

单壁碳纳米管对长片段聚合酶链式反应(PCR) 增效机理的初步研究

刘清岱¹, 王志伟¹, 李光壁², 王玉荣¹, 安红杰^{1,3}

(1. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457;
2. 天津科技大学海洋科学与工程学院, 天津 300457; 3. 阿德雷德大学环境科学学院, 澳大利亚 SA5005)

摘要: 为了开发新型基因扩增技术, 采用两步 PCR (two-step PCR) 和 *rpsL* 保真度实验等方法, 对单壁碳纳米管 (single-wall carbon nanotube, SWCNT) 在长片段 PCR 反应中的增效机理进行研究. 结果表明: 在长片段 PCR 反应中, 单壁碳纳米管最适工作质量浓度为 0.8 mg/mL; 单壁碳纳米管可以在较短的延伸时间增加扩增产物产量, 提高 DNA 聚合酶的反应效率; 通过 *rpsL* 保真度实验显示, 对照组 PCR 产物的错误率为 5.32×10^{-6} , 而实验组的错误率仅为 2.39×10^{-6} .

关键词: PCR; 单壁碳纳米管; 保真度

中图分类号: Q812 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2012)02-0001-04

A Preliminary Study of Synergistic Mechanisms of Single-Wall Carbon Nanotube in Long-PCR

LIU Qingdai¹, WANG Zhiwei¹, LI Guangbi², WANG Yurong¹, AN Hongjie^{1,3}

(1. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2. College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
3. School of Environmental Science, University of Adelaide, Australia SA 5005)

Abstract: The effect of single-wall carbon nanotube (SWCNT) on long-PCR was studied with a two-step PCR and *rpsL* fidelity assay. The experiments results showed that the best concentration of SWCNT was 0.8 mg/mL in long-PCR system. SWCNT did contribute to the high activity of DNA polymerase, so an amplified DNA product was observed even within a very short reaction time. The error frequency of PCR products was 5.32×10^{-6} in the control group, while the error frequency declined to 2.39×10^{-6} by using SWCNT.

Key words: PCR; single-wall carbon nanotube; fidelity

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是由美国科学家 Mullis 于 1985 年发明的一种体外扩增 DNA 分子的技术, 广泛应用于基因扩增、拷贝数分析、基因分型及医学诊断等诸多领域^[1-3]. 在后基因组时代, 长片段 DNA 分子的扩增是制约 PCR 应用的一个难题. 当扩增目的 DNA 分子长度在 12 ~ 40 kbp 时 (如基因组 DNA), 不仅需要 PCR 体系中加入具有校读功能的 DNA 聚合酶 (*Pfu*), 而且需要

改变反应的条件^[4-5]. 但是, 由于产物 DNA 分子错配的产生, 长片段 DNA 的扩增会出现产物量少与非特异扩增等问题.

为了解决特殊 DNA 序列难扩增这一问题, 新的 DNA 操作技术不断被开发. 2005 年, 中科院应用物理所与上海交通大学合作首次报道了纳米金粒子对 PCR 反应的优化作用^[6]. 伴随纳米技术在生命科学领域的学科交叉研究不断深入, 越来越多的具有独特性

收稿日期: 2011-11-15; 修回日期: 2012-01-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30900339, 30800255, 31101357); 中国博士后科学基金 (20110490786, 2011M500528)

作者简介: 刘清岱 (1975—), 男, 河北保定人, 副研究员; 通信作者: 安红杰, 副教授, goldenapplejuice@eyou.com.

质的纳米材料对 PCR 的优化作用逐渐被人们发现并重视,包括纳米银粒子、纳米石墨、纳米氧化锌和纳米二氧化钛以及纳米碳管等一系列纳米材料^[7-10]。

碳纳米管是由碳原子组成的同轴纳米管,直径一般为 1~20 nm,长度在微米级,可把其看成一维纳米材料。碳纳米管有优良的理化性质和生物相容性,在生物技术领域的应用备受瞩目。虽然已有报道碳纳米管对 PCR 有优化作用,但目前对于该技术研究的理论深度还不够,缺乏对其机理的进一步认识。本文系统研究了单壁碳纳米管对于长片段 PCR 的优化作用,并对其促进长片段 PCR 的机理进行初步的分析。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

λ DNA、 λ DNA/HindIII Marker、D2000 Marker、琼脂糖、溴化乙锭、*Mlu* I、T4 DNA 连接酶,加拿大 BBI 公司; *Pfu*、*Taq*、10× PCR buffer、dNTP、引物、氨苄青霉素、链霉素、链亲和素试剂盒,上海生工生物技术有限公司;单壁碳纳米管,中科院成都有机化学有限公司;自制超纯水。

BIO-RAD MyCycler 170-9703 型基因扩增仪、BIO-RAD 170-8026 型凝胶成像仪,美国 Biometra 公司; JSPM-5200 型原子力显微镜 (AFM),日本 JEOL 公司; DYY-5 型稳压稳流电泳仪,上海沪西分析仪器厂; Molecular/1015c 型超纯水机,上海摩勒生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 单壁碳纳米管悬浮液的制备与观察

将单壁碳纳米管粉末置于紫外灯下照射 30 min,使可能污染的核酸酶失活,然后称取 0.01 g 单壁碳纳米管粉末于灭菌离心管中,再加入 1 000 μ L 灭菌纯水,漩涡混合仪混合,超声悬浮 30 min。经过处理的碳纳米管悬浮液可以在室温条件下保存至少 6 h。

取 8 μ L 单壁碳纳米管悬浮液滴在云母片新解离面,吸耳球吹开,自然干燥。AFM 观察条件为室温,相对湿度为 25%~35%,图像采集模式为轻敲模式。

1.2.2 长片段 PCR(long-PCR)反应热循环体系

第一步:94 $^{\circ}$ C 变性 2 min;第二步:包括 30 个循环,每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,按照引物不同 T_m 和扩增产物长度的不同,实行 63 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 15 min;第三步:72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。25 μ L PCR 反应体系中各个组分浓度:dNTP 350 μ mol/L,引物

300 nmol/L, Mg^{2+} 1.75 mmol/L, λ DNA 2 ng/ μ L, *Taq* 2.5 u, *Pfu* 1.25 u。引物 1(5'-CGGTGAAAGTCACC AATGTG-3')和引物 2(5'-GCCACGTCATAGACGG TTTT-3')设计扩增 12.839 kbp 的片段。引物 3(5'-TGTTTATTGGAGTAGATGCTTG-3')和引物 4(5'-GAGAGTTGTTCCGTTGTGGG-3')设计扩增 14.395 kbp 的片段。所有 PCR 扩增实验都进行 3 次或 4 次,在几次都得到类似结果的前提下提供其中 1 次的电泳结果图。

1.2.3 两步 PCR(Twostep-PCR)

第一步:94 $^{\circ}$ C 变性 2 min;第二步:包括 30 个循环,每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,退火和延伸两步合成一步,温度为 68 $^{\circ}$ C,时间分别为 10、20、30 s 等。引物 5(5'-GGGCGGCGACCTCGCGGGTTTTTCGCT ATTTATGAAA-3')和引物 6(5'-GCCATAATAATC TGCCGGTCAAT-3')设计扩增 λ DNA 的 1.945 kbp 的片段。

1.2.4 PCR 产物错误率的检测^[11]

扩增线性化的质粒 pMOL21,引物为 5'端带有生物素标记,引物 7(5'-biotin-AAAAAAAAAAACGCG TCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTAC-3')和引物 8(5'-AAAAAAAAAAACGCGTCAACCAAGTCATT CTGAGAATAGT-3')。按以下条件在 PCR 仪上设定循环条件进行 PCR 热循环:预变性 94 $^{\circ}$ C 2 min,30 个循环(94 $^{\circ}$ C 变性 15 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,68 $^{\circ}$ C 延伸 5 min),最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 *Mlu* I,37 $^{\circ}$ C 酶切 12 h,并使用链亲和素进行纯化。

经纯化的 PCR 产物用 T4 DNA 连接酶在 16 $^{\circ}$ C 连接 12 h,然后转化 MF101 大肠杆菌感受态细胞。转化后的 MF101 细胞涂板于含氨苄青霉素的 LB 培养基平板(100 μ g/mL)上来确定转化细胞的总数;涂板于含氨苄青霉素和链霉素(100 μ g/mL)的 LB 培养基平板上以确定 *rpsL* 基因突变的总数。

在上述实验中,突变率和错误率的计算公式如下:突变率=突变菌数(含 Amp 和 Str 平板的菌数)/总菌数(含 Amp 平板的菌数);错误率=突变率/(导致 *rpsL* 基因表型突变的位点数 \times 模板加倍数)。

2 结果与讨论

2.1 单壁碳纳米管的纳米形态

采用原子力显微镜 (AFM) 的轻敲模式对悬浮液中的单壁碳纳米管进行表征(图 1),单壁碳纳米管在

云母片的表面呈现直线型, 长度在微米级, 部分具有弯曲, 通过高度测量显示它们是高度在 1~2 nm 之间. 该结果显示本实验制备悬浮液中的单壁碳纳米管具有长径比较大的典型特征, 并且保持了较好完整性.

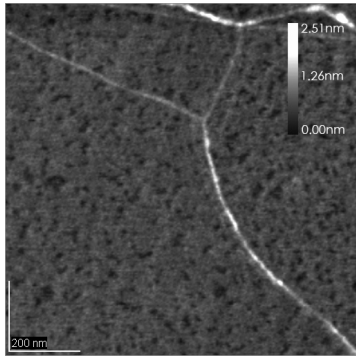
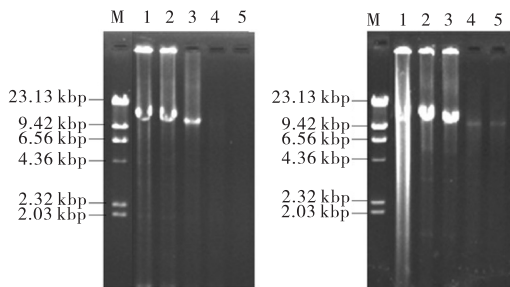


图 1 单壁碳纳米管在原子力显微镜下的形态图
Fig.1 Observation of SWCNT by AFM

2.2 单壁碳纳米管对长片段 PCR 的增效作用

在长片段高灵敏度的 PCR, 通常选择 *Taq* DNA 聚合酶同带有校正功能的 *Pfu* DNA 聚合酶混合物. 本实验室通过建立长片段 PCR 扩增模型, 扩增 λ DNA 中长度为 14.395 kbp 和 12.839 kbp 的两个片段, 分析单壁碳纳米管在长片段的最适作用浓度.

由图 2 可见, 对照组的扩增结果常常出现目的条带不明显, 泳道出现大量弥散的现象. 不同剂量的单壁碳纳米管均具有消除弥散的作用, 但是高剂量的单壁碳纳米管对于 PCR 抑制作用较强. 由两组实验可见单壁碳纳米管添加量为 2.0 μ L 时, 主带完整清晰, 副产物较少, 因此确定单壁碳纳米管的最适添加量为 2.0 μ L, 即最适浓度为 0.8 mg/mL.



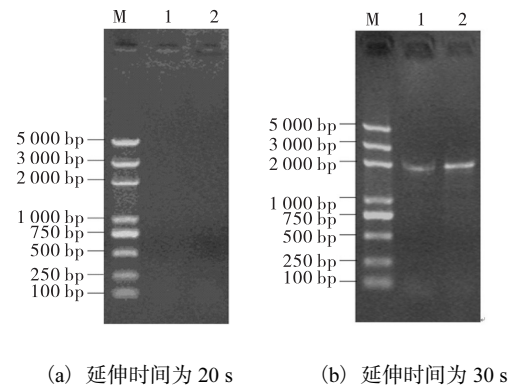
(a) 扩增 12.839 kbp 的片段 (b) 扩增 14.395 kbp 的片段
M. marker; 1—5 泳道单壁碳纳米管的加入量为 0、1.0、2.0、3.0、4.0 μ L

图 2 单壁碳纳米管对长片段 PCR 的作用
Fig.2 Effect of SWCNT in the long PCR

2.3 单壁碳纳米管对两步 PCR 的影响

PCR 反应中, 如果提高 DNA 聚合酶的延伸速度

可以节省延伸步骤的反应时间, *KOD* 聚合酶即可在相对少的延伸时间内扩增目标片段^[12]. 本实验建立了两步 PCR (two-step PCR) 的模型, 通过减少延伸步骤的时间, 考察单壁碳纳米管在最适剂量下能否提高聚合酶的反应速度, 在较短的时间内促进 DNA 合成. 当延伸时间为 20 s 时, 对照组和实验组均未出现目标条带 (图 3a), 说明该时间远低于有效扩增时间. 通过将延伸时间增加至 30 s, 对照组即可出现模糊的目标条带, 同时实验组也出现目标条带, 其产量与清晰度远远大于对照组 (图 3b). 虽然目前仍没有具体的证据说明单壁碳纳米管可以提高聚合酶的性质, 但本实验两步 PCR 从另一个角度反映了单壁碳纳米管能够提高 DNA 聚合酶的延伸反应效率.



(a) 延伸时间为 20 s (b) 延伸时间为 30 s
M. marker; 1、2 泳道单壁碳纳米管的加入量为 0、2.0 μ L

图 3 单壁碳纳米管对两步 PCR 的作用

Fig.3 Effect of SWCNT in the two-step PCR

2.4 单壁碳纳米管对 PCR 复制突变率的影响

在长片段 PCR 中, 由于较长时间的高温反应会对模板 DNA、聚合酶以及 dNTP 造成损伤, 因此复制保真度 (fidelity) 对于长片段 PCR 尤为重要. 本实验采用 *rpsL* 保真度分析技术, 对于单壁碳纳米管影响 PCR 的保真度进行分析, 结果见表 1.

表 1 单壁碳纳米管对 *rpsL* 基因复制保真度的影响

Tab.1 SWCNT affected replication fidelity of *rpsL* gene

纳米材料	实验序号	总克隆数	突变克隆数	突变频率/%	错误率
对照	1	23 088	159	0.69	5.30×10^{-6}
	2	17 986	133	0.74	5.69×10^{-6}
	3	21 836	143	0.65	5.04×10^{-6}
	总计	62 910	435	0.69	5.32×10^{-6}
SWCNT	1	25 538	83	0.33	2.50×10^{-6}
	2	48 846	142	0.29	2.24×10^{-6}
	3	12 954	46	0.36	2.73×10^{-6}
	总计	87 338	271	0.31	2.39×10^{-6}

经计算可以得到对照组的基因突变频率为 0.69%，错误率为 5.32×10^{-6} 。当单壁碳纳米管在 PCR 体系中浓度为 0.8 mg/mL 时，基因突变频率为 0.31%，错误率为 2.39×10^{-6} ，说明单壁碳纳米管在 PCR 反应中可以降低基因突变频率，提高了保真度，这可能是单壁碳纳米管能够在长片段 PCR 发挥作用的主要原因。

3 结 语

本文采用两步 PCR 和 *rpsL* 保真度实验等方法分析了碳纳米管对 PCR 的优化机理。通过实验确定单壁碳纳米管在长片段 PCR 反应中的最适工作浓度为 0.8 mg/mL，单壁碳纳米管不但可以促进 DNA 聚合酶的反应效率，而且能够降低产物的错误率，提高基因扩增的保真度。

在后基因组时代的大量科研工作中需要扩增成千上万的基因片段，对于 PCR 技术的灵敏度、稳定性和扩增长度的要求大大提高。纳米粒子 PCR 作为新一代基因扩增技术，能够应用于长片段 PCR、多重 PCR 以及实时定量 PCR 等诸多方面。同时，我国科学家拥有该项技术的大量知识产权，在该领域具有明显的优势。纳米粒子 PCR 技术的开发充分体现了纳米技术和生命科学领域的学科交叉。因此，对于纳米粒子 PCR 技术的机理研究不仅有助于开发新型基因操作技术，而且对于纳米材料的分子生物学效应具有重要的理论意义。

参考文献:

- [1] Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase[J]. Science, 1988, 239(4839): 487-491.
- [2] Li H X, Rothberg L J. Label-free colorimetric detection of specific sequences in genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction[J]. Journal of the American Chemical Society, 2004, 126(35): 10958-10961.
- [3] Neylon C. Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: Library construction methods for directed evolution[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(4): 1448-1459.
- [4] Barnes W M. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, 91(6): 2216-2220.
- [5] Cheng S, Fockler C, Barnes W M, et al. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, 91(12): 5695-5699.
- [6] Li H, Huang J, Lv J, et al. Nanoparticle PCR: Nanogold-assisted PCR with enhanced specificity[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2005, 44(32): 5100-5103.
- [7] Li M, Lin Y C, Wu C C, et al. Enhancing the efficiency of a PCR using gold nanoparticles[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(21): e184.
- [8] Zhang Z Z, Shen C C, Wang M C, et al. Aqueous suspension of carbon nanotubes enhances the specificity of long PCR[J]. Biotechniques, 2008, 44(4): 537-544.
- [9] Nie L, Gao L Z, Yan X Y, et al. Functionalized tetrapod-like ZnO nanostructures for plasmid DNA purification, polymerase chain reaction and delivery [J]. Nanotechnology, 2007, 18(1): 015101.
- [10] 刘清岱,王金菊,王勇. 纳米粒子 PCR 研究进展[J]. 生物学通报, 2010, 45(2): 1-3.
- [11] 杨文娟,沈涔超,张治洲. 检测纳米材料毒性的若干实验方法[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(2): 119-124.
- [12] Takagi M, Nishioka M, Kakihara H. Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(11): 4504-4510.

责任编辑: 郎婧