

技术与方法 ·

酶抗体应用实现热启动 PCR

林 晴¹⁾, 许木于²⁾, 李庆阁²⁾ *

(¹⁾福建中医学院, 福建 福州 350001; ²⁾厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要 通过制备酶抗体, 形成抗原抗体复合物, 使得酶在较高的温度 95 °C, 1 min, 得以释放发挥聚合活性, 实现热启动 PCR. 建立的热启动 PCR 体系灵敏度高, 可以检测到 1 个拷贝的 DNA 分子, 较普通 PCR 体系提高了 3 个数量级, 并且具有较好的线性关系. 这种通过形成抗原抗体复合物达到热启动 PCR 目的的方法的建立, 具有着重要的意义, 是提高 PCR 灵敏度和特异性的重要方法之一.

关键词 热启动; 抗体; PCR

中图分类号 Q503

Using Antibodies Against Taq-FS Polymerase for Hot-start PCR

LIN Qing¹⁾, XU Mu-Yu²⁾, LI Qing-Ge²⁾ *

(¹⁾ Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350001, Fujian, China;

²⁾ School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract Hot-start PCR is advantageous for its higher speciality, sensitivity and linear amplification. We have used an antibodies against Taq-FS polymerase for the setup hot-start PCR reactions. The antibody used could block the activity of Taq-FS polymerase at low temperature (or below). When heated at high temperature 95 °C, 1 min, the antibody was denatured and the activity of Taq-FS polymerase was released. Our hot-start PCR system was capable of detecting as low as one copy of template DNA.

Key words hot-start; antibody; PCR

1983年, 美国 PE-Cetus 公司 Mullis 发明了聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术, 在体外几小时就可以将 1 个 DNA 分子扩增 10^9 倍^[1,2]. Taq DNA 聚合酶是一种从水生栖热菌 (*Thermus aquaticus*) YF-1 中分离得到的耐热的 DNA 聚合酶. Saiki 等^[1] 首度将其应用于 PCR 技术, 使得 PCR 过程实现了自动连续循环. PCR 技术具有特异性强、灵敏度高、快速、简便及重复性好等特点^[3]. 但是, Taq DNA 聚合酶在 20 ~ 37 °C 下仍有一定聚合酶活性^[4], 这对 PCR 反应是不利的, 容易产生非特异性的扩增以及产生引物二聚体. 目前, 可以通过很多途径来提高 Taq DNA 聚合酶的最适反应温度, 达到热启动的目的, 如对酶进行物理隔绝法^[5~9]、化学修饰法^[10]、设计特殊的引物^[11~13] 或者用基因工程的方法对酶进行缺失突变和定点突变^[4]. 但是, 这些方法容易导致 DNA 的脱嘌呤和断裂^[14,15]、影响酶的连续性^[16,17] 而且方法比较繁琐和昂贵, 我们则尝试使用抗体, 形成抗原抗体复合物, 使得酶在较高的温度下才得以释放发挥活性.

1 材料与方法

1.1 材料

引物、分子信标 (上海 Sangon 公司合成); dNTPs (上海 Sangon 公司); Taq-FS、包含异烟肼耐药 katG 基因的质粒 (本实验室保存); Taq HS (大连宝生物工程公司); 镍凝胶 (GE); Protein G 纯化试剂盒 (Pierce); 其它化学试剂均为国产分析纯.

1.2 抗体制备

1.2.1 抗原加入佐剂后免疫兔

Taq-FS DNA 聚合酶作为抗原, 以 0.2 mg/次的计量分别免疫 3 只兔. 首先于兔双后足掌皮下注射弗氏完全佐剂进行初次免疫. 2 周后, 于背部和胯关

收稿日期: 2007-09-24; 接受日期: 2008-01-16

* 联系人 Tel: 0592-2181156, E-mail: qgli@xmu.edu.cn

Received: September 24, 2007; Accepted: January 16, 2008

* Corresponding author Tel: 0592-2181156, E-mail: qgli@xmu.edu.cn

节多点注射抗原佐剂复合物,每隔 2 周进行 1 次。

1.2.2 抗原板的包被

用包被缓冲液将抗原稀释至 $5 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ 包被抗原板,在抗原板上,每个孔加入 $100 \mu\text{l}$ 抗原,4 过夜。次日,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 3 min。然后加入 BSA 封闭,于 4 保存备用。

1.2.3 ELISA 法检测抗体滴度

分别在免疫后第 8 周、第 10 周取 0.5 ml 左右兔子血液,37 静置 1 h 后,12 000 r/min,离心 15 min,取上清做 ELISA 实验,实验中二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG。

血清稀释,第 1 个梯度为 200 倍稀释,以后以 10 倍递减。稀释液为血清稀释液。每只兔子做 2 个平行排。然后取已经包被好的抗原板,每个孔加入 $100 \mu\text{l}$ 不同梯度稀释的血清 37 孵育 30 min。反复洗涤 5 次。于反应孔中加入新鲜稀释 20 000 倍的酶标第二抗体,山羊抗兔 IgG, $150 \mu\text{l}$, 37 孵育 30 min。反复洗涤 5 次,最后 1 次用 ddH₂O 洗涤。然后加底物液 TMB 显色,于各个反应孔中加入临时配置的底物溶液 0.1 ml , 37 15 min。最后于各反应孔中加入 2 mol/L 硫酸 0.05 ml , 终止反应。测 A_{450} 值。

1.2.4 抗体 IgG 的纯化

在得到的血清中,含有很多其他的杂蛋白,在应用前必须先对其进行纯化。首先室温下,在含抗 TaqFS 抗体的血清中以 2:1 的体积比加入饱和硫酸铵,4 5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,将沉淀重新悬浮于 PBS (137 mmol/L NaCl , 2.7 mmol/L KCl , $10 \text{ mmol/L Na}_2\text{HPO}_4$, $2 \text{ mmol/L KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.4) 溶液中,以 2:1 的体积比再次加入饱和硫酸铵,5 000 r/min 离心 10 min。重复 1 次。弃上清,将沉淀悬浮于 PBS 溶液中进行透析。透析 12 h,每 6 h 更换一次透析液。将透析得到的产物再用 Protein G 纯化试剂盒纯化。

1.3 热启动效果的检测

1.3.1 常温 TaqFS 聚合酶活性的检测选择加入抗体的最适浓度

在 PCR 反应中,为了达到热启动的效果,减少常温下的非特异性的扩增和引物二聚体的产生,我们制备了相应的酶抗体形成抗原-抗体复合物,在高温下抗体变性,酶抗原才释放出来发挥活性。但是在反应体系中,如果含过多的蛋白,会导致 PCR 效率严重降低;如果抗体量不足,则无法抑制抗原 TaqFS 常温下的活性。所以,筛选抗原抗体最适比例很重要。因此,我们通过常温下聚合酶活性检测来选择所加入抗体的最适浓度。基本原理就是,设计 1 条与

分子信标 (5'-FAM-CGCCCAAGGATTAGCTGTACATAGGCCGABCYL-3') 的环匹配的核苷酸序列 (5'-TGTACAGCTAATCC-3'), 退火后杂交。如果此时体系中的酶存在聚合酶活性,则核苷酸就会得到延伸,分子信标被打开,就可以检测到分子信标的荧光。我们就可以据此来判断常温下聚合酶是否具有活性,以及选择最适的抗体浓度。

25 μl 反应体系: 10 \times 缓冲液 $2.5 \mu\text{l}$, 2 mmol/L MgCl_2 , $0.2 \mu\text{mol/L}$ 分子信标, $0.4 \mu\text{mol/L}$ 引物, $200 \mu\text{mol/L}$ dNTPs, 0.5 mg/ml TaqFS, 以不同稀释度的抗体与 TaqFS 等体积混合。加入分子信标后立即放置于 Mx3000P 上。

反应条件: $40 \times 12 \text{ min}$, 每 2 min 收集 1 次荧光信号。95 1 min , 然后再 $40 \times 12 \text{ min}$, 每 2 min 收集 1 次荧光信号。原理如 Fig. 1 所示:

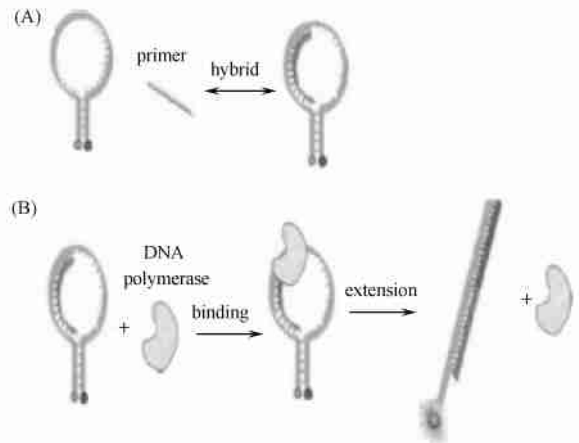


Fig. 1 Schematic of real-time monitoring of activity of polymerase based on molecular beacon^[18]

1.3.2 TaqFS 抗原抗体复合物的制备

将最适浓度的抗体与 TaqFS 于 37 孵育 1 h, 并 500 r/min 间断性摇动。然后放置在 Taq 贮存缓冲液中透析 12 h, 每 6 h 更换 1 次透析液。透析产物 - 20 保存备用。

1.3.3 热启动灵敏度的检测及对比

以构建的包含异烟肼耐药 katG 基因的质粒作为模板,考察热启动酶复合体扩增的灵敏度,将已知浓度的模板进行 10 倍梯度稀释,模板的浓度梯度为 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 (拷贝/ μl), 水为空白对照。

25 μl 反应体系: 10 \times 缓冲液 $2.5 \mu\text{l}$, 2 mmol/L MgCl_2 , $0.4 \mu\text{mol/L}$ 引物, $200 \mu\text{mol/L}$ dNTPs, 1% Evergreen, 1 U TaqFS 和抗体复合物, 模板 $1 \mu\text{l}$ 。与不加抗体的 TaqFS 及购自大连宝生物工程有限公司的 Taq HS 进行对照。

反应条件:95 3 min,95 15 s,55 20 s,72 20 s,50 循环.PCR 反应后,按 0.5 /step 的升温速率从 65 递增至 95 进行熔解曲线分析.

引物序列:上游引物 5 -GGTAA GGACGCGATCACCA -3
下游引物 5-ACAGGATCTCGAGGAACTGITGT-3.

2 结果

2.1 ELISA 法检测抗体滴度

以零点血清作为对照,在第 8 周测得抗体的滴度为 1 20 000 000 (Fig 2-A),经过 2 周后,滴度没有明显提高 (Fig2-B),说明到了第 8 周特异性 IgG 产生

的量到达平台期,心脏采血获得兔血清.

2.2 常温 Taq-FS 聚合酶活性的检测选择加入抗体的最适浓度

用分子信标来检测所要加入的最适抗体的浓度用于和酶形成复合物,如 Fig. 3-A 所示,没有加抗体的体系中,在检测的开始,Taq-FS 就发挥了聚合酶活性,检测到较高的荧光值. Fig. 3-B 所示,在加了酶抗体的热启动体系中,可以见到未稀释的原倍的抗体可以很好地和酶形成复合物,在常温下抑制酶的活性.在高温变性后酶释放,聚合酶活性得到恢复,荧光值升高.

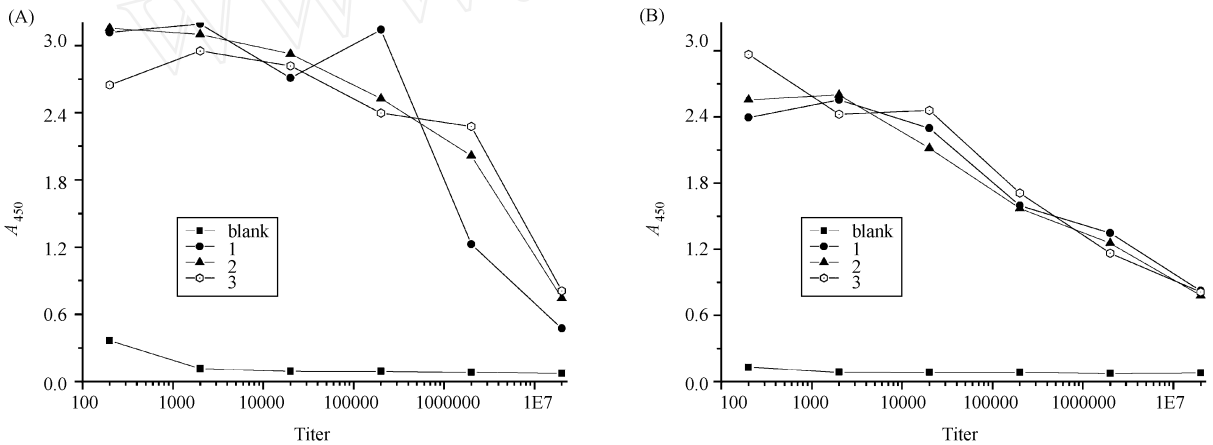


Fig.2 Change of titer of antibodies (A) Titer detected by ELISA at the eighth week; (B) Titer detected by ELISA at the tenth week

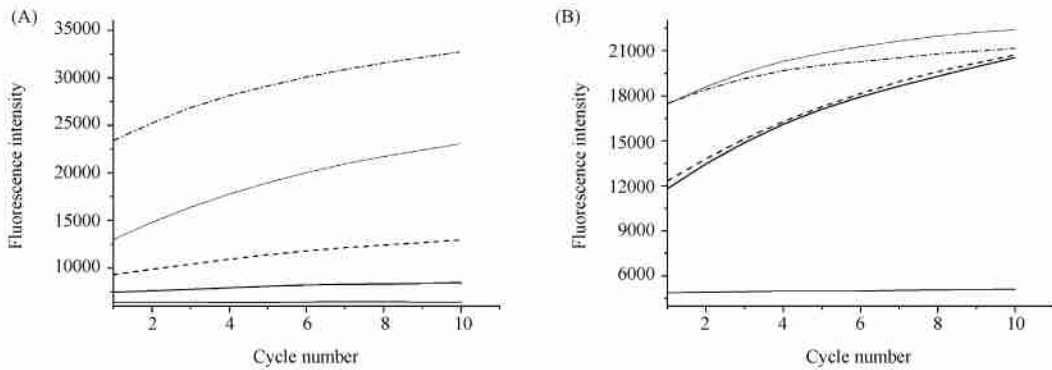


Fig.3 Hot-start of real-time PCR detection with molecular beacons (A) Hot-start of real-time PCR detection before antibody denaturalization. The reaction mixture (25 μ l): 10 \times buffer 2.5 μ l, 2 mmol/L MgCl₂, 0.2 μ mol/L molecular beacons, 0.4 μ mol/L primer, 200 μ mol/L dNTPs, 0.5 mg/ml Taq-FS, with different concentration antibody. Following exposure to 40 12 min, collecting fluorescence per 2 min; (B) After denaturalization at 95 1 min, then 40 12 min, collecting fluorescence per 2 min. (gray dash-dot lines: detection without antibody; black short-dot lines: detection with antibody diluted 4-folds; dark gray dash lines: detection with antibody diluted 2-folds; black solid lines: detection with antibody without diluting; gray solid lines: blank.)

2.3 热启动 PCR灵敏度的检测

将加入抗体的 Taq-FS 与不加抗体的 Taq-FS 进

行对比. 如 Fig. 4-A 所示,起始的模板浓度越低,达到仪器检测阈值的循环数 (C_t) 越高. PCR 扩增后对

产物进行熔解曲线分析,如 Fig. 4-B 所示,目的产物的熔点在 86 °C,产生的 2 种引物二聚体的熔点在 79 °C 和 82 °C。可见,不加抗体的 *Taq* FS 只能对 10^3 拷贝的模板进行扩增,而使用多抗热启动的 *Taq* FS

能对 1 个拷贝的 DNA 进行扩增。热启动 PCR 体系具有对低浓度的模板进行扩增的能力,提高了 PCR 反应的特异性与灵敏度。

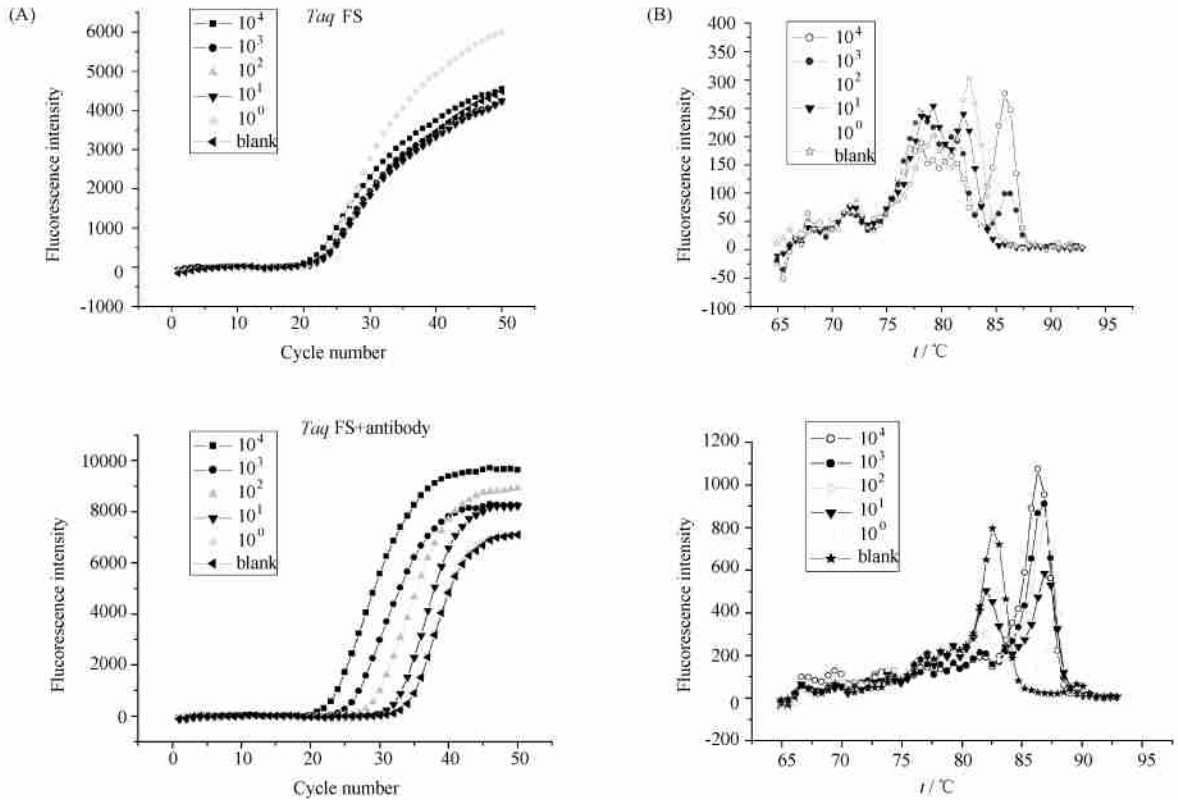


Fig. 4 Sensitivity of real-time PCR detection (A) Sensitivity detection with *Taq* FS and anti-*Taq* FS by real-time PCR. The reaction mixture (25 μ l): 10 \times buffer 2.5 μ l, 2 mmol/L MgCl₂, 0.4 μ mol/L primer, 200 μ mol/L dNTPs, 1% Evergreen, 1 U *Taq* FS/ anti-*Taq* FS, 1 μ l template which is diluted 10-folds in the range of 1.0×10^0 — 1.0×10^4 copies/ml. Following exposure to 95 °C 3 min, 95 °C 15 s, 55 °C 20 s, 72 °C 20 s, 50 cycles; (B) Melting curve analysis of PCR products and primer dimers from 65 °C to 95 °C 0.5 °C/step

2.4 热启动 *Taq* FS 与商品抗体酶体系 PCR 灵敏度的对比

将加入抗体的 *Taq* FS 与购自大连宝生物工程有限公司的 *Taq* HS 进行对比。如 Fig. 5 所示,不同浓度的模板都得到了明显的扩增。可见,2 种热启动的 PCR 体系均能对 1 个拷贝的 DNA 进行扩增,均具有较高的灵敏度。对实验结果进行线性关系分析,如 Fig. 6 所示,可见在热启动的 *Taq* FS 体系中,初始 DNA 模板的拷贝数浓度与其 C_t 值成更好的线性关系,更适于进行 PCR 的定量分析。

3 讨论

1991 年, D'Aquila 等^[19] 正式提出热启动 PCR 概念,即在高温(70 °C 左右)下使酶、模板 DNA 与引物混合,并与传统 PCR 进行对比实验,发现热启动

PCR 可显著增加特异产物的量,减少非特异的产物和背景。其后, Chou 等^[20] 对这一技术与标准 PCR 进行了严密的实验比较,证实室温下加样所形成的引物错配和引物二聚体是影响 PCR 特异性和敏感性的 2 个重要原因。这对目的片段的扩增是非常不利的,尤其是对低浓度的模板进行扩增时,往往会因为形成大量的引物二聚体或者是非特异性的扩增而导致得不到目的产物。热启动可避免 PCR 反应中引物与模板的非特异性复性和扩增,这对扩增大片段核酸非常重要。Gunther 等^[21] 在用 EXpand High Fidelity 扩增系统扩增全长 HBV 基因时,采用热启动方法,大大提高了基因扩增的特异性和灵敏性。目前,提高聚合酶反应温度,达到热启动 PCR 的方法有很多。早期通过物理隔绝的方法,步骤烦琐,容易造成污染。而现在使用经过化学修饰起到热启动作用的

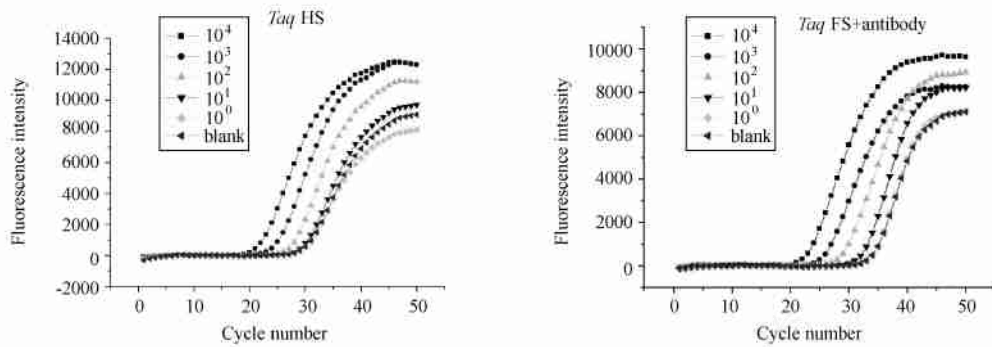


Fig. 5 Sensitivity of real-time PCR detection Sensitivity detection with *Taq* HS and anti-*Taq* FS by real-time PCR. The reaction mixture (25 μ l) : 10 \times buffer 2.5 μ l, 2 mmol/L MgCl₂, 0.4 μ mol/L primer, 200 μ mol/L dNTPs, 1% Evergreen, 1 U *Taq* FS/ anti-*Taq* FS, 1 μ l template which is diluted 10-folds in the range of 1.0×10^0 — 1.0×10^4 copies/ml. Following exposure to 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 50 cycles

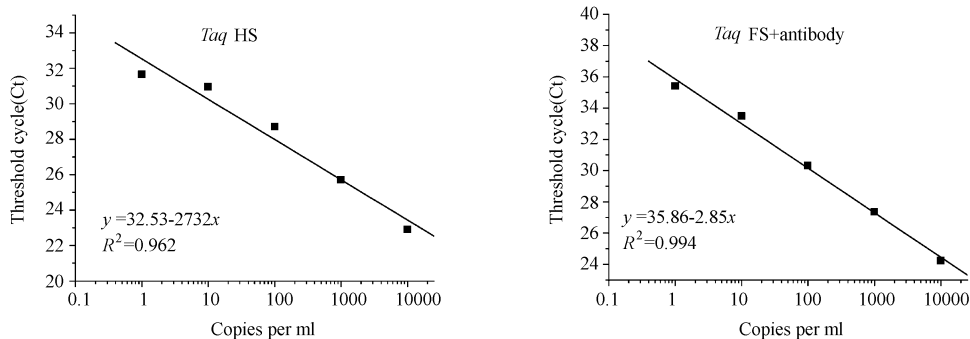


Fig. 6 Linear relationship between the number of threshold cycle values and the concentration of DNA

Ampli *Taq* Gold 和 Hotstart *Taq*, 有较高的特异性。但是, 由于酶活性的恢复需要经过 95 $^{\circ}$ C, 5 ~ 15 min 且反应的 pH = 8.3, 长时间的暴露在 95 $^{\circ}$ C 下容易造成 DNA 模板的脱嘌呤和断裂, 而且这些酶都比较昂贵。我们则利用酶的抗体, 在低温下形成抗原-抗体复合物使得酶失活, 在 95 $^{\circ}$ C, 1 min 后使得抗体变性, 聚合酶释放恢复活性。我们运用了普通的 PCR 体系, 加入了酶和抗体的复合物对不同浓度的模板进行扩增, 和没有加抗体的酶体系进行对照, 在模板浓度达到 10^2 个拷贝时几乎不产生非特异的扩增和引物二聚体。同时, 灵敏度提高了 3 个数量级, 可以扩增 1 个拷贝数的 DNA 模板, 并且具有较好的线性关系, 可以很好地用于 PCR 的定量分析。这种通过形成抗原-抗体复合物达到热启动 PCR 目的的方法的建立, 具有着重要的意义, 是提高 PCR 特异性的重要方法之一。

参考文献 (References)

[1] Saiki R K, Schaf S, Faloona F, *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for

diagnosis of sickle cell anemia [J]. *Science*, 1985, **230** (4732) : 1350-1354

- [2] Mullis K B. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction [J]. *Methods Enzymol*, 1987, **155** : 335-350
- [3] Keohavong P, Kat AG, Cariello NF, *et al.* DNA amplification in vitro using T4 DNA polymerase [J]. *DNA*, 1988, **7**(1) : 63-70
- [4] Kermekchiev M B, Tzekov A, Barnes W M, *et al.* Cold-sensitive mutants of *Taq* DNA polymerase provide a hot start for PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(21) : 6139-6147
- [5] 雷萍, 杨水云, 李续娥. 实现 PCR 热启动的一种简便实验室技术[J]. *生物技术通讯* (Lei Ping, Yang Shui-Yun, Li Xue. A simple laboratory method to achieve hot-start in PCR [J]. *Let Biotechnol*), 2003, **14**(5) : 403
- [6] Hebert B, Bergeron J, Potworowski E F, *et al.* Increased PCR sensitivity by using paraffin wax as a reaction mix overlay [J]. *Mol Cell Probes*, 1993, **7**(3) : 249-252
- [7] Kaijalainen S, Karhunen P J, Lala K, *et al.* An alternative hot start technique for PCR in small volumes using beads of wax-embedded reaction components dried in trehalose [J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**(12) : 2959-2960
- [8] Horton R M, Hoppe B L, Conti-Tronconi B M. Ampli Grease: 'hot start' PCR using petroleum jelly [J]. *Biotechniques*, 1994, **16**(1) :

- 42-43
- [9] Ramanujam R, Burdick B A, Landegren U D, *et al.* Method and preparation for sequential delivery of wax-embedded, inactivated biological and chemical reagents[J]. US patent, 1997, 5: 599-660
- [10] Morette T, Koons B, Budowle B. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA Polymerase [J]. Biotechniques, 1998, 25(4): 716-722
- [11] Kaboev O K, Luchkina L A, Tretiakov A N, *et al.* PCR hot start using primers with the structure of molecular beacons (hairpin-like structure) [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(21):94-102
- [12] Kainz P, Schmiedlechner A, Strack H. B. Specificity-enhanced hot-start PCR: addition of double-stranded DNA fragments adapted to the annealing temperature [J]. Biotechniques, 2000, 28(2):278-282
- [13] Dang C, Jayasena S D. Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR [J]. J Mol Biol, 1996, 264(2): 268-278
- [14] Lindahl T, Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid [J]. Biochemistry, 1972, 11(19):3610-3618
- [15] Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA [J]. Nature, 1993, 362(6422):709-715
- [16] Barnes W M. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(6): 2216-2220
- [17] Cheng S, Fockler C, Barnes W M, *et al.* Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA[J]. Proc Natl Acad. Sci U S A. , 1994, 91(12):5695-5699
- [18] Ma C, Tang Z, Wang K, *et al.* Real-time monitoring of DNA polymerase activity using molecular beacon[J]. Anal Biochem, 2006, 353(1): 141-143
- [19] D'Aquila R T, Bechtel L J, Videler J A, *et al.* Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating [J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(13): 3749
- [20] Chou Q, Russell M, Birch DE, *et al.* Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications[J]. Nucl Acids Res, 1992, 20(7):1717-1723
- [21] Günther S, Li B C, Miska S, *et al.* A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients [J]. J Virol, 1995, 69(9): 5437-5444

运动在染色体水平上延缓衰老

一项新研究发现,经长期观察,运动与其稍能延长寿命之间的关系源于保持DNA的状态。研究者报道,经常运动的人比久坐不动的人,其染色体末端的状态较好,这可能是前者的细胞寿命延续稍久,因此提高了总的存活率。染色体的末端称为端粒,由重复的DNA片断组成,其保护着染色体的末端,犹如鞋带的塑料顶尖保护着鞋带一样。端粒防止染色体降解,并防止染色体与别的染色体形成异常的键,但每一次细胞分裂时,端粒都要缩短一次。关于截短的端粒与衰老之间的可能的联系,在科技界展开了一场热烈的讨论,现在才知道端粒缩短到极限时,便意味着细胞的死亡。由于已知规律的运动可使有代表性的人物平均寿命增加数年。因此研究者开始测定运动对于端粒的长度有何效应。研究者查阅了英国的2401位成年双胞胎的健康集中登记的记录,这些成年双胞胎在调查表上详细地填写了他们的病史、个人习惯以及工作之外的活动,研究者并采集他们的血样以测定他们白细胞中端粒的长度。每周进行3小时以上中等度到激烈运动的人,其端粒长度要比很少运动的人明显地长得多。研究者在2008年1月28日的Archives of Internal Medicine上作了报道。研究者说,真正运动的人其端粒要比一般人年轻10年,轻缓的步行不能算是运动。在该项研究中,研究者说明了参与者在年龄、性别、社会经济状况、体质以及吸烟等方面的差异。在另一项分析中,研究者鉴定了67对双胞胎,其中有些双胞胎是完全相同的,有些是兄弟般的,双胞胎的其中之一的运动要比另一个多得多。运动多的这个人端粒比较长。这可以解释为何静坐少动的生活方式会与许多老年相关的疾病有关联,这些疾病如髌骨骨折、2型糖尿病、心脏病、中风和痴呆等。在身体不能适当地在细胞水平上修复自身时,这些疾病便出现了。运动对长寿而延缓衰老是有作用的。尚无证据证明人死于过短的端粒。但当研究运动与长寿的关系时,则运动对改善生活质量是相当重要的。同时,端粒可以作为生物衰老的标志。但是在该项研究中仅测量了白细胞中的端粒,这就很难了解在身体其他器官中端粒长度有什么真正的效应。

(李潇摘译自 Nathan Seppa :Science News, February 2, 2008, Vol. 173, p. 70)