

一种有推广价值的快速全血 PCR 技术

张立冬 张 杰 朱天慧

(南开大学医学院, 天津 300071)

A Valuable Rapid PCR Method Using Whole Blood

Zhang Lidong Zhang Jie Zhu Tianhui

(Medical College of Nankai University, Tianjin 300071)

聚合酶链式反应(PCR)是一种有效的体外扩增目的基因技术, 目前已得到广泛应用⁽⁵⁾。一般步骤是从血液或其它组织中提取 DNA (RT-PCR 除外)后, 再进行 PCR⁽⁶⁾。DNA 提取过程费力、费时, 而且当患者只能提供很微量血液标本如微升水平时, 这种提取 DNA 后再 PCR 方法更是不方便或不可行。1990 年, Mercier 等首先发现并报道了直接新鲜或冷冻全血 PCR 技术⁽³⁾, 使以血细胞 DNA 为模板的 PCR 技术变得快速、方便。为了进一步研究该方法的特点, 我们随机选用二对引物对全血 PCR 扩增时全血最佳量及全血 PCR 与纯化 DNA PCR 关系做了研究。

1 材 料 和 方 法

1.1 血液来源

取正常人外周静脉血 5ml, 2%EDTA 0.5ml 抗凝, -20℃冻存备用。取正常人耳血, 立即 PCR。

1.2 寡核苷酸引物

$\beta 2$ 微球蛋白($\beta 2$ -M), 参考 $\beta 2$ -M cDNA 序列设计引物⁽²⁾, A₁: 5'ACTTCTGTGTCTGCTGCTCA3', A₂: 5'GTCCTGGACCCACTTCTGTGT3', 扩增片段长度 614bp。肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 参考 TNF- α cDNA 序列设计引物⁽⁷⁾, T₁: 5'CTCTCTCTAATCAGCCCTCTG3', T₂: 5'TGAGTCGGTCACCCTTCTCCA3', 扩增片段长度 427bp。二对引物均由中国医学科学院血液学研究所合成(天津医科大学赵琪博士惠赠)。

1.3 PCR 方法及扩增产物分析

1.3.1 PCR 反应体系 50 μ l, 内含 1 \times PCR 缓冲液(美国生命技术公司): Tris(pH9.0)10mmol/L, KCl 50mmol/L, MgCl₂1.5mmol/L, dNTP 200 μ mol/L(华美生物工程公司), 每对引物各 10pmol, Taq 聚合酶 1.5U(华美生物工程公司)。全血为模板时分别加全血 1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, 4 μ l, 纯化 DNA 为模板时加纯化 DNA 100pg 至 500ng 不等系列水平。

1.3.2 PCR 程序 (1)全血变性: 先加入缓冲液、水及冷冻抗凝血或新鲜血, 95℃3 分钟, 55℃3 分钟循环 4 次以破坏细胞膜及核膜释放 DNA。(2) PCR 按如下程序进行: 94℃变性 5 分钟后进入循环, 93℃40 秒变性, 60℃30 秒复性, 72℃1 分钟 30 秒延伸, 35 个周期后 72℃延伸 7 分钟。

1.3.3 扩增产物分析 1~1.5%琼脂糖电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下摄影。

2 结 果 与 讨 论

我们使用新鲜或冷冻全血均能看到 PCR 特异扩增带, 全血扩增产物片段大小与预计相同, 见图 1 和图 2。从图 1 和图 2 总结成表 1。对 $\beta 2$ -M, 1~3 μ l 全血均看到特异扩增带, 4 μ l 全血(8%)则看不到扩增带, 以 2 μ l 全血

(4%)时扩增效率最高。对 TNF- α , 1~4 μ l 全血均能看到特异扩增带, 3 μ l 全血(6%)时扩增效率最高。对 β 2-M, 2 μ l 全血扩增量与 10ng DNA 扩增量最接近(图 1)。对 TNF- α , 3 μ l 全血扩增量与 1ng DNA 扩增量最接近(图 2)。

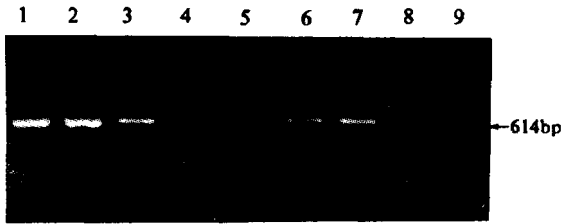


图 1 β 2-M 全血及纯化 DNA PCR 扩增结果
1. 50ng DNA; 2. 25ng DNA; 3. 10ng DNA;
4. 1ng DNA; 5. 100pg DNA; 6. 1 μ l 全血;
7. 2 μ l 全血; 8. 3 μ l 全血; 9. 4 μ l 全血。

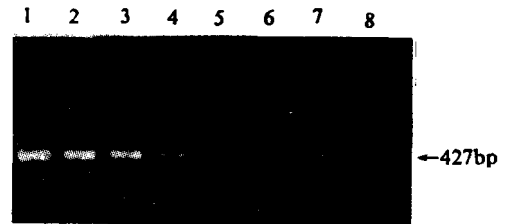


图 2 TNF- α 全血及纯化 DNA PCR 扩增结果
1. 500ng DNA; 2. 100ng DNA; 3. 5ng DNA;
4. 1ng DNA; 5. 1 μ l 全血; 6. 2 μ l 全血;
7. 3 μ l 全血; 8. 4 μ l 全血。

表 1 全血量与扩增效果比较表

全血体积(μ l)	1	2	3	4
全血比例(%)	2	4	6	8
β 2-M	++	+++	+	-
TNF- α	-	+	+++	+

- 没有扩增产物; + 少量; ++ 中等量; +++ 大量。

直接全血 PCR 与纯化 DNA PCR 不同之处是全血 PCR 在 PCR 循环开始前要经特殊条件的变性处理, 我们采用 95 $^{\circ}$ C 3 分钟, 55 $^{\circ}$ C 3 分钟循环 4 次以破坏细胞膜和核膜使其释放 DNA。本实验结果在 PCR 反应体积中以全血占 4~6% 扩增效果最佳, 8% 则抑制 PCR。这与 Mercier⁽³⁾ 和 Panaccio 等⁽⁴⁾ 的报道稍有差别, 他们认为, 1~2% 全血比例扩增效果好, 4% 则抑制 PCR。这种随着全血比例提高(>8%)抑制 PCR 的作用, 目前估计为细胞裂解后胞浆中的 K⁺ 释放使反应体系中 K⁺ 浓度增加所致, 降低 10 \times 缓冲液中 KCl 浓度可以在全血比例为 5~50% 时都能成功地进行 PCR 扩增, 但提高全血比例并不能增加扩增效率⁽¹⁾。全血最佳效率 PCR 扩增时所用的 2~3 μ l 全血已相当于 1~10ng 纯 DNA 扩增量, 适用于绝大多数 PCR 扩增的需要。

全血 PCR 以其取血量少(可取耳血), 减少病人痛苦, 免去提抽 DNA 程序, 节省费用、快速、准确等诸多优点值得在临床和科研中广泛推广应用。

参 考 文 献

- Burckhardt J. Amplification of DNA from whole blood. PCR Methods and Application, 1994, 3: 239
- Gussow D, Rein R, Ginjaar I, et al. The human β 2 microglobulin gene primary structure and definition of the transcriptional unit. J. Immunol., 1987, 139: 3132
- Mercier B, Gaucher C, Feugeas O, et al. Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. Nucleic Acids Res., 1990, 18: 5908
- Panaccio M, Lew A. PCR based diagnosis in the presence of 8%(V/V) blood. Nucleic Acid Res. 1991, 19: 1151
- Reiss J, Neufeldt U, et al. Diagnosis of haemophilia B using the polymerase chain reaction. Blut., 1990, 60: 31~36
- Walsh P S, Metzger D A, et al. Chelex 100 as a medium for a simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Bio. Techniques, 1991, 10: 506
- Wang A M, Creasey A A, et al. Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. Science, 1985, 228: 149

1996-01-02 收稿, 1996-06-27 修回。