

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00622

激光诱导荧光毛细管电泳法优化 随机寡核苷酸文库聚合酶链反应扩增的条件

季颖 王清清 付洁 高新 宋海峰*

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要 寡核苷酸文库的聚合酶链反应 (PCR) 扩增是指指数富集系统配基进化技术 (SELEX) 筛选适配子技术中的重要步骤。本研究采用毛细管电泳技术结合激光诱导荧光检测器 (CE-LIF), 通过对双链产物、PCR 副产物以及剩余引物的考察, 研究了寡核苷酸文库 PCR 扩增时的影响因素, 并对其进行优化。结果表明, 随机寡核苷酸文库的扩增与传统均一模板的扩增显著不同, 其在扩增十几个循环时产物就达到最大值; 此外, 初始模板数、退火温度、DNA 聚合酶浓度等条件也有所不同。因此, 在进行 SELEX 筛选之前必须对文库 PCR 条件进行详细优化。本研究中 N39 文库优化后的 PCR 扩增条件为: 初始模板的量为 10^5 个分子, DNA 聚合酶浓度 $0.05 \text{ U}/\mu\text{L}$, 退火温度 70°C , 18 个循环。本研究为利用 SELEX 技术有效筛选适配子, 降低筛选的假阳性及提高特异性提供了参考依据。

关键词 毛细管电泳; 指数富集系统配基进化技术; 聚合酶链式反应; 寡核苷酸文库; 适配子

1 引言

核酸适配子 (Aptamers) 是从大量的组合化学库中筛选出的短链寡核苷酸, 它具有靶分子范围广、稳定性好、亲和力高等特点, 从亲和分析到疾病诊断与治疗方面, 为自然科学和生命科学领域带来了革命性进展^[1,2]。目前用于治疗老年性黄斑退行性病变第一个适配子药物 Macugen 已于 2004 年获得了美国 FDA 批准^[3]。

筛选适配子的经典方法是指指数富集配基系统进化技术 (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX), 主要有 3 个关键步骤: 随机寡核苷酸文库的设计合成、结合适配子与未结合适配子的分离和结合适配子的 PCR 扩增。文库 PCR 过程中非特异性产物的出现是一个普遍的现象, 而聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 扩增条件的特异性决定了 SELEX 技术筛选与靶蛋白特异性结合的适配子假阳性的高低, 因此结合适配子的 PCR 扩增是 SELEX 技术筛选的关键。目前, 分析 PCR 扩增产物的主要方法是聚丙烯酰胺凝胶电泳^[4]和琼脂糖凝胶电泳^[5], 通过电泳条带的数目和深浅判断 PCR 条件的优劣, 对扩增片段大小的判断并不十分准确。利用毛细管电泳技术定性和定量分析核酸类物质是近几年的分析工作者研究热点, 毛细管电泳 (Capillary electrophoresis, CE) 分析具有准确、精确、灵敏和重现性好的特点, 现已广泛应用于 PCR 产物的定量分析^[6-9]。

本研究采用毛细管电泳技术优化随机寡核苷酸文库 PCR 条件, 如 PCR 循环次数、初始模板分子数、DNA 聚合酶浓度以及退火温度等, 并将其与均一模板的扩增条件的异同进行比较。实验发现, 寡核苷酸文库与均一模板的 PCR 扩增方式明显不同。在考察初始模板分子数对文库 PCR 扩增的影响时发现, 初始模板分子数对文库的 PCR 扩增影响显著, 提示文库的随机性不同扩增条件也有所差别, 所以在进行 SELEX 筛选之前一定要对文库的 PCR 扩增进行优化。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

P/ACE MDQ 毛细管电泳仪 (美国 Beckman 公司), 配有激光诱导荧光检测器 (LIF); Beckman MDQ

2009-08-21 收稿; 2009-12-08 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 30801375) 资助项目

* E-mail: bapklab@yahoo.com

毛细管电泳仪,配 488 nm 氩离子激光诱导荧光检测器,激发波长/发射波长为 488/520 nm;未涂层熔融石英毛细管(50 cm(有效分离长度)/60.2 cm(总长度)×75 μm 内径,河北永年光纤厂);MJ Opticon-chromo 4 荧光定量 PCR 仪(美国 BioRad 公司)。

TaqDNA 聚合酶、PCR 缓冲液、dNTP(TaKaRa 公司)。DNA 随机寡核苷酸文库及引物由上海生工合成,并经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)纯化。所有缓冲液均使用去离子水配制,并用 0.22 μm 滤膜过滤。

2.2 实验方法

2.2.1 PCR 扩增 设计合成随机 DNA 文库^[10] 5'-CTTCTGCCCCGCTCCTTCC-(N₃₉)-GGA GACGA GAT AGGCGGACACT-3', 80 nt 的均一模板:5'-CTTCTGCCCCGCTCCTTCCGGGA GGACGA TGCGGA TCA GCCA T GTTACGTCACCTCTGGA GACGA GATAGGCGGACACT-3' PCR。5 端引物:5'-FAM-CTTCTGCCCCGCC TCC TCC-3', 其中荧光素标记以便毛细管电泳检测;3 端引物:5'-AGTGTCCGCCTA TCTC GTCTCC-3'。PCR 混合液(1.25 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 250 μmol/L dNTP, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶,一定浓度的模板和引物)。PCR 最终条件模板的量为 6×10⁵ 个分子,引物的量为 6 pmol, DNA 聚合酶的浓度为 0.05 U/μL。PCR 扩增条件:94 预变性 5 min;94 变性 10 s;70 退火 10 s;72 延伸 10 s;最终 72 延伸 5 min;18 个循环。PCR 反应后,PCR 混合物用于 CE 分离检测。

2.2.2 毛细管电泳条件 分离温度:25 °C;进样方式:压力进样(2.07 kPa);进样时间:5 s。25 mmol/L 硼酸钠电泳缓冲液(pH 9.4)。新毛细管活化条件:1 mol/L NaOH 活化 30 min。每天实验之前,毛细管冲洗条件:1 mol/L HCl, H₂O, 1 mol/L NaOH, H₂O 依次冲洗 3 min。分离前,毛细管淋洗条件:0.5 mol/L NaOH, H₂O、电泳缓冲液顺序淋洗 3 min。

3 结果与讨论

3.1 PCR 扩增产物出峰位置的确定

本实验采用的毛细管电泳分离模式是自由区带电泳(Capillary zone electrophoresis, CZE),其分离的机理是基于被分离物质的净电荷与其质量比间的差异;而 CZE 与琼脂糖凝胶电泳的不同之处在于 CZE 不仅和被分离物质长度有关还与其所带电荷有关。切胶回收后的 CE 分离有助于快速确定了双链产物的出峰位置(图 1 中峰 2)。

非特异性扩增是 PCR 过程中经常遇到的问题,对于均一模板而言,随着初始模板浓度的下降,达到产物最大量时非特异扩增增加显著^[11]。本研究中 PCR 扩增总长为 80 nt 的随机寡核苷酸文库,5'-FAM 引物利于对扩增产物进行 CE-LIF 检测。在毛细管分离扩增产物时观察到一个展宽较严重的峰(图 1 中峰 3),但随机文库模板数的降低(10⁹~10³),此峰的丰度变化并不显著。Mushev 等^[10]发现对于随机的寡核苷酸文库进行 PCR 扩增时,当引物的量还远远大于产物时,产物的形成便开始停止;但随着循环次数的增加,产物开始向另一产物转化,Michael 称其为副产物。本研究将这个类似于文献中扩增情况的 PCR 产物称为“副产物”。

3.2 随机寡核苷酸文库 PCR 扩增特点

对常规 PCR 扩增而言,产物量一般随扩增循环次数增加而增加,但本研究却发现随机寡核苷酸文库扩增的 dsDNA 产量并不是逐渐增加的,而是随着循环次数的增加呈先增加后减少的趋势。PCR 扩增到达 18 个循环时(图 2B), dsDNA 产量接近最高,同时有少量副产物的出现;继续增加 PCR 循环次数,产物的量不增加而副产物的量明显增加。

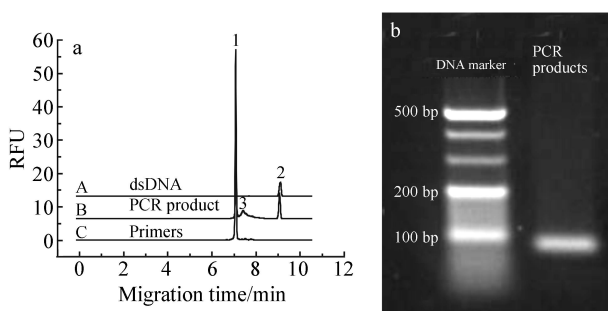


图 1 PCR 扩增产物的毛细管电泳分离图(A)和 1% 琼脂糖凝胶电泳分离图(B)

Fig 1 Representative chromatograms of PCR products by capillary electrophoresis and 1% agarose gel electrophoresis. A, B, C 分别为图 1B 切胶回收产物的分离图、PCR 产物、引物;峰 1, 2, 3 分别为引物、产物 dsDNA、副产物(A, B, C was chromatogram of agarose gel recovered products, PCR products and primer respectively. Peak 1, 2, 3 was identified as primer, dsDNA products and by-products, respectively).

同样 PCR 扩增条件下与文库长短相同的 80 nt ssDNA 均一模板的扩增情况完全不同 (图 2A)。随着扩增循环次数增加 dssDNA 的量也逐步增加的,在实验考察的循环次数范围内,30 多个循环时产量最高,而此时未见副产物出现。

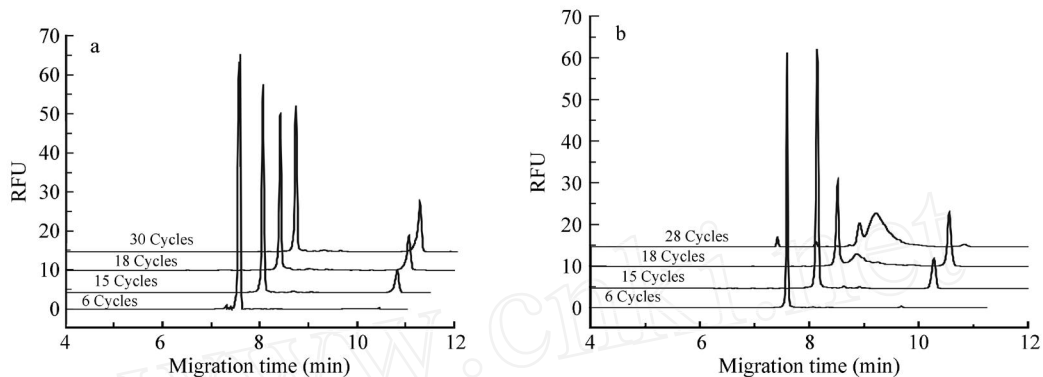


图 2 80 nt ssDNA PCR 扩增产物 (A) 和随机寡核苷酸文库 PCR 扩增产物 (B) 的毛细管电泳分离图

Fig 2 CE chromatograms of PCR products for the homogeneous 80 nt ssDNA (A) and for the ssDNA library (B) RSD < 20% ($n = 3$). 起始模板分子数为 10^5 , DNA 聚合酶浓度为 0.05 units/ μL , 退火温度为 70。毛细管电泳条件如 2.2.2 所述 (The initial number of template molecules was 10^5 , the concentration of Taq DNA polymerase was 0.05 units per microliters, the annealing temperature was 70, and conditions of CE were described in Section 2.2.2).

3.3 随机寡核苷酸文库 PCR 扩增副产物的形成机制

关于随机寡核苷酸文库副产物的形成机制已有报道。杨清武等^[12]用 PCR 过量富集寡核苷酸文库时发现,产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳条有弥散的现象,并出现在产物条带之后,这就提示副产物要比产物的链长。Drabovich 等^[13]利用单链结合蛋白分析随机文库 PCR 扩增产物的组成,其电泳结果表明单链结合蛋白存在的时候,引物与副产物的色谱峰都向前移,说明副产物中存在单链 DNA。

随机文库 PCR 扩增形成副产物的机制与均一模板 PCR 扩增形成非特异性产物的机制不同^[10]。均一模板 PCR 扩增形成的非特异产物主要是引物二聚体,并随着循环次数缓慢积累,形成相同数量的产物所需要的循环次数随着初始模板浓度的增加而减少,因此形成非特异产物的量随着初始模板量的增加而减少。随机文库 PCR 扩增的副产物是 ss-dssDNA,其是产物与产物之间的杂交。当 dssDNA 产物达到一定量时便开始形成 (图 2B)。同时,初始模板的浓度对随机寡核苷酸文库的 PCR 副产物的产量影响较大。初始模板分子数从 1×10^5 增加到 1×10^9 时,副产物的变化非常明显 (图 3)。但文献 [10] 报

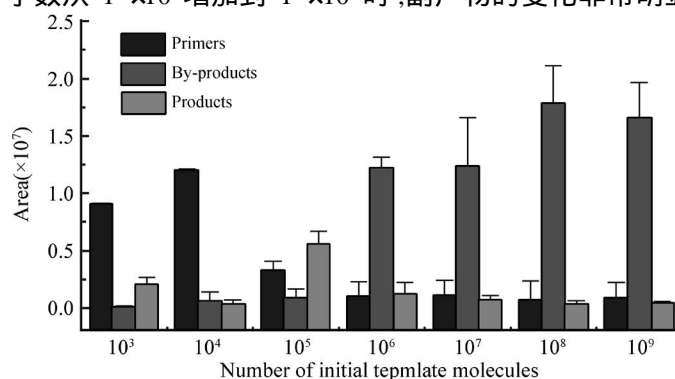


图 3 初始模板的分子数对 ssDNA 文库 PCR 扩增产物的影响

Fig 3 Influence of the number of initial template molecules on the maximum yield of products and corresponding yield of by-products for PCR amplification of ssDNA library

RSD < 20% ($n = 3$). 初始模板的量为 $6 \times 10^3 \sim 6 \times 10^9$, 引物用量 6 pmol, DNA 聚合酶浓度为 0.05 units/ μL , 退火温度为 58, PCR 循环次数为 18。毛细管电泳条件如 2.2.2 所述 (The number of initial template molecules was $6 \times 10^3 \sim 6 \times 10^9$, the amount of primers was 6 pmol, the concentration of Taq DNA polymerase was 0.05 units per microliters, the annealing temperature was 58, and the conditions of CE were described in Section 2.2.2).

道,当增加初始模板的量时,副产物的增加并不明显。推测本研究结果与文献 [10] 不一致,可能与文库的随机性有关,但仍需进一步深入研究。考虑到产物与副产物的相对量多少,本实验确定模板分子数为 10^5 时产物产量最高。

3.4 退火温度对文库 PCR 条件的影响

对于均一模板和文库扩增而言,退火温度是 PCR 反应条件中的重要影响因素。本研究在 55 ~ 72 范围内考察了 10 个温度区间,PCR 循环次数为 18,引物的量为 6 pmol。结果显示,当退火温度为 70 时,PCR 扩增产物的量最大(图 4)。在高退火温度下,扩增的 DNA 可以形成稳定的有利于 SELEX 筛选的二级结构。

3.5 DNA 聚合酶对文库 PCR 条件的影响

考察了 DNA 聚合酶的浓度 (0.05, 0.075 和 0.1 U/ μ L) 对 PCR 产物及副产物的影响。实验发现,随着聚合酶的浓度升高,PCR 产物的量下降;而副产物的量升高,提示 DNA 聚合酶在较低的浓度下就已经满足扩增要求(图 5)。最终确定的 DNA 聚合酶浓度为 0.05 U/ μ L。

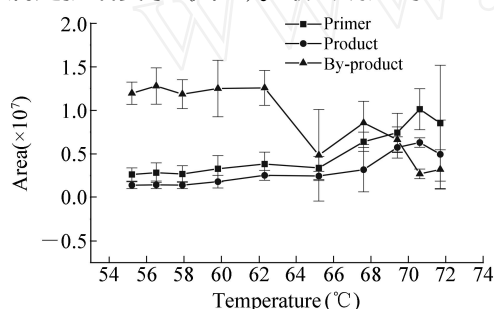


图 4 退火温度对 PCR 扩增 ssDNA 文库的影响

Fig 4 Influence of the annealing temperature on PCR amplification of ssDNA library

RSD < 20% ($n = 3$)。初始模板的量为 6×10^9 , 引物用量 6 pmol, DNA 聚合酶浓度为 0.05 units/ μ L, PCR 循环次数为 18 (The number of initial template molecules was 6×10^9 , the amount of primers was 6 pmol, the concentration of Taq DNA polymerase was 0.05 units per microliters)。毛细管电泳条件如 2.2.2 所述 (The conditions of CE were described in Section 2.2.2)。

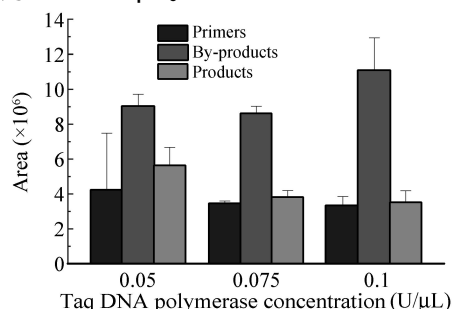


图 5 Taq DNA 聚合酶的浓度对 PCR 扩增 ssDNA 文库的影响

Fig 5 Influence of the Taq DNA polymerase concentration on PCR amplification of ssDNA library

RSD < 20% ($n = 3$)。初始模板的量为 6×10^9 , 引物用量 6 pmol, 退火温度为 58, PCR 循环次数为 18 (The number of initial template molecules was 6×10^9 , the amount of primers was 6 pmol, the annealing temperature was 58, and the conditions of CE were described in Section 2.2.2)。

4 结 论

SELEX 技术筛选适配子的过程 PCR 扩增始终

贯穿其中,PCR 扩增效率的高低决定了后续 SELEX 筛选的假阳性的高低。本实验利用 CE 技术优化了 ssDNA 文库 PCR 扩增条件中的各项参数,SELEX 技术筛选适配子的过程 PCR 扩增始终贯穿其中,PCR 扩增效率的高低决定了后续 SELEX 筛选的假阳性的高低。本实验利用 CE 技术优化了 ssDNA 文库 PCR 扩增条件中的初始模板量、扩增循环数、退火温度以及 DNA 聚合酶浓度等参数,并将其与均一模板扩增的异同进行了详细对比与探讨。

随机寡核苷酸文库的 PCR 扩增特点不同于均一的模板 PCR 扩增,主要表现在两方面:一是循环数对其影响,另一个是副产物的形成。本研究在利用 CE 对核酸类物质的高效分离能力发现了随机寡核苷酸扩增产物不随循环数的增加而增加,在扩增到十几个循环时已经达到最大量,再增加循环数反而有利于副产物的增加。这种文库模板与传统均一模板不同的扩增方式提示我们在进行 SELEX 筛选之前一定要对 PCR 条件进行详细优化。

References

- Mairal T, Ozalp VC, Lozano Sánchez P, Katakis I, O Sullivan C K *Anal Bioanal Chem.*, 2008, 390(4): 989 ~ 1007

- 2 Fowler C C, Li Y. *Chem. Biol*, **2007**, 14(7): 736 ~ 738
- 3 Nimjee SM, Rusconi C P, Harrington R A. *Trends Cardiovasc Med*, **2005**, 15(1): 41 ~ 45
- 4 Sundfors C, Collan Y. *Electrophoresis*, **1996**, 17(1): 44 ~ 48
- 5 Man Y G, Kuhls E A, Brathauer G L, Moinfar F, Tavassoli F A. *Electrophoresis*, **2001**, 22(10): 1915 ~ 1919
- 6 Thaitrong N, Toriello NM, Del Bueno N, Mathies R A. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(4): 1371 ~ 1377
- 7 WANG Wei(王巍), JIA Ling-Yun(贾凌云). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(3): 454 ~ 460
- 8 Sen B, Hamelin J, Bru-Adan V, Godon J J, Chandra T S. *Appl. Microbiol.*, **2008**, 105(6): 2123 ~ 2132
- 9 Wang J, Wang W, Liu Y, Duo L, Huang L, Jiang X. *Mol. Biol. Rep.*, **2009**, 36(7): 1903 ~ 1908
- 10 Musheev M U, Krylov S N. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 564(1): 91 ~ 96
- 11 Vandesompele J, De Paep A, Speleman F. *Anal. Biochem.*, **2002**, 303(1): 95 ~ 98
- 12 YANG Qing-Wu(杨清武), WEN Ai-Qing(文爱清), LÜ Feng-Lin(吕凤林). *Chongqing Medicine* (重庆医学), **2008**, 37(16): 1773 ~ 1775
- 13 Drabovich A, Krylov S N. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1051(1-2): 171 ~ 175

Optimization of Polymerase Chains Reaction Amplification for ssDeoxyribonucleic Acid Library Using Capillary Electrophoresis with Laser-induced Fluorescence Detection

JI Ying, WANG Qing-Qing, FU Jie, GAO Xin, SONG Hai-Feng*

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

Abstract For random DNA libraries, the amplification of polymerase chains reaction (PCR) is very important to select aptamers by systematic evolution of ligand exponential enrichment (SELEX). The influencing factors of PCR amplification were investigated and optimized according to the changes of dsDNA product, ss-dsDNA by-products and primers using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection (CE-LIF). The results suggested that there were prominent differences between PCR amplification of homogeneous DNA templates and that of random DNA libraries. For random DNA library, the yield of products reached its maximum at the eighteenth cycle. Other influence factors including the number of initial templates, anneal temperature of PCR, concentration of DNA polymerase were also investigated. To ensure efficiency of SELEX, it is necessary to optimize the PCR amplification conditions of random DNA libraries. In this study, for the N39 DNA libraries, the optimized conditions were as follows: number of initial templates was 10^5 molecules, concentration of DNA polymerase was 0.05 U/ μ L, and annealing temperature of PCR was 70 °C, the optimization PCR cycles was 18. This study provided important references for the selection of high efficient aptamers by SELEX method.

Keywords Capillary electrophoresis; Systematic evolution of ligand exponential enrichment; Polymerase chains reaction; Deoxyribonucleic acid libraries; Aptamer

(Received 21 August 2009; accepted 8 December 2009)