

用荧光双链引物特异扩增并定量核酸

郭秋平^{1,2}, 李庆阁^{1,2}, 栾国彦^{1,2}, 梁基选^{1,3}

(1. 厦门大学生命科学学院; 2. 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室;
3. 厦门大学抗癌研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 描述了一种利用特殊的双链引物——突触引物, 用于核酸扩增的特异定量检测。在传统的引物的 5' 端标记荧光物质, 而在引物的互补序列的 3' 端标记荧光淬灭剂以封闭其延伸。二者杂交即成双链突触引物。在制备 PCR 反应混合物阶段以及加热的初期, 突触引物保持稳定的双链结构而不能引导扩增, 在退火阶段, 突触引物部分解链导致引物延伸, 荧光物质与淬灭剂分开而产生荧光。利用人 β 珠蛋白基因对此方法进行了验证。这种可自行退火的荧光引物不仅简单地实现了实时扩增, 同时比常规的热启动 PCR 更有效地提高了扩增的特异性。

关键词: 突触引物; 定量检测

中图分类号: Q 52

文献标识码: A

自 1985 年 Mullis 发明聚合酶链式反应(PCR)以来, PCR 技术已广泛应用于核酸研究的各个领域, 在临床诊断方面的应用也日益增加。随着分子生物学的发展, 人们对基因的检测已经越来越不满足于定性的检出, 而希望进行定量的研究, 实时荧光 PCR 应运而生。实时荧光 PCR 不仅很好地解决了扩增的定量问题, 更由于闭管操作大大简化了操作步骤, 因而广受欢迎, 并成为近几年的研究热点。目前的实时荧光 PCR 检测技术一般是加入探针(如分子信标、TaqMan 探针)或加入荧光染料嵌入 DNA 双链进行实时检测, 前者的缺点是探针的合成须多步完成, 制作成本高, 且探针序列必须已知等, 而后者无法区别特异和非特异扩增, 同时 PCR 扩增中引物二聚体的生成也将降低检测的灵敏度。我们在此提出一种称为“突触引物”的设计, 实现实时 PCR 的检测, 设计简单, 操作方便, 并能有效抑制引物二聚体的生成, 有望成为一种新的实时荧光 PCR 检测的有效手段。

突触引物的设计思路为, 在正常引物的 5' 端标

记荧光物质, 同时引入与正常引物自 3' 端起反向互补的序列, 其长度比正常引物略短, 并在该互补序列的 3' 端标记荧光淬灭物质。两者在杂交后, 由于荧光物质和淬灭剂同处双链一端并相互靠近而导致荧光淬灭。当核酸扩增时, 引物延伸而与其互补短链分离, 导致荧光得以恢复, 恢复的程度直接反映了核酸扩增的程度, 如果在退火阶段检测荧光变化, 就可以进行扩增的实时测定。由于引物 3' 端互补序列的存在, 使得正常引物发生非特异结合的可能性大为降低, 从而只有完全互补的靶序列的存在才能引发扩增的发生, 因此, 突触引物可以实现高特异的扩增和核酸定量。

1 实验部分

我们以人的 β 珠蛋白基因的 PCR 扩增为模型。选取人的 β 珠蛋白基因 (Genbank 序列名为 HuMMB5E) 的 -195~+73 的核苷酸序列^[2], 扩增片段长 278 bp。抽取人的血液 5 mL, 用淋巴细胞液

收稿日期: 2001-02-20

作者简介: 郭秋平, (1975-), 女, 硕士研究生。

分离血液白细胞,再用常规酚氯仿抽提,乙醇沉淀法提取白细胞 DNA,加入 30 μL TE 缓冲液溶解 DNA, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,作为 PCR 反应的模板。

PCR 反应前分别将正常引物与其互补序列进行杂交,形成突触引物。本实验两者以 1:1.5 比例混合,杂交液为 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 含 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 先于 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 热变性 15 min, 再 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 杂交 30 min。

PCR 反应时,配制的 50 μL 反应液中含 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 2.0~2.5 mmol/L MgCl_2 , 50 mmol/L KCl, 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP (Pharmacia), 2.0 U Taq 酶 (Promega), 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 突触引物 (正常引物和互补序列由上海生工生物工程技术服务有限公司合成), 10 μL 模板 DNA, 上覆 50 μL 石蜡油。反应经 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min 热变性后,再 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 35 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min 40 个循环,最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。实时 PCR 仪为 Cyclor iQTM Real Time PCR Detection System (Bio-Rad), 设定 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时检测荧光信号, 波长为 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=480\text{ nm}/520\text{ nm}$ 。

PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳 (含 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EB) 30 min。电泳完后用多色荧光凝胶成像系统 (Fluor-STM Multi Imager, BIO-RAD) 观察并照相。

2 结果与讨论

常规的 PCR 一般是加入单链寡核苷酸作为引物,而突触引物 PCR 反应加入的是双链互补结构的引物,所以首先我们对突触引物实时 PCR 技术可行

性进行了验证。图 1-1 是突触引物 PCR 反应产物的琼脂糖凝胶电泳结果,为特异的产物带出现,在样品 D 和 E 的泳道上跑在产物带前的类似引物二聚体的弱带表示的是未进行扩增反应的双链的突触引物。图 1-2 是相应的实时荧光 PCR 检测结果,阳性样品的荧光值有升起,且 PCR 反应的起始模板浓度越大,则荧光值上升需要的 PCR 循环数越小,同时荧光值上升所需要的循环数与 PCR 反应起始模板浓度呈正相关,空白管的荧光值没有变化,表明没有引物二聚体的生成。

为进一步说明该法的特异性,我们特意将突触引物的扩增与使用正常引物进行直接比较,实验使用的突触引物不进行荧光标记,而只将互补序列的 3' 端封闭使其无法延伸。实验采用荧光嵌入染料 SYBR Gold 指示双链 DNA 的增加情况。SYBR Gold 在溶液中没有荧光,当嵌入到 DNA 双链结构中时则产生荧光信号,但是 SYBR Gold 作为荧光指示剂缺乏特异性。也就是说,只要反应中有双链 DNA 生成,荧光强度就会增加。如果使用空白样品,也能观察到荧光强度升高,则可断定是非特异扩增。我们用引物设计软件 Olig04.0 分析过本实验的引物,它们之间发生 3' 重叠,有可能形成引物间二聚体。从图 2-1 可以看出,用正常引物进行扩增时,空白样品荧光强度果然上升,验证了非特异扩增的发生。在突触引物 PCR 中,二者的延伸引物完全相同,只是后者加入了反向互补序列,从图 2-2 可以看出,空白样品的荧光强度没有上升,说明突触引物的扩增无任何非特异扩增发生。没有引物二聚体的生成。

突触引物的提出,实际上利用了核酸竞争结合

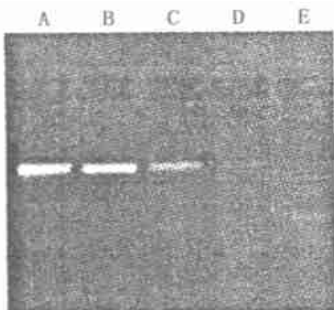


图 1-1

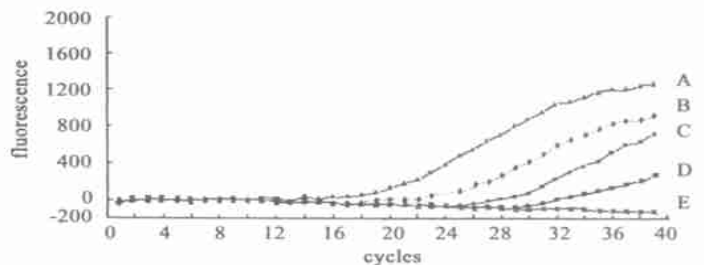


图 1-2

图 1-1 和图 1-2 分别是突触引物的琼脂糖凝胶电泳和实时荧光检测结果。上游突触引物 5'-FAM-gaagage-caag-gacaggttae-3' 5'-tacctgtctgtgctdte-dabcy+3', 下游突触引物为 5'-FAM-caattcatccagctteace 3' / 5'-gtgaagtg-gatgaagttg-Dabcy+3, A, B, C, D, E, 电泳带的模板浓度别为, 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10 和空白

Fig. 1-1 Agarose gel electrophoresis diagrams of PCR products using antenna primer

Fig. 1-2 Real-time PCR with antenna primer

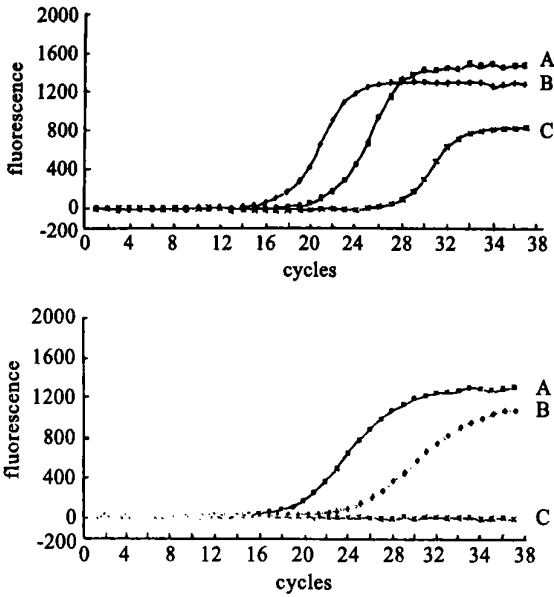


图2 突触引物和常规引物的PCR特异性比较.图2-1是常规上下游引物 5'-gaagagccaaggacaggtae-3' 和 5'-caacttcacacagncace-3' 的荧光嵌入染料法实时PCR检测结果;图2-2是上下游突触引物 5'-gagaccaaggacaggtae-3' / 5'-gtacctgtccttggtc dabc-3' 与 5'-caacttcacacagttcace-3' / 5'-ggtgaact ggalgaag dabey-3' 的荧光嵌入染料法实时PCR检测结果. A和B分别是 10⁰, 10¹, 梯度稀释模板, C为空白对照

Fig. 2 Specific comparison between antenna primers and conventional primers intercalater dye real-time PCR

的原理.由于引物互补序列的存在,使得引物错配的可能性大为降低.目前,“热启动”技术是非特异扩增的一种主要手段.其原理就是防止引物在低温阶段错配延伸.但是该技术只能在“启动”阶段防止错配延伸.但不能保证随后的扩增中的退火错配引发的非特异扩增.使用突触引物则不然,反应之前的低温阶段,突触引物以双链形式存在.延伸引物不可能再与不完全匹配的序列产生杂交.既防止了引物二聚体的形成,又杜绝了错配延伸的可能性.在随后的热循环中的退火阶段,互补序列的存在,使得它与模板竞争结合延伸引物.由于延伸引物的退火一旦发生,便会延长,因此在竞争结合中具有优势,这也是互补序列不能阻挡扩增的原因.另一方面,互补序列的存在,为延伸引物提供了热力学稳定状态,错配结合却是热力学不稳定状态,从而在动力学上抑制了错配反应的发生.值得说明的是,实验中使用的互补

序列浓度略大于其互补延伸引物,这就进一步限制了游离延伸引物的形成,而互补序列在5'端的短缩,则又从热力学上保证了延伸引物的竞争优势.因此,比热启动PCR更有优势的是,突触引物提供了全程降低非特异扩增的机制.

我们在实验中观察到,如果互补序列与延伸引物完全等长,会大大降低扩增效率.因为大量互补序列的存在,使延伸引物退火的几率大为降低.当然,互补序列如果过于短缩,则限制延伸引物的能力也会下降.我们在实验中还观察到,当互补序列比延伸引物短缩5个以上碱基时,已基本上不能发挥抑止非特异扩增的作用.

基于上述机制,突触引物由于在反应前和反应过程的退火阶段都以双链形式存在,因此本身不会产生荧光,只有模板存在时,延伸引物才会与模板的结合,导致其荧光的恢复,因此选择退火阶段测定荧光就可真实反映扩增产物的增加情况,实现实时测定.到目前为止,虽然已经有多种探针式和非探针式实时荧光扩增检测技术问世^[4~7],但前者只能指示而不能促使特异扩增,后者则既不能指示也不能促使特异扩增.因此,突触引物的提出,扩充了实时荧光定量PCR功能,尤其在稀有突变检测中具有重要应用价值.

参考文献:

[1] Zubritsky E. Pinning down PCR[J]. Analytical Chemistry, 1999, 71(5)191A-195A.
 [2] Vahey M T, Wong M T, Miceal N L. 标准PCR方法:β-珠蛋白DNA的快速分离和PCR分析. PCR实验技术指南(C. W, 迪芬巴赫, G. S. 德维克斯勒编著, 黄培堂, 余炜源, 陈添弥, 等译)[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 11-14.
 [3] Chou Q, Russell M, Birch D E. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications[J]. Nucleic Acids Res, 1992, 20(7):1717-1723.
 [4] Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization[J]. Nature Biotechnology, 1996, 14: 303-308.
 [5] Lee L G, Connell C R, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes[J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21:3761-3766.
 [6] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions[J]. Biotechnology (N Y), 1993, 11(9): 1026-1032.

030. on energy transfer[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25
[7] Nazarenko A, Bhatnagar S K, Hohman R J. A closed (12): 2 516- 2 521.
tube format for amplification and detection of DNA based

Specific and Quantitative Assay for DNA Sequence Amplification by Using a Doubled Stranded Primer

GUO Qiu-ping^{1,2}, LI Qing-ge^{1,2} LUAN Guo-yan^{1,2} LIANG Ji-xuan^{1,3}

(1. School of life science, Xiamen Univ., Xiamen 361005, China; 2. Key Lab. of Ministry of Edu. Cell Biol. and Tumor Cell Eng. of Xiamen Univ., Xiamen 361005, China; 3. Canc. Res. Cent, Xiamen Univ., Xiamen 361005, China)

Abstract: A simple, specific and quantitative assay for DNA sequence amplification by using a doubled stranded primer called antenna primer is described. To construct antenna primer, the conventional primer was labeled with a fluorophor at its 5'-end, and a complementary sequence of the primer was labeled at 3'-end with a dark fluorescent quencher to block its extension, and non-fluorescent double-strand primer was formed upon hybridization. During preparation of the reaction mixture and initial heating, the antenna primer has a stable duplex structure and cannot serve as an effective primer for DNA polymerase. After heating to the annealing temperature, it partially melted and primer extension began and fluorescence was produced. The method has been validated with amplification of human β -globulin gene. The antenna primer is a novel design. The self-annealing fluorogenic primers not only realize real-time amplification in a simple way, but also offer improved specificity and more robust synthesis than hot start PCR.

Key words: antenna primer; quantitative assay