

# 高效液相色谱法分析逆转录聚合酶链反应产物\*

廖 杰<sup>1</sup>, 赵玉兰<sup>1</sup>, 董芳霆<sup>2</sup>, 杨 军<sup>1</sup>, 郝秀华<sup>3</sup>

(1. 解放军总医院医学实验测试中心, 北京 100853; 2. 军事医学科学院国家生物医学分析中心, 北京 100000; 3. 解放军总医院基础医学研究所生化室, 北京 100853)

摘要: 建立了分离逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)产物的高效液相色谱方法, 反应液直接进样, 用 TSK gel DEAE-NPR 柱分离, Tris-HCl 缓冲溶液(pH 9.0)-氯化钠线性梯度洗脱, 于 260 nm 处检测。用所建立的方法分析了大鼠肠缺血/再灌注损伤后外周血中性粒细胞(PMN)磷脂酶 A<sub>2</sub> mRNA 的表达。

关键词: 高效液相色谱法, 逆转录聚合酶链反应, 磷脂酶 A<sub>2</sub>

中图分类号: O658, Q5 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(1999)05-0491-02

## 1 前言

逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)是以 mRNA 为模板, 在逆转录酶的作用下合成互补的 DNA 链(cDNA), 并以此为模板进行 PCR 扩增的一种方法, 已广泛用于检测生物样品中 mRNA 的表达。扩增反应后, 通常用饱和氯仿抽提 cDNA 产物, 再进行琼脂糖电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。与这些常用方法相比, 高效液相色谱法具有简便、快速、定量准确和制备方便等优点<sup>[1,2]</sup>。我们建立了 RT-PCR 反应液直接进样进行 HPLC 分析的方法, 并将这一方法用于大鼠肠缺血/再灌注损伤后外周血中性粒细胞(PMN)磷脂酶 A<sub>2</sub> mRNA 表达的研究。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器、材料和主要试剂

HP 1050 高效液相色谱仪, Biotech HS-97 型基因扩增仪。

雄性 Wister 大鼠(军事医学科学院动物中心), AMV 逆转录酶, RNasin 酶, DNA 聚合酶(华美公司提供的 Promaga 产品), λ-DNA-Hind III 相对分子质量参照物(华美公司), pBR322 DNA-Hae III 相对分子质量参照物(华美公司)。

三羟甲基胺基甲烷(Tris), 氯化钠等(国产分析纯试剂), 氯喹(chloroquine)(SIGMA 公司)。

### 2.2 动物模型和细胞分离

将大鼠随机分成对照组、损伤组和氯喹保护组。将动物麻醉, 无菌开腹分离腹腔肠系膜前动脉(SMA), 夹闭 60 min, 再灌注 270 min 后心脏抽血分离 PMN。药物保护组在夹闭后 60 min, 再灌注前, 腹腔注射氯喹(每 kg 体重注射 5 mg)。其它处理同前。

### 2.3 RT-PCR

1 × 10<sup>6</sup> PMN 经 Hanks 液反复清洗 2 次。离心

沉淀, 加 200 μL 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)悬浮, 用异硫氰酸胍-氯仿一步抽提法提取细胞总 RNA, 用体积分数为 75% 的乙醇沉淀并真空干燥。

用提取的 RNA 2 μg, 用 4 U AMV 逆转录酶和 RNasin 酶, 经 42 °C 水浴 1 h, 98 °C 水浴 5 min, 取 5 μL 进行 PCR。

从大鼠血小板完整 sPLA<sub>2</sub> DNA 序列中具有表达蛋白活性的区域设计出 PLA<sub>2</sub> 两段引物, 分别为 P1: 5'-GAGTTTGGGCAAATGAT-3' 和 P2: 5'-GCTTTATCGCACTGGC A-3'。P1 和 P2 各 2 μL (50 pmol), 4 × dNTP (400 μmol), Taq 酶 0.5 U, 4 °C 预变性 3 min 后, 按 94 °C 35 s, 72 °C 60 s, 55 °C 50 s 进行 32 个循环, 55 °C 延伸 5~10 min。取 10 μL 反应产物注入 HPLC 系统。

### 2.4 HPLC 分析条件

色谱柱: TSK gel DEAE-NPR 柱(35 mm × 4.6 mm i.d., 粒度 2.5 μm); 流动相: A. 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 9.0, 含 0.25 mol/L NaCl; B. 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 9.0, 含 1.0 mol/L NaCl; 线性梯度: 开始时 20% B, 10 min 后达到 100% B; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 260 nm。

## 3 结果和讨论

### 3.1 λ-DNA-Hind III 相对分子质量参照物的分离

TSK gel DEAE-NPR 柱是以无孔亲水树脂为基质, 表面键合了二乙胺基乙基。由于不存在孔径对大片段 DNA 分离的限制, 分辨率高, 分析速度快, 已开始较多地用于 DNA 片段的分析。我们曾经用 TSK gel DEAE-NPR 柱成功地分离了核酸相对分子质量参照物 pBR322 DNA-Hae III, 并对乙肝病毒基因 PCR 产物进行了分析<sup>[3]</sup>。

λ-DNA-Hind III 是 λ-DNA 被 Hind III 彻底水解

\* 收稿日期: 1998-05-19, 修回日期: 1998-07-26  
基金项目: 国家自然科学基金资助课题(39770716)

并经加热灭活的产物,在核酸分析中也被用作相对分子质量参照物。该产物含有以下片段:125 bp, 546 bp, 2 027 bp, 2 034 bp, 4 361 bp, 6 557 bp, 9 461 bp 和 23 130 bp。用选定的 HPLC 系统对  $\lambda$ -DNA-Hind III 进行分离的结果见图 1。DNA 片段的出峰顺序与其链长相一致,片段越长,在系统中的保留时间也越长。各片段峰的确定参照文献[1]。

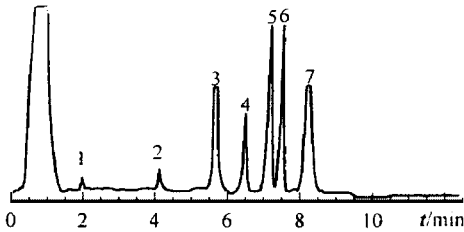


图 1  $\lambda$ -DNA-Hind III 参照物的 HPLC 图

Fig. 1 Separation of  $\lambda$ -DNA cleaved with Hind-III by HPLC

峰 (Peak): 1. 125 bp, 2. 564 bp, 3. 2 027/2 034 bp, 4. 4 361 bp, 5. 6 557 bp, 6. 9 461 bp, 7. 23 130 bp。

我们分别考察了梯度、流速和柱温对分离的影响。结果表明,NaCl 浓度以  $50 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$  的速度变化,流速为  $1 \text{ mL}/\text{min}$ ,此时在室温条件下能够得到最佳的分离结果。

### 3.2 大鼠肠缺血/再灌注损伤后 PMN 磷脂酶 $A_2$ mRNA 的表达

大鼠对照、损伤和氯喹保护组 PMN 磷脂酶  $A_2$  RT-PCR 产物的 HPLC 图谱见图 2。分泌型磷脂酶  $A_2$  是一种 14 kD 的活性酶,对 PMN 的趋化、吞噬、

黏附以及呼吸爆发等功能有重要的调节作用。分析结果表明,磷脂酶  $A_2$  在正常免疫反应细胞中有一定表达(图 2-a),扩增片段约为 272 bp,可用  $\lambda$ -DNA-Hind III 和 pBR322 DNA-Hae III 对产物峰进行定性。大鼠损伤能诱导上述细胞出现凋亡,导致基因断裂,伴随特异磷脂酶  $A_2$  基因表达减少(图 2-b)。氯喹通过早期阻断磷脂酶  $A_2$  活性,稳定了膜结构,减少了凋亡细胞,从而导致扩增产物增多(图 2-c)。

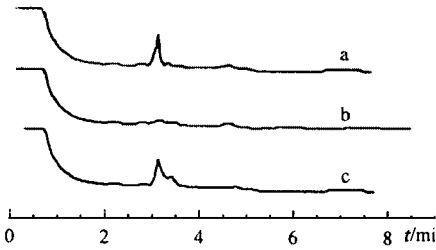


图 2 大鼠对照(a)、损伤(b)和氯喹保护组(c)外周血 PMN 分泌型磷脂酶  $A_2$  RT-PCR 产物的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC separation of the RT-PCR products of secreted phospholipase  $A_2$  in control (a), injured (b) and chloroquine protectgroup(c) animal PMN

## 参 考 文 献

- 1 Hisashi Y, Kenich H, Osamu O et al. Anal Biochem, 1996, 240: 242-250
- 2 Helmt G, Grayson B, Lipford Y et al. Journal of Immunological Methods, 1993, 158: 229-236
- 3 廖 杰,周建忠,钱小红等. 色谱, 1996, 14(6): 462~463
- 4 颜光涛,郝秀华,李振甲等. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22(5): 443~445

## High Performance Liquid Chromatography for Analysis of Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Products

Liao Jie<sup>1</sup>, Zhao Yulan<sup>1</sup>, Dong Fangting<sup>2</sup>, Yang Jun<sup>1</sup>, Hao Xiuhua<sup>3</sup>

(1. Medical Experiment & Analysis Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China;

2. National Biomedical Analysis Center, Military Medical Academy, Beijing 100000, China;

3. Res. Laboratory of Biochemistry, Basic Medical Institute of PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

**Abstract:** The polymerase chain reaction is a powerful method for amplifying specific DNA sequences in vitro. Reverse transcribing mRNA into cDNA expands the use of PCR to monitor mRNA expression in biological system. A method for the analysis of RT-PCR products by HPLC was developed. The separation was performed on a nonporous ion exchange resin column with gradient elution of sodium chloride in  $20 \text{ mmol}/\text{L}$  Tris-HCl buffer (pH 9.0) at a flow rate of  $1.0 \text{ mL}/\text{min}$  and the detection wavelength was 260 nm.  $\lambda$ -DNA-Hind III digest and a series of RT-PCR products were analyzed for studying the mRNA expression of secreted phospholipase  $A_2$  after being injured.

**Key words:** high performance liquid chromatography, reverse transcription polymerase chain reaction, phospholipase  $A_2$