DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.03.028
第18卷第3期 第三军医大学学报 Vol,18,No.3
1996年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun.1996

RT-PCR 制备人 IL-3 cDNA 的改进

经验交流

Improvement in the preparation of h-IL-3 cDNA by RT-PCR

陈鸿书 曹廷兵 姚家慧 陈 嵩 (第三军医大学基础部基因工程实验室)重庆,630038

人白细胞介素-3(h-IL-3)是维持人体造血机能,调节免疫与炎症反应过程中具有重要作用的淋巴因子[1],克隆 IL-3 基因,是用基因工程生产 h-IL-3 的重要环节。克隆真核基因的传统方法需经历分离 mRNA,制备 cDNA 文库,以及烦琐的筛选工作等,工作量大,由于 mRNA 的不稳定性,制备足量的完整 mRNA 比较困难,常有遭到失败之虞。h-IL-3 基因是单拷贝基因,即使经过诱导,细胞中 IL-3 mRNA 的丰度仍低,为解决这些困难,本文采用 RT-PCR 制备便于克隆的 IL-3 cDNA。

1 材料与方法

1.1 淋巴细胞的制备及培养

正常成人静脉血以肝素抗凝,按文献[2]的方法制备 PBL 及培养,用 PHA 1 μg/ml 及 TPA 10 ng/ml 诱导培养 8 h。

1.2 寡聚脱氧核苷酸(ODN)探针及 PCR 引物的化学合成及纯化[2]

1.2.1 h-IL-3 cDNA 探针 按文献[3]报道的 h-IL-3 cDNA 第一外显子 5'端的 33 nt 序列设计

3'-AGATTGTACTAGCTACTTTAATATTGTGTGAAT-5'

1.2.2 引物 所用 PCR 引物对为分别与 h-IL-3 cDNA 两条互补链的 3'端互补的 27 聚 ODN,引物对的 5'端分别连接限制性内切酶切点的序列 BamH I (GGATCC)与 Sal I (GTCGAC)。引物对的核苷酸序列如图 1 所示。

引物 A 5'-GGATCCCCAAACATGAGCCGCCTGCCC-3'
(Bam H)
引物 B 5'-GTCGACTCAAAAGATCGCGAGGCTCAA-3'
(Sal I)

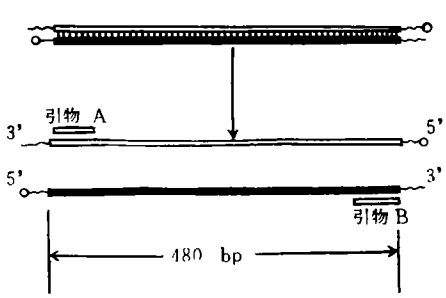


图 1 PCR 引物的序列及其在 IL-3 cDNA 中的结合位置

1.3 h-IL-3 ODN 探针的同位素标记

按文献[4]的方法,用(r-^{32}P)-ATP(3740 Ci/mmol),标记其 5'端,探针的比放射性为 2×10^{8} $min^{-1}\cdot\mu g$。

1.4 细胞总 RNA 的提取

用经 PHA 及 TPA 诱导 8 h 的正常人外周血淋巴细胞(PBL),按 AGPC 法[5]提取其总 RNA。

1.5 PCR 扩增 h-IL-3 cDNA

参照文献[6]的方法略加改良,PCR 缓冲液改为 pH8.8。

1.5.1 合成 h-IL-3 cDNA 第一条链 用反转录酶法,将上述 AGPC 法提取的 RNA 2 μg 加到 20 μl 含 4 种 dNTP(每种浓度为 1 mmol/L),10 pmol/L 引物 B,20 单位 RNasin 及 0.2% gelatin 1 μl 的反转录缓冲液中,置 95℃加热 5 s,待冷后加 M-mlv反转录酶 200 单位,置 37℃温育 1 h 进行反转录(1×反转录缓冲液为:50 mmol/L Tris-HCl (pH8.3);50 mmol/L KCl;8 mmol/L $MgCl_2$;1 mmol/L each dNTPs)。

1.5.2 PCR 在 100 μl 反应体系中进行,内含上述反转录的产物 20 μl,1×PCR 缓冲液 79 μl,引物 A 50 pmol/L,引物 B 40 pmol/L,4 种 dNTPs 各 200 μmol/L,置 95℃保温 5 min,使模板充分变性及反转录酶失活,高速离心 5～10 s,冷却至室温,加 Taq DNA 聚合酶 1 μl(2 单位),加液体石蜡油 100 μl 盖覆液面,置本室自制的 PCR 仪中进行 30 轮反应,每轮反应包括 94℃变性 30 s;50℃退火 2 min;72℃延伸 4 min。30 轮反应完成后,继续在 72℃反应 10 min,反应产物用含 EB(0.5 μg/ml)的琼脂糖凝胶电泳以分离其 DNA 组份,电泳结束置 UV 照射下观察结果。然后用 Southern 印迹杂交作进一步鉴定。(1×PCR 缓冲液为:50 mmol/L KCl;10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8);15 mmol/L $MgCl_2$;0.01% Gelatin)。

1.6 Southern 印迹杂交

Southern 转移按文献[6],核酸分子杂交按文献[2]的方法进行。

2 结果与讨论

PCR 是在 94℃,50℃及 72℃ 3 种温度连续有序地周期性变换过程中进行的酶促反应,因此,精确控制温度的高低,持续时间及温度交换的速度等都直接影响实验结果,据文献[7]报道,在 PCR 系统中,除酶外,模板 DNA 在较高温度环境中常发生脱嘌呤反应,从而阻碍 PCR 顺利进行,Lindahl 等证明脱嘌呤反应与缓冲液的 pH 变化有关,PCR 缓冲液中的 Tris 的 pKa 常随温度升高而改变,平均每升高温度 1℃,就使 pH

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



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