男, 29岁,助教 学士
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

与上述 40种引物反应的方法,在退火温度分别为 36℃、38℃、40℃、45℃、50℃条件下进行 RAPD-PCR,发现在 36℃~ 42℃范围内随温度升高,RAPD谱带更清晰,特异性更强,但在 40℃时有阴性结果出现,并随退火温度的升高,结果阴性率逐渐增多,在 45℃退火条件下,结果阴性率不但更高,RAPD谱带反而变弱,50℃退火时,很难扩增出结果,说明随退火温度的升高,引物和模板结合的特异性增强,结合的机率减少。反之,引物和模板结合的特异性降低,结合的机率增加。考虑到既要尽量避免出现阴性结果,又要增强结果的特异性,我们认为退火温度为 38℃较适宜。

2.3 循环次数对 RAPD-PCR的影响

RAPD-PCR循环次数的多少直接影响扩增产物的量及结果的特异性,循环次数少,产物量少;循环次数太多,则有非特异性产物产生。因为 PCR反应到达一定程度后,会产生平台效应[5],过多的循环会增加非特异产物的数量和复杂性,本实验认为循环次数为 35~ 40次足够。

2.4 dNTP浓度对 RAPD-PCR的影响

dNTP是反应的底物,其浓度过低影响反应速度和产量,表现为 RAPD谱带中明带变强,弱带消失;其浓度过高又会增加碱基误配,导致非特异产物增加,RAPD谱带中非特异带增加,我们分别在 dNTP浓度为 100μmol/L、150μmol/L、200μmol/L、250μmol/L的情况下进行 RAPD-PCR,发现 dNTP浓度为 200μmol/L时扩增结果较理想,见图 2。

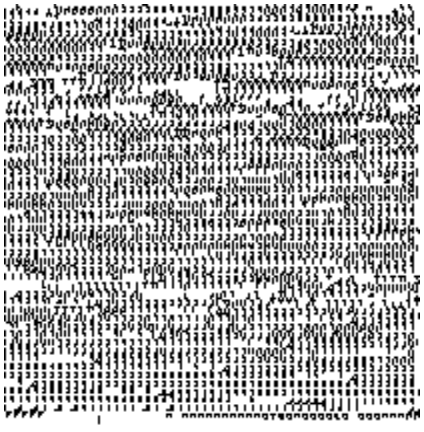


图 2 dNTP浓度对 RAPD-PCR的影响

Fig 2 Effects of dNTP's concentrations on PAPD-PCR

a. 250μmol/L; b. 200μmol/L; c. 150μmol/L; d. 100μmol/L; m. Marker; DNA. DBA/2小鼠; 引物: AB2-20; 1. Amplified DNA: DNA of DBA/2 mouse genome; 2. primer used AB2-20

2.5 Mg^{2+} 浓度对 RAPD-PCR的影响

Mg^{2+}是 Taq酶的激活剂,除直接影响 PCT的特异性和效率外,也有利于引物和模板的结合及增加引物和模板结合后的稳定性,这对于使用非特异性引物的 RAPD-PCR反应来讲,Mg^{2+}显得更重要,因此在 RAPD-PCR反应中要使用高浓度 Mg^{2+} (可达 2.5 mmol/L或更高,一般 PCR Mg^{2+}浓度为 1.5 mmol/L)[6]。但是反应体系中所示 Mg^{2+}浓度,并不一定是参加反应的游离 Mg^{2+}浓度,因为在反应体系中 DNA模板的浓度、纯度、引物、dNTP均会影响 Mg^{2+}浓度。因此,在优化 Mg^{2+}最适浓度时应设置几个浓度梯度来精确其最适浓度。经本实验筛选认为 Mg^{2+}浓度为 2.5 mmol/L时扩增结果较好。

2.6 Taq酶对 RAPD-PCR的影响

Taq酶的浓度决定产物的特异性和产量,Taq酶浓度太高会增加非特异性产物,过低又会使产物量降低。本实验认为,在 25μl的反应体系中加入 1.5 U的酶较合适。另外,不同厂家从不同菌株上分离的 Taq酶其活性可能有差异应加以注意。

2.7 引物浓度对 RAPD-PCR的影响

由于 RAPD-PCR反应使用的是单一的随机引物,所以反应体系中使用高浓度引物更有利于造成引物和模板错配的机会,但是引物浓度不宜太高,否则会有非特异性产物产生,反应体系中含有 0.2μmol/L的引物即可。

3 讨论

对 RAPD-PCR影响因素很多,除本实验涉及的因素外下列因素也都对 RAPD-PCR有影响:① 模板 DNA的浓度及纯度,因为引物和不同浓度的模板 DNA结合有所不同,DNA在制备过程中若残留过多的酚、氯仿、酒精、蛋白质等均对 RAPD-PCR有影响;② 反应体系中其它杂质离子浓度过高也影响 RAPD-PCR,我们在实验中发现,当反应体系中 Na^{+}浓度超过 40 mmol/L时,很难扩增出结果;③ 由于不同厂家生产的 PCR仪控温精度有所不同,因此在优化 RAPD-PCR条件也应注意;④ 不同厂家生产的反应缓冲液成份的细微差异,甚至即使同一厂家生产的缓冲液,若使用的 Mg^{2+}、Taq酶与之不匹配有时也影响 RAPD-PCR。另外,实验人员素质的差别对反应也有影响,但是只要条件稳定,操作中养成严谨的态度,对影响因素引起足够的重视,其结果是具有重复性的,RAPD技术本身是稳定的。

综上所述,在本实验条件下得到的小鼠较好的 RAPD-PCR反应体系及扩增程序为: 在 25μl的反应体系中含有 10× buffer 2.5μl, dNTP 200μmol/L Mg^{2+} 2.5 mmol/L,引物 0.2μmol/L, Taq酶 1.5 U,模板 DNA 20 ng,扩增程序为 94℃变性 1 min, 38℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 40个循环后接 10 min 延伸。

参考文献

1 Chalmers K J, Waugh R. Detection of gonetic variation between and within population of glinicidia sepium and G, maculata using RAPD markers. Heredity, 1996, 69( ): 465

2 刘恩岐,张 薇,徐仓宝,等. RAPD技术在实验动物学研究中的应用.实验动物科学与管理, 1997, 14(4): 57

3 张文艳,龚春梅.一种新的近交系实验动物遗传监测方法及小鼠性别相关 RAPD标记的发现.实验生物学报, 1996, 29(4): 59

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

4 陈永久,张亚平.随机扩增多态 DNA影响因素的研究.动物学研究, 1997, 18(2): 221
5 林万明 主编. PCR技术操作和应用指南.北京:人民军医出版社, 1993. 9~ 11
6 孟祥文,李 璞. AP-PCR技术及应用.国外医学:遗传学分册, 1995, 18(3): 117

(收稿: 1998-09-04;修回: 1998-12-09)
(编辑 仇玉福)

Optimizing of RAPD-PCR procedure in mice*

Wu Fengchun, Wei Hong (Laboratory Animal Center, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To optimize the RAPD-PCR procedure in mice. Methods: Forty primers were used to amplify DNA in 9 strains of mice and then the results of the amplification were analyzed. Results: Optimal reaction system was as follows: 25μl of each PCR mixture containing 2.5μl of 10× Taq Reaction buffer, 200μmol/L of each dNTPs, 2.5 mmo/L of Mg^{2+}, 0.2μmol/L of primer, 1.5 unit of Taq DNA polymerase and 20 ng of total DNA. The reaction condition was 40 cycles of denaturation at 94℃ for 1 min, annealing at 38℃ for 1 min and extension at 72℃ for 2 min. Conclusion: The use of the above-mentioned reaction system and amplifying procedure for RAPD-PCR in mice can get stable results.

Key words random amplified polymorphic DNA; optimizing

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 3960079

腹部巨大淋巴增生 1例报告

A case report of abdominal castleman disease

戚跃勇* 初铭忠 张哉根** (第三军医大学附属新桥医院放射科)重庆, 400037

腹部巨大淋巴结增生较少见,现报告 1例。

1 临床资料

患者男性, 51岁,腹痛、腹胀、右下腹包块 3月。包块 4 cm × 4 cm大小,质硬。

影像表现:钡剂灌肠发现右下腹包块与结肠无明显相关,仅见回盲部位置较高,考虑游离盲肠。腹部 B超示右下腹实性占位包块。腹部 CT平扫见右下腹近腹壁有 5 cm× 5 cm大小类圆形块影, CT值 45 Hu,肿块后方及外侧有多个结节影。肿块下界达腹股沟,局部腹壁膨隆。

手术所见:右下腹膜后于髂窝及盆腔内可见 10 cm× 18 cm大小的实质包块,活动差,基底广。右侧输尿管及髂总动脉均包绕在包块内,分界不清。因包块与周围组织粘连,仅取活检。

病理诊断:右下腹浆细胞型巨淋巴结增生。

2 讨论

巨大淋巴结增生,又叫 Castleman病,是 1956年 Castleman提出的[1]。临床上分为局灶性和多中心性,组织病理学分为透明血管型、浆细胞型和混合型。本例为浆细胞型,(此类型少见)约占 10%。该病可发生在淋巴组织的任何部位,以纵隔淋巴结最常见,发生于腹部较少见。其病因及发病机制尚不清楚,炎症与感染可能是本病的病因,并与免疫因素有关[2]。本病以青壮年多见,病程较长,多为体检时发现。肿块多为单发的圆形,椭圆形或结节状病变。

肿块内如见钙化者,腹部平片多能发现病灶[3]。腹部超声检查多能显示肿块的形态及其与周围脏器的情况。钡剂灌肠可排除结肠病变的可能性,并可显示肠道的推压及侵犯等情况。CT检查是较好的手段。该病例 CT检查能清楚地显示肿块的位置、大小、形态、密度及其与周围脏器的关系等。文献[1,4]报道该病多有强化,尤其是透明血管型,本病例因未行 CT强化扫描,故术前未能发现右髂总动脉的受侵改变。MRI能更好地显示病灶与周围血管的关系,为治疗方式的选择提供依据。

关键词 巨淋巴结增生;腹部;影像诊断
中图法分类号 R816.4

参考文献

1 Moon W K, Lm J G, Kim J S, *et al*. Mediastinal castleman disease: CT findings. J Comput Assist Tomogr, 1994, 18(1): 43
2 武淑兰,李竞贤,陈宏民,等. Castleman病 8例的临床病理学研究.中华内科杂志, 1994, 33(3): 179
3 万科晟,尹传胜,杨贞振,等.巨大淋巴结增生症.实用放射学杂志, 1993, 9(10): 604
4 孙修堂,崔新建,葛 婷.盆腔巨大淋巴结增生.中华放射学杂志, 1994, 28(10): 691

(收稿: 1998-07-30;修回: 1998-12-01)
(编辑 王 红)

* 戚跃勇,男, 29岁,住院医师,学士 ** 附属新桥医院病理科

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