

# 定量 PCR 的非同源对照模板的构建

陈 燃 金 , 毛裕民

(复旦大学生命科学院遗传所遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

**摘 要** 建立了 HCV RNA 和 hTERT mRNA 的竞争定量 PCR 系统。对照模板的构建方法是: 利用计算机辅助优选设计连接引物, 低严紧型扩增大肠杆菌 DNA, 回收并克隆预期的 DNA 片段。该片段与靶序列除两端引物序列完全相同外, 无同源性, 因此可作为非同源对照模板。这种构建非同源对照模板的方法, 简便易行, 适应面广。

**关键词** 竞争定量 PCR; 对照模板; 异源双链

中图分类号: Q933

文献标识码: A

文章编号: 0253-977X(2001)03-0247-04

## Generation of Non-homologous Competitor DNA for Competitive Quantitative PCR

CHEN Ran, JIN Zhe, MAO Yu-min

(State Key Lab of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

**Abstract** It cannot be neglected sometimes that the error caused by the "heteroduplex DNA" that occurs accompanying with the homologous competitor DNA which is usually used in the competitive quantitative PCR (CQ-PCR). Here a method is developed to generate non-homologous competitor DNA for CQ-PCR detection of the interest DNA, based on low-stringency amplification of cross-species' DNA with a pair of linker-primers which are designed according to partly homologous sites of the interest DNA primers in cross-species' DNA. With the method, the non-homologous competitor DNAs for the HCV RNA and hTERT mRNA are generated from *E. coli* DNA respectively, then the CQ-PCR systems are established for the 2 species' RNAs with the RRTR (Repeated reverse transcription reaction). The method is multi-adaptive and easy to apply.

**Key words** competitive quantitative PCR; competitor DNA; heteroduplex DNA

竞争定量 PCR (competitive quantitative PCR, CQ-PCR) 具有简便、灵敏的特点, 是应用最广泛的定量 PCR 技术<sup>[1~3]</sup>。构建合适的竞争对照模板是 CQ-PCR 成功的关键, 要求 (1) 扩增效率尽量与靶序列一致 (2) 能方便地与靶序列扩增片段区分。一般的方法是在靶序列中制造突变, 如: 点突变、缺失、插入突变等。但这样的对照与靶序列的同源性很高, 当靶序列比对照模板大量过量时, 以及在

PCR 扩增后期 (平台期), 由于很容易出现异源双链, 给定量结果造成的误差较大<sup>[4,5]</sup>。

非同源对照模板能够消除异源双链现象<sup>[4,5]</sup>。本文报道一种连接引物低严紧型 PCR 的非同源对照模板构建方法。以大肠杆菌 DNA 为来源, 分别构建了丙型肝炎病毒 (HCV) RNA 和人端粒酶反转录酶 (hTERT) mRNA 的非同源对照模板, 反相应地建立了定量 PCR 系统。

收稿日期: 2000-07-10; 修回日期: 2000-10-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39700082)

作者简介: 陈 燃 (1970-), 男, 安徽人, 博士, 讲师, 专业方向: 分子遗传学, 基因工程。

毛裕民 (1952-), 男, 上海人, 博士, 教授, 博导, 专业方向: 基因组学, 蛋白质组学, 本文通讯作者。

电话: (021) 65643573; E-mail: ymmao@fudan.edu.cn

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品来源

HCV 阳性血清由上海第二医科大学免疫室提供。K562 细胞株由上海市肺科医院肺癌研究室提供。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株为本实验室培养。

### 1.2 核酸提取

RNA 提取采用异硫氰酸胍 - 酚 - 氯仿 - 步法并略加改进。大肠杆菌基因组 DNA 提取按常规方法进行。RNA 溶于 DEPC 处理过的双蒸水中, DNA 溶于 TE 中。核酸质量测定采用琼脂糖凝胶电泳估测法。

### 1.3 DNA 分子大小标准

DNA Ladder 购自 MBI 公司, 片段大小 (bp) 为: 1031、900、800、700、600、500、400、300、200、100、80。PCR Marker 购自华美生物工程公司, 片段大小 (bp) 为: 1543、994、695、515、377、237。

### 1.4 靶序列引物

引物设计采用 Omega 2.0 软件, 由上海生工生物工程公司代为合成。HCVP1/HCVP2 为 HCV RNA 特异引物, 扩增片段长度为 297 bp; HTEP3/HTEP4 为 hTERT mRNA 特异引物, 扩增片段长度为 315 bp。序列如下:

HCVP1 :CTGTGAGGA ACTACTGTCTTC ;  
 HCVP2 :GGTGACGGTCTACGAGACCT ;  
 HTEP3 :CCGTGTCACCTACGTGCCACTCCTG ;  
 HTEP4 :ACACTCAGCCTTCAGCCGGACATGC.

### 1.5 低严紧型 PCR 扩增及片段回收

反应体系 (20 $\mu$ l): 10 mmol/L Tris - HCl (pH 8.2, 25 $^{\circ}$ C) 50mmol/L KCl 2.5mmol/L MgCl<sub>2</sub> 0.2 mmol/L dNTP, 1.0 mmol/L DTT, 0.1 mg/ml 明胶, 8% 甲酰胺, 0.5 U Taq 酶, 各 1.0 $\mu$ mol/L 连接引物, 大约 0.1ng 大肠杆菌 DNA。反应程序 (MJ - PTC200 热循环仪, 下同): 94 $^{\circ}$ C 20 s, 50 $^{\circ}$ C 20s, 72 $^{\circ}$ C 40s, 32 次循环, 72 $^{\circ}$ C 保温 5min。产物回收: 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 EB 0.5 $\mu$ g/ml) 电泳, FR980 生物电泳图像分析系统分析, 拍照记录, 凝胶回收试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司) 切胶回收预期的扩增片段。

### 1.6 非同源对照模板克隆

回收片段克隆采用 Promega 公司的 pGEM<sup>®</sup> - T Vector 系统; 质粒抽提采用 Promega 公司的 Wiz-

ard<sup>®</sup> plus DNA 抽提系统; 操作均按说明书进行。常规 PCR 扩增对质粒进行验证。琼脂糖凝胶电泳估计 DNA 的量。

### 1.7 RRTR - CQ - PCR 及电泳

循环反转录反应 (repeated reverse transcription reaction, RRTR, 中国发明专利: 98121932.2): 20 $\mu$ l 体系中, 含 25 mmol/L Tris - HCl (pH 8.2, 25 $^{\circ}$ C); 15 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1.0 mmol/L MnCl<sub>2</sub>; 0.2 mmol/L dNTP; 1.0 mmol/L DTT, 0.1 mg/ml 明胶; 1.2  $\mu$ mol/L HCVP<sub>2</sub> 或 hTEP4, 0.5 U FD - TRT<sup>[6]</sup>; 5  $\mu$ l RNA 模板。按程序: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 2 min, 32 次循环, 进行反应, 然后, 向反应管中补充 0.5 mmol/L EDTA, 1.0  $\mu$ mol/L PCR 上游引物, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 及 0.5 U Taq 酶, 约 0.02 ng 的对照模板, 按程序: 94 $^{\circ}$ C 20 s, 55 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 40s, 34 次循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 继续进行反应。然后对产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 EB 0.5  $\mu$ g/ml) 电泳, 扫描记录。

定量分析方法参照文献的方法进行<sup>[3]</sup>: 计算靶扩增带与对照扩增带的光密度比值, 取对数, 采用 Microcal Origin 5.0 系统分析作图。

## 2 结 果

### 2.1 计算机辅助优选设计连接引物

在大肠杆菌基因组中选择大小适宜的 ECOLPXA 基因为搜索范围。引物位点组合以错配数少, 且相距长度比靶序列扩增长度大 100 ~ 200 bp 为最佳。连接引物 3' 端增加的位点序列的长度为:  $X = L - (M - N)$ , 其中  $L$  为拟定的连接引物与位点同源的碱基数, 设定为 17;  $M$  为靶序列引物的长度,  $N$  为错配数 ( $\leq 0.45 \times M$ )。结果见表 1。

### 2.2 低严紧型 PCR 扩增及非同源对照模板质粒

连接引物与位点同源碱基数为 17, 这时的  $T_m$  值约等于 50 $^{\circ}$ C。因此 PCR 采用复性温度 50 $^{\circ}$ C, 这样能保证适当的严紧型 (图 1)。以靶序列单引物或引物对组合, 对克隆回收片段的质粒 (A. LHTEP3 + P4; B. LHCP1 + P2) 在严紧条件下进行 PCR, 结果只有靶序列引物组合扩增得到预期产物, 说明回收片段的两端为一对靶序列引物序列, 因此适合作竞争对照 (图 2)。

表 1 在大肠杆菌 *ECOLPX*A 基因中搜索并设计连接引物

| 靶序列引物     | 位 点 数            |                   | 最适位点组合           | 连接引物的名称和序列(5'-3') <sup>*</sup> *           | 对照长度 (bp) |
|-----------|------------------|-------------------|------------------|--|-----------|
|           | 正向               | 反向                |                  |  |           |
| H C V P 1 | 5 <sup>*</sup>   | 4 <sup>*</sup>    | 正 向<br>4724-4744 | 名称 :LHCP1<br>CTGTGAGGAAGTACTGTCTTC-gtttg   | 435       |
| H C V P 2 | 7 <sup>*</sup>   | 8 <sup>*</sup>    | 反 向<br>5138-5158 | 名称 :LHCP2<br>GGTGCACGGTCTACGAGACCT-gttcc   |           |
| H T E P 3 | 6 <sup>***</sup> | 4 <sup>***</sup>  | 正 向<br>1333-1357 | 名称 :LHTP3<br>CCGTCGCACCTACGTGCCACTCCTG-ggg | 419       |
| H T E P 4 | 4 <sup>***</sup> | 10 <sup>***</sup> | 反 向<br>1727-1751 | 名称 :LHTP4<br>ACACTCAGCCTTCAGCCGGACATGC-ggg |           |

注 : \* 错配数 ≤ 9 ; \*\* 小写字母代表 3' 端增加的大肠杆菌 DNA 序列 ; \*\*\* 错配数 ≤ 11

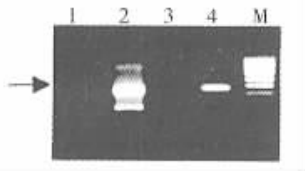


图 1 低严谨型 PCR 扩增

1 :LHTP3 + P4 ,ddH<sub>2</sub>O 2 :LHTP3 + P4 大肠杆菌 DNA 3 :LHCP1 + P2 ,ddH<sub>2</sub>O 4 :LHCP1 + P2 大肠杆菌 DNA ;M :DNA Ladder。(箭头指向 2、4 泳道切胶回收带)

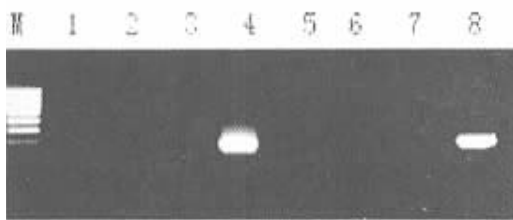


图 2 质粒扩增验证

M :DNA Ladder ;1 :HTERTP3 质粒 A 2 :HTERTP4 质粒 A 3 :HTERTP3 + HTERTP4 大肠杆菌 DNA 4 :HTERTP3 + HTERTP4 质粒 A ;5 :HCV1 质粒 B 6 :HCV2 质粒 B 7 :HCV1 + P2 大肠杆菌 DNA 8 :HCV1 + P2 质粒 B。

### 2.3 RRTR - CQ - PCR 系统

巢氏 PCR ( nested primers - PCR ) ,因连续 2 次指数过程 ,存在复杂的平台效应问题 ,一般不适用于定量 PCR。因为 HCV RNA 和 hTERT mRNA 都是低丰度 RNA ,所以本文采用 RRTR 通过增加 cDNA 量来提高 RNA 检测的灵敏度。因为 RRTR 是线性

增长过程 ,不同起始浓度的靶序列 ,经过相同循环数的 RRTR 后 ,拷贝数比值不变 ,不会影响 CQ - PCR 数学模型。根据实验结果 ,分别拟合标准曲线 ,可对未知样品进行相对定量 ( HCV RNA :图 3 , hTERT mRNA :图 4 )。

### 3 讨 论

CQ - PCR 的异源双链问题的解决方法有 PATTY 法<sup>[1]</sup>、双酶切法<sup>[2]</sup>、TGGE 法<sup>[7]</sup>等 ,这些方法增加了操作步骤和花费。采用非同源标准对照模板 ,则不需再进行额外的步骤 ,但一般灵活性和适应面有限制 ,不够通用。比如 :Uberla 等利用靶序列引物 ,直接对异种 DNA 模板 ,进行低严谨型扩增的方法<sup>[4]</sup> ,虽然简便 ,但具有 2 个明显的缺点 ( 1 )回收片段往往实际上是单引物扩增的产物 ,扩增效率与靶序列可能差别较大 ( 2 )片段的大小不能够预先确定 ,可能得不到合适的片段。另一种简便方法是使用长连接引物 ,即将靶序列引物序列连接在异种 DNA 引物的外侧<sup>[5]</sup>。但这样合成的连接引物太长很不经济 ,并且易出现过多的非特异扩增 ,导致复杂结果。本文设计的方法 ,克服了以上 2 种方法的缺点 ,使用的连接引物长度较短 ,可预定大小适合的对照片段 ,通用性好。

本方法有两个要点 ( 1 )要选择容易得到且大小适中的 DNA。过小 ,则限定的 9 ~ 11 个错配碱基的同源位点少 ,不易找到合适的组合。过大 ,则同源位点过多 ,不仅优选的工作量大 ,而且易导致扩增结果复杂化。因此 ,实验室常用的工具 DNA ,如质粒、大肠杆菌 DNA 等为优先考虑对象。( 2 )连接引物不宜太长 ,复性温度不宜太低 ,否则会导致结果复杂化。

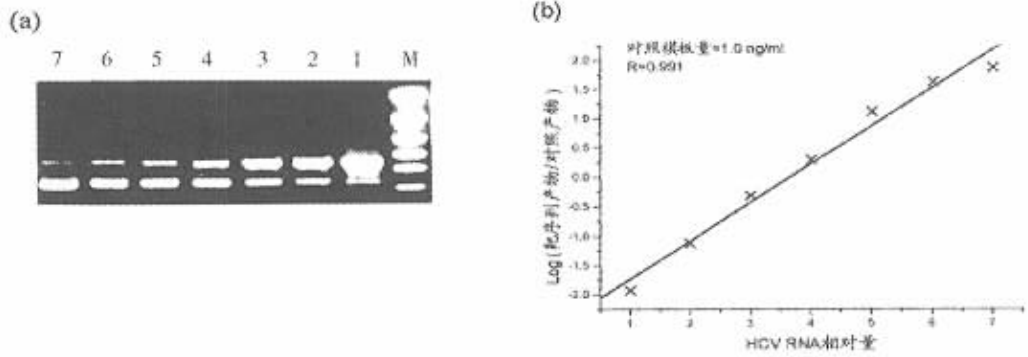


图 3 HCV RNA 的定量结果

(a)电泳结果。1~7 :HCV RNA 的倍增梯度 ;M :PCR-Markers (b)标准曲线拟合 ,R 为拟合度

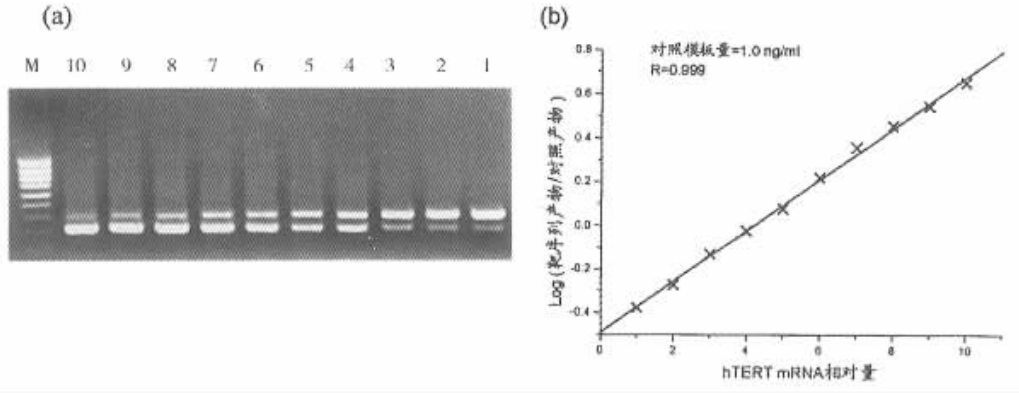


图 4 HTERT mRNA 的定量结果

(a)电泳结果。1~10 :总 RNA 的倍增梯度 ;M :DNA Ladder (b)标准曲线拟合 ,R 为拟合度。

参考文献 (References):

[ 1 ] Becker - Andre M ,Hahlbrock K. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reactor( PCR ). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay ( PATTY)[ J ]. Nucleic Acids Res ,1989 ,17 :9437 ~ 9446.

[ 2 ] Fandrey J ,Bunn H F. *In vivo* and *in vitro* regulation of erythropoietin mRNA :measurement by competitive polymerase chain reaction[ J ]. Blood ,1993 ,81 :617 ~ 623.

[ 3 ] Tsai S - J ,Wiltbank M C. Quantification of mRNA using competitive RT - PCR with standard - curve methodology[ J ]. Biotechniques ,1996 ,21( 5 ) :862 ~ 866.

[ 4 ] Uberla K ,Platzer C ,Diamantstein T ,et al . Generation of competitor DNA fragments for quantitative PCR[ J ]. PCR Methods Appl , 1991 ,( 2 ) :136 ~ 139.

[ 5 ] Platzer C ,Richter G ,Uberla K ,et al . Analysis of cytokine mRNA levels in interleukin - 4 - transgenic mic by quantitative polymerase chain reactor[ J ]. Eur J Immunol ,1992 ,22 :1179 ~ 1184.

[ 6 ] 殷长传 颜学恒 郑佐华 等 . FD - TRT 耐热逆转录酶的特性分析[ J ]. 复旦学报( 自然科学版 ) ,1998 ,37( 2 ) :225 ~ 228.

[ 7 ] Kang J ,Harders J ,Riesner D ,et al . TGGE in quantitative PCR of DNA and RNA[ J ]. Methods Mol Biol ,1994 ,31 :229 ~ 235.