

几种不同热启动 PCR 系统的特异性、延伸性和灵敏度比较

前言

热启动是一种能够提高 PCR 特异性的成熟和简便的方法。然而，目前通用的技术如抗体介导的抑制 DNA 聚合酶法或化学阻断 DNA 聚合酶法都存在一些缺陷：如需要较长的初始激活步骤，从而导致 DNA 聚合酶的工作能力下降或者特异性控制的效果不理想。

Eppendorf 公司的 HotMaster[®] Taq DNA 聚合酶则应用了一种全新的技术来实现热启动 PCR。

在高温下，可释放出热稳定的 Taq DNA 聚合酶抑制剂，因此立即恢复聚合酶的活性。

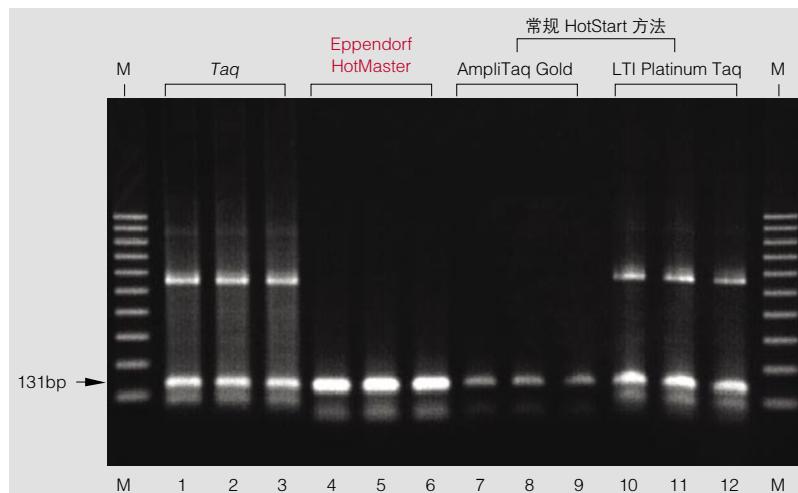
因为这个过程是可逆的，所以 HotMaster 不但能在反应的设置阶段提供热启动控制，而且能使每个 PCR 循环达到冷终止的效果。

新的预先优化的反应缓冲液能自动调节镁离子浓度，因此确保无需优化镁离子浓度就能获得理想的反应条件。

材料

- Eppendorf HotMaster[®] Taq DNA 聚合酶
- 常规热启动 PCR 系统: AmpliTaq Gold[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 以及 LTI Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- 普通 Taq DNA 聚合酶

PCR 反应在 Eppendorf 公司出品的 Mastercycler[®] gradient 梯度 PCR 仪上进行实验，采用商业来源的人类基因组 DNA



● 图 1: 应用 HotMaster 和竞争品牌热启动技术扩增人 TNF 基因 131 bp 片段的扩增结果：

- 泳道 1 – 3: 普通 Taq 聚合酶
 泳道 4 – 6: Eppendorf HotMaster[®] Taq
 泳道 7 – 9: 化学阻断的 Taq 聚合酶 (AmpliTaq Gold)
 泳道 10 – 12: 抗体阻断的 Taq 聚合酶 (LTI Platinum Taq)
 分子量标准: 100 bp ladder (NEB, New England Biolabs, Beverly, MA, USA)

实验 1: 特异性

HotMaster Taq 和普通 Taq 的循环条件：

无初始变性	
35个循环:	94°C 1秒
	55°C 1秒
	72°C 5秒
保持 10°C	

抗体阻断 Taq 聚合酶法

(LTI Platinum Taq) 的循环条件：

95°C	初始变性 2 分钟
35个循环:	94°C 1秒
	55°C 1秒
	72°C 5秒
保持 4°C	

化学阻断 Taq 聚合酶法

(AmpliTaq Gold[®]) 的循环条件：

95°C	初始变性 10 分钟
35个循环:	94°C 1秒
	55°C 1秒
	72°C 5秒
保持 4°C	

131bp TNF 系统引物：

正向: GGTTTCGAAGTGGTGGCTTG
 反向: CCTGCCCAATCCCTTTATT

反应成分：

1 × PCR 缓冲液 (根据不同供应商采用相应缓冲液)

2.5 mM 镁离子 (HotMaster 的最佳镁离子浓度自我调节)

各引物: 0.2 μM

dNTPs: 0.2 mM

Taq 聚合酶各 1.25 单位

人基因组 DNA: 50 ng

加入分子生物学级水至反应总体积为 50 μl

实验 2：延伸性

扩增 2.0 kb β 球蛋白片段，HotMaster Taq 和普通 Taq 聚合酶的循环条件：

94°C 初始变性 2 分钟
35个循环：94°C 1分钟
53.5°C 20秒
72°C 2分钟
(HotMaster 采用65°C)
72°C 5分钟
(HotMaster 采用65°C)
保持10°C

扩增 2.0 kb β 球蛋白片段的引物：

正向：GAAGAGCCAAGGACAGGTAC
反向：CCTCCAAATCAAGCCTCTAC

扩增 5.0 kb λ DNA 片段，HotMaster Taq 和普通 Taq 聚合酶的循环条件：

94°C 初始变性 2 分钟
35个循环：94°C 45秒
61°C 30秒
72°C 5分钟
(HotMaster 采用65°C)
72°C 5分钟
(HotMaster 采用65°C)
保持10°C

扩增 5.0 kb λ DNA 片段的引物：

正向：GGCAAGCATAAGCACACAGA
反向：CAGCATAAGCGGCTACATGA

反应成分：

1 × PCR 缓冲液（普通或 HotMaster Taq 缓冲液）
2.5 mM 镁离子（HotMaster 的最佳镁离子浓度自我调节）
各引物：0.2 μ M
dNTPs：0.2 mM
HotMaster / 普通 Taq 聚合酶各 1.25 单位
人基因组 DNA：50 ng 或 λ DNA 10 ng
加入分子生物学级水至反应总体积为 50 μ l

实验 3：灵敏度和特异性

HotMaster Taq 循环条件：

94°C 初始变性 2 分钟
35个循环：94°C 20秒
62°C 20秒
65°C 30秒
保持10°C

201 bp SRY 引物：

正向：CTCCGGAGAACGCTTCCCT
反向：CAGCTGTTGCTGATCTCTG

反应成分：

1 × PCR HotMaster Taq 缓冲液
2.5 mM 镁离子（自我调节）
各引物：0.2 μ M
dNTPs：0.2 mM
HotMaster Taq 聚合酶 1.25 单位
0 – 10⁴ 目标 DNA 分子
加入分子生物学级水至反应总体积为 50 μ l

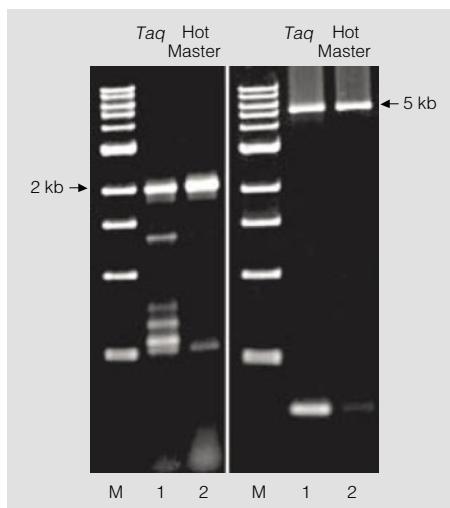


图2：分别用 HotMaster 和普通 Taq DNA 聚合酶扩增 2.0 和 5.0 kb 目的片段的扩增结果
泳道1、3：普通 Taq
泳道2、4：Eppendorf HotMaster Taq
分子量标准：1 kb ladder (NEB)

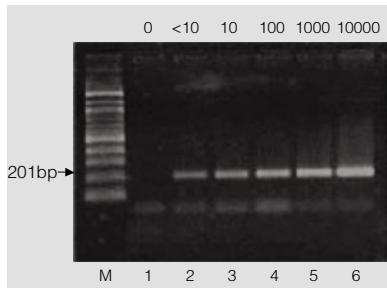


图3：采用 HotMaster Taq 在高浓度女性 DNA 背景下扩增 201 bp 男性特异性目的基因片段的扩增结果
泳道1：0 拷贝目的 DNA
泳道2：<10 拷贝目的 DNA
泳道3：10 拷贝目的 DNA
泳道4：100 拷贝目的 DNA
泳道5：1000 拷贝目的 DNA
泳道6：10,000 拷贝目的 DNA
分子量标准：100 bp ladder (NEB)

结果

实验 1：特异性（如图1）

为了比较 HotMaster Taq 聚合酶与普通 Taq 以及其他热启动系统在特异性控制方面的表现，我们分别采用各个系统扩增人 TNF 基因中一段 131 bp 的片段，每个组均做了 3 个平行对照。

实验的结果清楚地显示：Eppendorf HotMaster Taq 能高度特异地扩增出目的片段，而且产量很高，而采用传统的系统则会出现低特异性和/或较低的产物产量。

实验 2：延伸性（如图2）

为了探究 HotMaster Taq 能够扩增的片段大小范围，我们分别用 HotMaster Taq 系统和普通 Taq DNA 聚合酶扩增 2.0 kb 的人 β 球蛋白基因片段和 5.0 kb 的 λ DNA 片段。

结果表明：HotMaster Taq 能够扩增长达 5.0 kb 的片段，而且兼具高特异性和高得率。

这是因为与普通 Taq 聚合酶相比，HotMaster 系统采用的热启动技术不会影响聚合酶的延伸性。

实验 3：灵敏度和特异性（如图3）

为了检验在高度复杂的背景条件下，能被 HotMaster 扩增出的模板量的下限，我们用 HotMaster Taq 扩增了男性特异性的人单拷贝基因 SRY。已知 6 pg 的人类基因组 DNA 等于 1 拷贝基因组，据此对男性 DNA 进行倍比稀释并均加入 100 ng 的女性 DNA 作为固定背景，因此在各 PCR 反应成分中分别含有 0, <10, 10, 100, 1000 或 10000 拷贝的目标基因。

数据显示：HotMaster Taq DNA 聚合酶能够在高度复杂的背景下（反应体系中含有大量非特异性 DNA）扩增极低含量（<10 拷贝）的目的 DNA 分子。

讨论

Hot Start DNA 聚合酶的作用是减少或避免 PCR 反应中由于错误引发而造成的非特异性产物。

与普通 Taq 聚合酶不同，使用 HotMaster Taq 可以在室温下设置 PCR 反应，而且不像其他系统那样需要在循环开始前增加“热激活”步骤。

这种初始激活步骤有时需要在 95°C 孵育多达 15 分钟，这个过程通常会影响酶的活性，导致 PCR 产物的产量降低。

图1的结果表明 HotMaster Taq 能有效地防止非特异性产物形成，同时保持较高的酶活性。而且扩增产物的长度范围不再局限于小片段，应用 HotMaster Taq 聚合酶可以高度特异地扩增长达几个 kb 的片段（如图2所示）。

最后，对极低拷贝数的目标 DNA 的扩增实验显示 HotMaster 系统能有机结合高特异性和高效率两大优点。即使有极高的非特异性背景 DNA，应用 HotMaster 仍然能够检测到小于 10 个目标 DNA 分子（如图3所示）。

另外，HotMaster Taq 的冷终止功能为整个反应过程提供了第二重的温度控制。这种功能可以防止在较低温度下的引物延伸，这样就可以进行低严谨度退火或者采用次理想的引物。

其他测试（本文未包含相关结果）显示全新的热启动 / 冷终止技术可以与实时定量 PCR 系统合用。

因此 HotMaster Taq DNA 聚合酶既能保持热启动 PCR 的优势，同时又避免了其他热启动 PCR 系统的缺陷。

正如这篇论文的结果所显示的那样，HotMaster Taq DNA 聚合酶能够采用较短的 PCR 运行时间，能够充分有效地控制特异性，产物得率较高，而且能够扩增的产物的长度范围较大。

作者 George Halley, Eppendorf-5 Prime, Inc., Boulder, CO, USA;
Andres Jarrin, Eppendorf AG, Hamburg;
Melanie Persson, Eppendorf Instrumente GmbH, Hamburg