基于金纳米粒子的聚合酶链反应

沈鹤柏 户 敏 杨仲南 王 晨 朱龙章

(上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234. E-mail: shenhb@shnu.edu.cn)

摘要 系统研究了基于金纳米粒子的聚合酶链反应(PCR). 通过Au-S键将 5′端修饰-SH-$(CH_2)_6$-的引物连接在金纳米粒子表面, 采用质粒pBluescript SK作为模板, 分别研究了引物浓度、退火温度和循环次数对PCR的影响. 实验研究结果表明: 在优化的条件下, 将上游引物或下游引物连接在金纳米粒子表面以及将上游引物和下游引物分别连接在金纳米粒子表面, 均能顺利进行PCR. 基于金纳米粒子的PCR技术的建立, 将均相体系中的PCR技术扩展到纳米粒子表面, 不仅可以方便目标PCR产物的分离纯化, 而且可以为制备连接在纳米粒子表面的ssDNA和纳米结构材料提供新的方法.

关键词 **PCR** 金纳米粒子 纳米粒子表面的 **PCR** 纳米粒子聚合体

随着纳米技术向生命科学领域的不断渗透, 利用纳米生物技术研究和解决其中的重大问题, 推动纳米生物技术的发展, 成为当前一个重要的前沿领域[1,2]. 胶状的金纳米粒子(AuNPs), 由于其特殊的物理、化学性质和生物相容性, 在生物电化学、材料学及生物医学[3~5]等领域有很广泛的应用. 聚合酶链反应(PCR)是一种体外特定核酸序列扩增技术, 是现代分子生物学的实验工作基础之一, 在生命科学、遗传学和医学[6~9]等领域发挥着重要作用. PCR通常在均一的溶液中进行, 在纳米粒子界面上能否顺利进行PCR是一个具有探索性的问题. 近来, Turner等人[10]利用在微孔表面上的PCR检测了血色素基因的突变; Adessi和Huber等人[11,12]研究了玻璃表面的PCR, 探讨了研制DNA芯片的可能性; Lockley等人[13]对在尼龙表面的PCR做了初步的探索. 基于纳米粒子的PCR还未见报道. 如果在纳米粒子表面能顺利进行PCR, 把均相体系中的PCR技术扩展到纳米粒子表面, 将大大拓宽PCR技术的应用范围. 因此把引物连接在纳米粒子表面, 研究基于纳米粒子的PCR是有意义的. 本文系统研究了基于金纳米粒子的PCR. 为了减小引物连接在纳米粒子表面所产生的空间位阻, 在纳米粒子和引物之间连接-$(CH_2)_6$-作为缓冲连接臂. 通过Au-S键将 5′端修饰-SH-$(CH_2)_6$-的引物连接在金纳米粒子表面, 采用质粒pBluescript SK(pSK)作为模板, 用琼脂糖电泳和透射电子显微镜(TEM)等技术对PCR产物进行分析和检测, 分别研究了引物浓度、退火温度和循环次数对PCR的影响. 实验结果表明: 把上游引物或下游引物连接在金纳米粒子表面, 能够顺利进行PCR, 可以制得连接在金纳米粒子表面且具有特定序列和长度的 ssDNA, 可作为核酸分子探针, 应用于基因序列检测等方面的研究; 把上游引物和下游引物分别连接在金纳米粒子表面, 也能顺利进行 PCR, 且金纳米粒子能被 dsDNA 连接形成纳米粒子聚合体, 提供了一种制备纳米结构材料的方法. 此外由基于金纳米粒子的 PCR 制得的 ssDNA 和 dsDNA 均连接在金纳米粒子表面, 可以方便目标 PCR 产物的分离纯化. 因此研究基于金纳米粒子的 PCR, 不仅具有理论意义, 而且在核酸分子探针、材料科学和 PCR 产物分离等方面将有广阔的应用前景.

1 材料和方法

(ⅰ) 试剂和样品. 5′端修饰-SH-$(CH_2)_6$-的引物如下: 上游引物 1(F1)为 5′-SH-$(CH_2)_6$-GGGATAACGCAGGAAAGA-3′, 下游引物 1(R1)为 5′-SH$(CH_2)_6$-AGGGTCGGAACAGGAGA-3′, 上游引物 2(F2)为 5′-SH-$(CH_2)_6$-TATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTC-3′, 下游引物 2(R2)为 5′-SH-$(CH_2)_6$-TCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCG-3′; 引物均由上海生工生物试剂有限公司合成; 模板质粒pSK和Taq DNA聚合酶按照标准方法培养提纯. 所有的化学试剂均采用分析纯.

(ⅱ) 自由引物的PCR. 每管PCR反应体系包括 0.2 mmol/L dNTPs, 0.5 U的Taq DNA聚合酶, 5 ng模板质粒pSK, 3 μL反应缓冲液, 引物 F和引物R(均约 76 μmol/L)各 0.25 μL, 最后加灭菌水至总体积为 30 μL. R1 和F1 的PCR扩增程序为: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 20 s, T_x 退火 20 s, 72℃ 延伸 20 s, 20 个或 45 个循环; 72℃ 再延伸 3 min; T_x分别取 46, 50, 54, 58℃. R2 和F2 的PCR扩增程序为: 94℃ 预变性 3 min;

94℃ 变性 50 s, T_x退火 50 s, 72℃ 延伸 30 s, 20 个或 45 个循环; 72℃ 再延伸 4 min; T_x分别取 52, 56, 60, 65℃. 待反应结束后取 5 μL PCR产物, 用 3%琼脂糖凝胶电泳进行分析.

(iii) 在金纳米粒子表面连接引物. 采用Frens法[14]制备金溶胶. 将制得的金溶胶(约 17 nmol/L)加入到引物的溶液(约 76 μmol/L)中, 使之均匀分散, 在37℃水浴中反应 8 h, 再加入磷酸盐缓冲溶液(含 0.1 mol/L NaCl, pH 7.0), 37℃继续反应至少 16 h. 反应完毕, 先用 10000 r/min 离心 15 min, 除去上清液, 然后加磷酸盐缓冲溶液(含 0.1 mol/L NaCl, pH 7.0)离心清洗. 用上述多次清洗的方法除去未连接在金纳米粒子表面的引物. 最后分散在灭菌水中待用. 将引物连接在纳米粒子表面, 构成金纳米粒子-引物复合物.

(iv) 上游引物或下游引物连接在金纳米粒子表面的PCR. 分别取金纳米粒子-上游引物复合物(AuNP-F) 4 μL和下游引物(R) 0.25 μL或金纳米粒子-下游引物复合物(AuNP-R) 4 μL和上游引物(F) 0.25 μL配制 30 μL反应体系, 其他成分和PCR扩增程序分别同(ii). 待反应结束后, 在PCR产物中加入巯基乙醇, 在 37℃恒温水浴中放置 8 h[15]. 然后离心处理, 取 5 μL上清液, 用 3%琼脂糖电泳进行分析.

(v) 上游引物和下游引物分别连接在金纳米粒子表面的PCR. 分别取 AuNP-F 和 AuNP-R 各 4 μL配制 30 μL 反应体系, 其他成分和 PCR 扩增程序分别同(ii). PCR 产物分析方法同(iv).

2 结果与讨论

2.1 上游引物或下游引物连接在金纳米粒子表面的PCR

(1) PCR过程示意图(图 1). 连接在金纳米粒子表面的引物与变性的模板DNA杂交, 在dNTP和聚合酶的作用下, 引物充分延伸, 生成有一条单链连接在金纳米粒子表面的dsDNA; 变性后, 连接在金纳米粒子表面的ssDNA作为模板与没有连接金纳米粒子的引物杂交, 在dNTP和聚合酶的作用下, 引物充分延伸, 进行PCR.

(2) PCR 产物的电泳. 将 F1 或 R1 连接在金纳米粒子表面. 扩增片段为 217 bp. 图 2(a)是不同退火温度时只有 F1 连接在金纳米粒子表面进行 20 个循环的 PCR 产物电泳图. 由图可知通过与 DNA 分子量标准比较, 在 217 bp 的位置均有一条清晰的电泳条带; 在不同退火温度时, 条带都较窄, 特异性较好. 当选用 R1 连接在金纳米粒子表面进行实验, 得到同样的结果. 说明将上游引物或下游引物连接在金纳米粒子表面, 均能够顺利进行 PCR, 退火温度对 PCR 几乎没有影响.

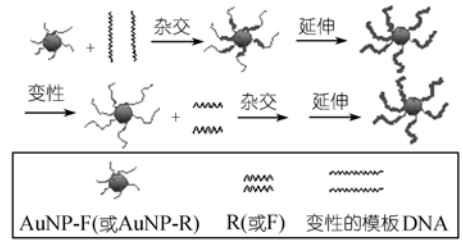

图 1　上游引物或下游引物连接在金纳米粒子表面的 PCR 过程示意图

为进一步验证这一结果, 在同一模板上设计了一对新的引物R2 和F2, 其扩增片段为 277 bp. 分别选用F2 或R2 连接在金纳米粒子表面进行PCR, 当进行 20 个循环时, 得到与F1 或R1 连接在金纳米粒子表面进行 20 个循环同样的结果. 当PCR进行 45 个循环时, F2 连接在金纳米粒子表面的PCR产物电泳图如图 2(b)所示. 由图可知: 通过与DNA分子量标准比较, 在 277 bp的位置均有一条清晰的电泳条带, 但在此条带的下面有杂带出现, 说明当循环次数较多时, PCR 的特异性变差. 选用R2 连接在金纳米粒子表面按相同的条件进行实验, 得到类似的结果. 这可能是由于循环次数较多, 产生的连接在金纳米粒子上表面的PCR产物较多, 空间位阻增大, 再进行PCR, 产生非特异性杂交和扩增导致的结果; 也可能是由于不能精确计算连接在金纳米粒子表面的引物浓度, 使其和自由引物浓度不一致, 当循环次数较多时出现的与单链相关的条带[16].

由以上结果可知, 将上游引物或下游引物连接在金纳米粒子表面, 能够顺利进行 PCR, 且几乎不受退火温度的影响, 但当循环次数较多时, PCR 的特异性变差. 在将上游引物或下游引物连接在金纳米粒子表面的 PCR 产物中, 有一条单链连接在金纳米粒子表面, 通过热变性或酸碱变性后, 可以方便地分离得到 ssDNA. 这一结果提供了一个方法, 即可以根据不同的需要, 将相应的引物连接在金纳米粒子表面进行 PCR, 便可得到 ssDNA.

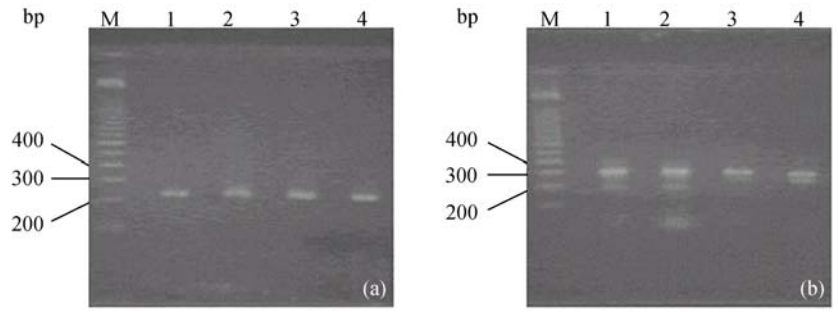

图 2 上游引物或下游引物连接在金纳米粒子表面的 PCR 产物电泳图

(a) 引物为 AuNP-F1 和 R1, 退火温度分别为 1, 46℃; 2, 50℃; 3, 54℃; 4, 58℃, 20 个循环. (b) 引物为 AuNP-F2 和 R2, 退火温度分别为 1, 52℃; 2, 56℃; 3, 60℃; 4, 65℃. 45 个循环. M 为 DNA 分子量标准

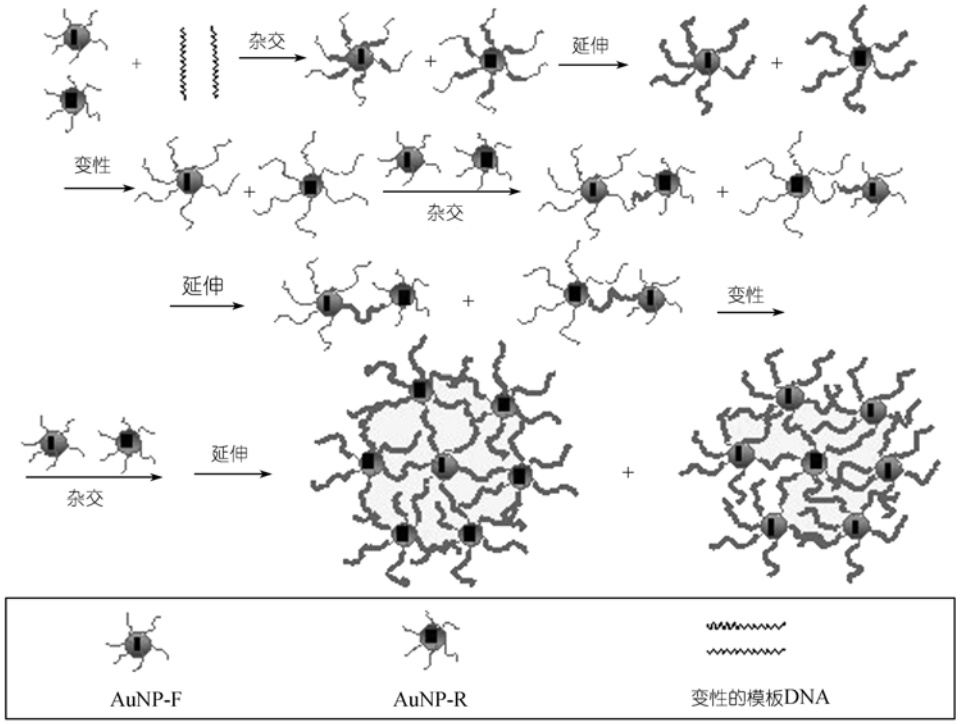

图 3 上游引物和下游引物分别连接在金钠米粒子表面的 PCR 过程示意图

2.2 上游引物和下游引物分别连接在金纳米粒子表面的 **PCR**

(1) PCR 过程示意图(图 3). 连接在金纳米粒子表面的引物与变性的模板 DNA 杂交, 在 dNTP 和聚合酶的作用下, 引物充分延伸, 生成有一条单链连接在金纳米粒子表面 dsDNA; 变性后, 连接在金纳米粒子表面的 ssDNA 作为模板与连接在金纳米粒子表面的引物杂交, 在 dNTP 和聚合酶的作用下, 引物充分延伸, 进行 PCR. 最后形成金纳米粒子聚合体.

(2) 连接在金纳米粒子表面的引物浓度对PCR的影响. 采用等体积的金溶胶分别与不同体积的引物进行连接, 制得连有不同浓度引物的金纳米粒子, 并将其分散在灭菌水中. 取相同体积AuNP-F2 和 AuNP-R2 进行实验. 图 4 是退火温度为 65℃进行 20 个循环的PCR产物电泳图. 由图可知: 泳道 1, 2 中无条带出现; 泳道 3 中条带较淡; 泳道 5, 6 中条带较亮; 泳道 4 中条带最亮. 基于金纳米粒子的PCR, 由于连接臂-$(CH_2)_6$-在一定程度上减小了由于金纳米粒子而导致的空间位阻, 因此当连接在金纳米粒子表面的引物浓度较低时, 空间位阻对引物的杂交和扩增影响较小, 其杂交和扩增效率较高. 在一定浓度范围内, PCR产物随引物浓度的增加而增多, 条带逐渐变亮,

如泳道 1, 2, 3, 4 中的条带所示. 随着浓度的增加, 空间位阻的影响逐渐增大. 当浓度增大到一定程度, 引物的杂交和扩增变得比较困难, 其杂交和扩增效率将会降低. 虽然引物的浓度较大, 但PCR产物条带不理想, 如泳道 5, 6 中的条带所示. 实验结果表明, 泳道 4 中的浓度较为合适. 以下实验均采用此浓度.

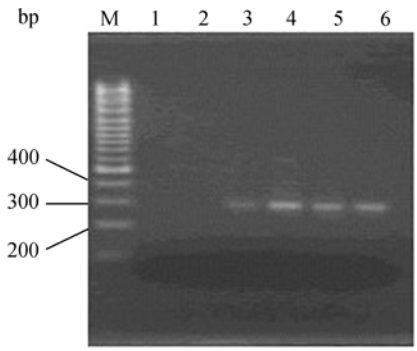

图 4　引物为 AuNP-F2 和 AuNP-R2 的 PCR 产物电泳图
各泳道引物和金溶胶的体积比分别为 1, 1∶50; 2, 1∶10; 3, 1∶2; 4, 1∶1; 5, 2∶1; 6, 10∶1. M 为 DNA 分子量标准

(3) PCR 产物的电泳. 图 5(a)是不同退火温度时引物 F1 和 R1 分别连接在金纳米粒子表面, 进行 20 个循环时得到的 PCR 产物电泳图. 由图可知: 通过与 DNA 分子量标准比较, 在 217 bp 的位置均有一条清晰的电泳条带; 在不同退火温度时, PCR 产物的条带均较窄, 特异性较好. 说明上游引物和下游引物分别连接在金纳米粒子表面同样能顺利进行 PCR, 且在一定温度范围内, 退火温度对 PCR 几乎没有影响. 可能是因为当 PCR 进行的循环次数较少时, 产生的连接在金纳米粒子表面的 PCR 产物较少, 空间位阻相对较小, 由 dsDNA 连接而成的纳米粒子聚合体也较小, 热变性能够使 dsDNA 充分解链, 在退火过程中引物仍能够与模板充分杂交, 顺利进行 PCR. 因此整个 PCR 过程几乎不受退火温度的影响.

为进一步验证这一结果, 采用 AuNP-F2 和 AuNP-R2 进行实验, 当 PCR 进行 20 个循环时得到同样的结果. 但当 PCR 进行 45 个循环时, 其电泳图如图 5(b)所示. 由图可知: 在 277 bp 的位置均有电泳条带出现, 但有拖尾现象; 随着退火温度的升高, 条带逐渐变窄, 拖尾现象逐渐消失. 说明当循环次数较多时, PCR 受退火温度的影响较大. 可能是因为随着循环次数的增加, 连接在金纳米粒子表面的 PCR 产物逐渐增多, 空间位阻增大; 同时形成的金纳米粒子聚合体也较大, 热变性很难使其中的 dsDNA 充分解链, 在退火过程中引物就不可能与模板充分杂交, 从而导致部分非特异性扩增, 在电泳图中就会出现拖尾现象. 提高退火温度, 有利于碱基的配对和扩增特异性的提高. 因此在图 5(b)中, 随退火温度的升高, 条带逐渐变窄, 拖尾现象逐渐消失, 65℃时得到很好的条带. 实验结果表明当上游引物和下游引物分别连接在金纳米粒子表面时, 同样能够进行 PCR, 但受退火温度的影响程度与其循环次数有关. 当循环次数较少时, 几乎不受退火温度影响; 当循环次数较多时, 受退火温度的影响较大.

(4) PCR产物的透射电子显微镜观察. Mirkin[3]和Alivisatos[4]等人将oligoDNA连接在金纳米粒子表面, 通过oligoDNA的分子识别将纳米粒子组装起来. 据此推测, 通过上游引物和下游引物分别连接在金纳米粒子表面的PCR, 金纳米粒子将被dsDNA连接而形成纳米粒子聚合体. 图 6(a)是金纳米粒子的TEM照片. 照片显示金纳米粒子的粒径约为 13 nm. 图 6(b)是退火温度为 65℃时F2 和R2 分别连接在金纳米粒

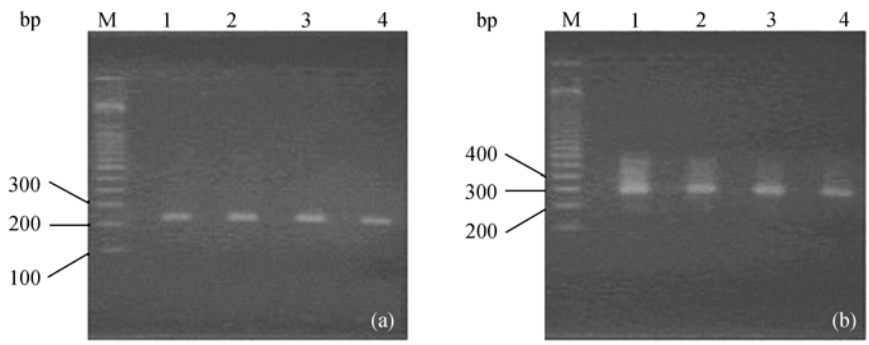

图 5　上游引物和下游引物分别连接在金纳米粒子表面的 PCR 产物电泳图
(a) 引物为 AuNP-F1 和 AuNP-R1, 退火温度分别为 1, 46℃; 2, 50℃; 3, 54℃; 4, 58℃, 20 个循环. (b) 引物为 AuNP-F2 和 AuNP-R2, 退火温度分别为 1, 52℃; 2, 56℃; 3, 60℃; 4, 65℃. 45 个循环. M 为 DNA 分子量标准

子表面进行 45 个循环时的 PCR 产物的 TEM 照片. 照片显示 PCR 产物的粒径主要集中在 125 nm 的范围里. 将图 6(b)与图 6(a)比较可知, 金纳米粒子被 dsDNA 连接形成了纳米粒子聚合体. 金纳米粒子被 dsDNA 连接形成纳米粒子聚合体, 是金纳米粒子在 PCR 过程中以 DNA 为模板的一种组装. dsDNA 具有可逆的变性和复性功能, 因此上游引物和下游引物分别连接在金纳米粒子表面的 PCR, 可制得具有可逆分散和聚集功能的金纳米粒子聚合体.

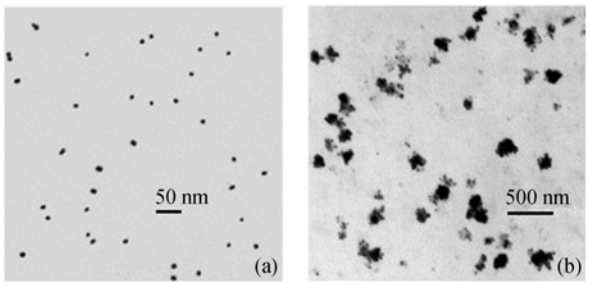

图 6 透射电子显微镜照片

(a) AuNPs 的透射电子显微镜照片; (b) 引物为 AuNP-F2 和 AuNP-R2 的 PCR 产物的透射电子显微镜照片

3 结论

(1) 在优化的条件下, 将上游引物或下游引物连接在金纳米粒子表面以及将上游引物和下游引物分别连接在金纳米粒子表面, 均能顺利进行 PCR, 且可以方便目标 PCR 产物的分离纯化.

(2) 通过上游引物或下游引物连接在金纳米粒子表面的 PCR, 可制得具有特定序列和长度的 ssDNA, 有望发展成为一种制备核酸探针的方法.

(3) 通过上游引物和下游引物分别连接在金纳米粒子表面的 PCR, 金纳米粒子能被 dsDNA 连接形成纳米粒子聚合体, 提供了一种制备纳米结构材料的方法.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 20443005)资助项目、上海市科学技术委员会纳米专项(批准号: 0352nm123)和上海市教委重点项目(批准号: 04DA01).

参 考 文 献

1 沈鹤柏, 汪友宝, 杨海峰, 等. DNA 在磁性纳米粒子表面的键合及表面增强拉曼光谱研究. 科学通报, 2003, 48(21): 2252~2256[摘要][PDF]

2 Katz E, Willner I. Integrated nanoparticle–biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. Angew Chem, 2004, 43: 6042~ 6108[DOI]

3 Mirkin C A, Letsinger R L, Mucic R C, et al. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. Nature, 1996, 382 (6592): 607~609[DOI]

4 Alivisatos A P, Johnsson K P, Peng X G, et al. Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA. Nature, 1996, 382 (6592): 609~611[DOI]

5 Daniel M C, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemical, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. Chem Rev, 2004,104(1): 293~346[DOI]

6 Glynou K, Ioannou P C, Christopoulos T K, et al. Oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for DNA analysis by hybridization. Anal Chem, 2003, 75(16): 4155~4160[DOI]

7 Holzel R, Gajovic-Eichelmann N, Bier F F. Oriented and vectorial immobilization of linear M13 dsDNA between interdigitated electrodes-towards single molecule DNA nanostructures. Biosensors and Bioelectronics, 2003,18 (5-6): 555~564[DOI]

8 Naik R R, Jones S E, Murray C J, et al. Peptide templates for nanoparticle synthesis derived from polymerase chain reaction-driven phage display. Advanced Functional Materials, 2004, 14(1): 25~30[DOI]

9 Li H X, Rothberg L J. Label-free colorimetric detection of specific sequences in genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction. J Am Chem Soc, 2004, 126(35): 10958~10961[DOI]

10 Turner M S, Penning S, Sharp A, et al. Solid-phase amplification for detection of C282Y and H63D hemochromatosis (HFE) gene mutations. Clinical Chemistry, 2001, 47(8): 1384~1389

11 Adessi C, Matton G, Ayala G, et al. Solid phase DNA amplification: characterization of primer attachment and amplification mechanisms. Nucleic Acids Res, 2000, 28: 20e87

12 Huber M, Losert D, Hiller R, et al. Detection of single base alterations in genomic DNA by solid phase polymerase chain reaction on oligonucleotide microarrays. Analytical Biochemistry, 2001, 299: 24~30[DOI]

13 Lockley A K, Jones C G, Bruce J S, et al. Colorimetric detection of immobilised PCR products generated on a solid support. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 1313~1314[DOI]

14 Frens G. Controlled nucleation of the regulation of the particle size in monodisperse gold solution. Nat Phys Sci, 1973, 241: 20~22

15 Nicewarner Pena S R, Raina S, Goodrich G P, et al. Hybridization and enzymatic extension of Au nanoparticle-bound oligonucleotides. J Am Chem Soc, 2002, 124(25): 7315~7323

16 Poddar S K. Symmetric vs asymmetric PCR and molecular beacon probe in the detection of a target gene of adenovirus. Molecular and Cellular Probes, 2000, 14: 25~32[DOI]

(2004-10-10 收稿, 2005-01-05 收第 1 次修改稿, 2005-03-24 收第 2 次修改稿)