

Eppendorf HotMaster® Taq DNA 聚合酶 在实时定量 PCR 分析中的应用

前言

近年来，出现了检测和定量分析微量核酸的实时定量 PCR 技术，该技术不断得到改进并已经进入研究领域。这种强有力的技术可以用于很多方面：如基因表达分析，基因型分析、病原体检测、SNP 筛选、GMO 测试等，其重要性越来越高。

Eppendorf 公司的 HotMaster Taq DNA 聚合酶采用了创新的合成亲和性配体技术，该配体可以以一种温度依赖性的方式来可逆性地阻断酶的活性。这种全新的热启动技术可以为传统的检测程序带来理想的结果。

以下的实验将检测 HotMaster Taq DNA 聚合酶用于实时定量 PCR 分析时的表现，结果表明：Eppendorf 的 HotMaster Taq 聚合酶也可以非常有效地用于实时定量 PCR 分析，因此可以将这种最先进的 PCR 试剂与最先进的检测手段结合使用。

材料和方法

SYBR® Green I 分析

采用人基因组 DNA (Promega, Madison, WI, USA), VIII 因子基因特异性引物 (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) 和 SYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 进行 SYBR Green I 分析引物。反应成分如表 1 所示。

Factor VIII 正向引物:

5'-GACAGTGGAAATGTTACC-3'

Factor VIII 反向引物:

5'-CATCCCAGCATGTAGATG-3'

Reaction components	Reaction volume	Final concentration
dNTP (10 mM)	2 µl	400 µM
Factor VIII Forward Primer	1 µl	200 nM
Factor VIII Reverse Primer	1 µl	200 nM
SYBR Green I (1:5K)	5 µl	1:50K
10 × HotMaster Taq Buffer with 2.5 mM Mg ²⁺	5 µl	1 ×
Mg ²⁺ (25 mM)	2 µl	1 mM
HotMaster Taq Polymerase (5 U/µl)	0.2 µl	1 Unit
MBGW	31.8 µl	N/A
Template (gDNA)	2 µl	Various

表1: SYBR® Green I 分析的 PCR 反应组分

Cycle	Repeats	Step	Dwell time	Hold	Temp	Melt curve	+Temp °C
1	1	1	1 min		95° C		
2	40	1	20 s		95° C		
		2	20 s		53° C		
		3	20 s		68° C		
3	1	1	1 min		95° C		
4	1	1	2 min		55° C		
4	80	1	10 s		55° C	X	0.5
6	1	1		X	4° C		

表2: SYBR Green I 分析循环条件

Reaction components	Reaction volume	Final concentration
dNTP (10 mM)	2 µl	400 µM
GAPDH Forward Primer	1 µl	200 nM
GAPDH Reverse Primer	1 µl	200 nM
GAPDH Probe (5 µM)	1 µl	100 nM
SRY Forward Primer	1 µl	200 nM
SRY Reverse Primer	1 µl	200 nM
SRY Probe (2.5 µM)	1 µl	50 nM
10x HotMaster Taq Puffer with 2.5 mM Mg ²⁺	5 µl	1X
Mg ²⁺ (25 mM)	5 µl	2.5 mM
HotMaster Taq Polymerase (5 U/µl)	0.4 µl	2 Unit
MBGW	29.6 µl	N/A
Template (Plasmid)	2 µl	Various

表3: TaqMan 分析的 PCR 反应组分

Cycle	Repeats	Step	Dwell time	Hold	Temp °C
1	1	1	1 min		95° C
2	50	1	20 s		95° C
		2	45 s		53° C
3	1	1		X	4° C

表4: TaqMan 分析循环条件

将人基因组模板储存液稀释为 100 ng/µl。然后用分子生物学级别的水 10 倍稀释。反应体积中 4% 为不同量的模板 (200 ng, 20 ng, 2 ng, 200 pg 以及 20 pg)，循环条件见表2。

TaqMan® 分析

采用 SRY 和 GAPDH 基因特异性引物和探针 (IDT) 和质粒 DNA 模板 (SRY 和 GAPDH) 进行 TaqMan 分析。反应成分如表 3 所示。

TaqMan 分析引物

GAPDH 正向引物: 5'-CATCTTCCAGGAGCGAGA-3'

GAPDH 探针: 5'-HEX-CCTCACCACCATGGAGAAGGCT-BHQ-3'

GAPDH 反向引物: 5'-TGTTGTCATACTTCTCAT-3'

SRY 正向引物: 5'-CGGAGAAGCTCTTcCTT-3'

SRY 探针: 5'-FAM-ACAGTAAAGGCAACGTCCAGGATAGA-BHQ1-3'

SRY 反向引物: 5'-AGCTGCTTGCTGATCTC-3'

用分子生物学级别的水 10 倍稀释质粒 DNA 储存液 (10^{10} 拷贝 / μ l), 每个反应体积中 4% 为不同浓度的质粒模板 ($10^8 - 10^2$) 拷贝。循环条件见表 4。

结果

SYBR Green I 分析结果

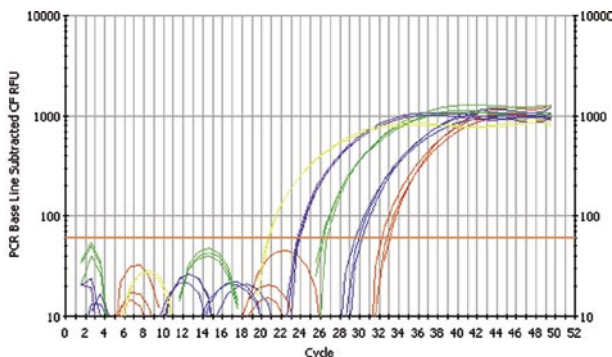


图1: SYBR Green I / 从人类基因组中扩增VIII因子 (200 ng - 20 pg)。

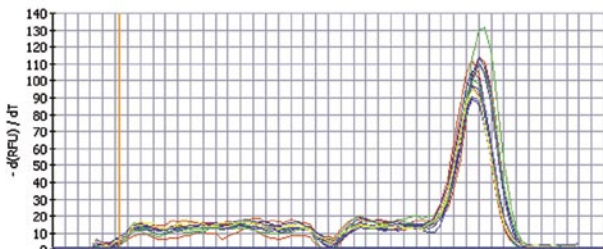


图2: SYBR Green I / VIII 因子熔解曲线, 注意: 无非特异性产物。

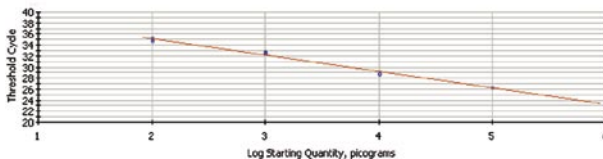


图3: SYBR Green I / VIII 因子探针标准曲线。

TaqMan 分析结果

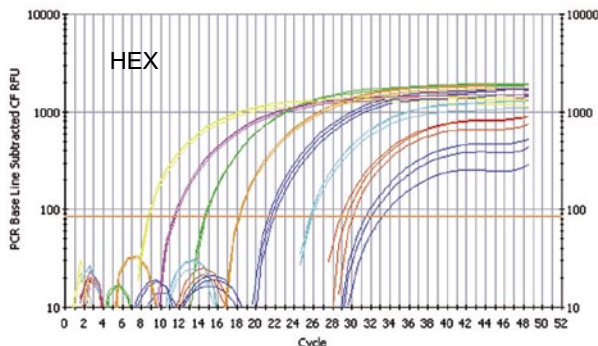


图4: 用基因特异性 SRY 引物和 TaqMan 探针进行扩增。

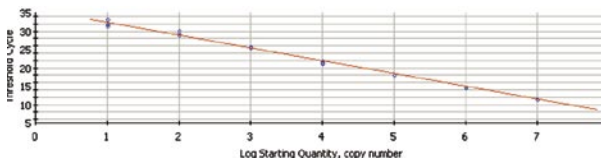


图5: SRY 质粒扩增标准曲线。

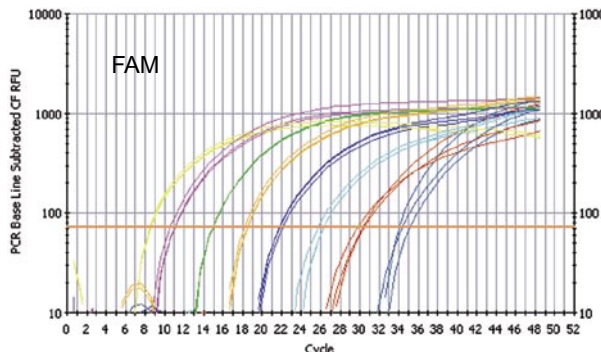


图6: 用基因特异性 GAPDH 引物和 TaqMan 探针进行扩增。

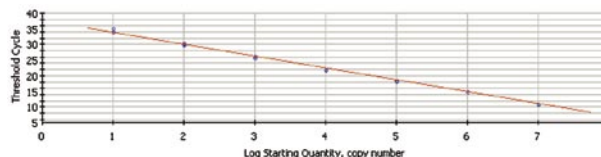


图7: GAPDH 质粒扩增的标准曲线。

上述的 SYBR Green I 和 TaqMan 分析都是使用 HotMaster Taq DNA 聚合酶来进行的, 并采用了严格优化的反应条件: 包括提高聚合酶、 Mg^{2+} 离子和引物/探针的浓度。在许多分析中 HotMaster 都可以作为实时定量 PCR 系统来使用。如果采用 Eppendorf 公司的实时定量 PCR 分析专用试剂盒 (以 HotMaster Taq DNA 聚合酶为基础), 则可以取得更好的效果。

作者 George Halley, Jennifer Halcome & Gerry Huitt,
JaNe Grutt, Ryan Westberry & Lars E. Peters,
Eppendorf-5 Prime, Inc., Boulder, CO, USA;
Vincent Prezioso, Brinkmann Instruments, Inc., NY, USA;
Andres Jarrin, Eppendorf AG