

纳米粒子 PCR 产物的纯化及 AFM 观察

米丽娟^{1,2} 李 宾¹ 周化岚¹ 王化斌^{1,2} 胡 钧¹

1 (中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

2 (中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 适量浓度的纳米金可显著改善 PCR 扩增的特异性, 提高扩增的灵敏度和反应速度。本文比较了不同方式处理纳米金优化后扩增产物的纯化效率, 同时利用原子力显微镜(AFM)表征了扩增产物的形貌。结果表明, 直接纯化纳米粒子 PCR 产物的纯化效率较高, 且纳米金不会对大量扩增产物造成影响, 但可能影响少量 DNA 的形貌; 在乙醇沉淀 DNA 之前的高速离心步骤, 虽纯化效率略有降低, 少量 DNA 依然会随纳米金共沉降, 但可有效排除扩增产物中的纳米金。

关键词 PCR, 纳米金, DNA 纯化, 原子力显微镜

中图分类号 O6.05

利用多种添加剂, 如有机小分子、高聚物或者蛋白等^[1-6], 可明显改善聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)的某些重要特性。这是一种简单、有效地优化 PCR 体系的方法。纳米金(Au nanoparticles, AuNPs)是近些年来发现的一种优化 PCR 反应的新型添加剂, Li H. K.等^[7]发现, 浓度为 0.4—0.8 nmol/L 的 AuNPs 可抑制二次 PCR 扩增体系的非特异性条带的产生, 且这种优化能力可在很宽的温度范围内有效。Li M.等^[8]报道, 0.7 nmol/L AuNPs 在改善 PCR 的灵敏度与加快反应速度方面有很好的效果。因此, 利用纳米材料优化 PCR 反应, 具有一些独特的优点。然而, AuNPs 自身的电学、光学、热学等物理性质^[9]及其与单链 DNA 和多种蛋白质结合的生物学特性^[10-13], 在优化 PCR 反应的同时, 其复杂、综合的作用方式是否会影响 PCR 产物及其进一步应用, 尚有不少问题值得探讨。其中的一个明显问题, 是 AuNPs 优化的 PCR 产物中常常会存在微量 AuNPs 红色沉淀。而且, 对 PCR 体系添加 AuNPs 是一种新的 PCR 优化技术, 则通常用于纯化 PCR 产物的方法是否合适? 是否需要建立一种针对该 PCR 产物的纯化方法? 对这些问题的研究, 迄今未见相关报道。

近些年来, 原子力显微镜(Atomic force microscopy, AFM)广泛运用于生物大分子的研究, 特别是 DNA 的分子水平观测及纳米操纵。Engel 等^[14]指出, 可通过纪录 AFM 微悬臂针尖的偏折以反

映生物分子的表面形貌, 甚至可在生理状态下观察生物分子的天然状态。Hu^[15]等报道了在氨基三乙氧基硅烷(Aminopropyl triethoxysilane, APS)修饰的云母表面, 利用 AFM 观察单个伸展的 DNA 分子的研究工作。Rothenmund^[16]则利用碱基之间的配对关系, 构建并用 AFM 观察由 DNA 分子组成的各种纳米尺度的几何图形。Lü 等^[17]用 AFM 定位切割分离 DNA 分子, 并对其进行单分子 PCR 扩增检测。总而言之, AFM 是纳米尺度上研究物质结构、特性和相互作用的有力手段。尤其是, 轻敲模式原子力显微镜(Tapping mode AFM, TMAFM)技术, 利用 AFM 针尖与样品表面短暂而轻微地接触对样品成像, 故更宜于对生物样品的研究, 也将有助于 AuNPs 优化的 PCR 产物的形貌观察, 从而研究 AuNPs 对 DNA 产物有否影响。

本文对常规 PCR 和 AuNPs 优化的 PCR 产物的纯化效果进行比较, 建立了一种可应用于纳米粒子 PCR 产物纯化的方法; 同时, 应用 TMAFM 对扩增产物 DNA 的形貌和长度进行表征。结果表明, 纳米粒子 PCR 产物没有发生可辨别的显著变化, 从而为其更广泛应用提供了依据。

1 材料与方法

1.1 PCR 扩增及产物检测

以 pBR322/pst I DNA Marker (华美生物工程公

国家自然科学基金项目(No.10674147, 10675160)资助

第一作者: 米丽娟, 1974 年 5 月出生, 现为中国科学院上海应用物理研究所攻读博士研究生, 主要从事纳米粒子优化 PCR 反应机理的研究

通讯作者: 李 宾

收稿日期: 2007-03-13, 修回日期: 2007-04-30

司, 中国上海)为模板, 扩增一段 886 bp 的 DNA 序列, 上游引物: 5'-TGACGACCATCAGGGACA-3', 下游引物: 5'-TAAAGCGGGCCATGTTAA-3'(上海生工生物工程技术有限公司合成)。扩增体系总体积为 25 μL , 其中含有 50 mmol/L KCl、10 mmol/L Tris-HCl、1.0% Triton X-100、1.5 mmol/L MgCl_2 和 0.8 mmol/L 的 dNTP 混合物, 上游和下游引物均为 12.5 pmol。常规 PCR 使用 1.75 U 的 Taq DNA 聚合酶(华美生物工程公司, 中国上海), 而纳米粒子 PCR 产物制备按照以前描述的优化区间^[18], 选择 1.75 U 的 Taq DNA 聚合酶与 0.6 nmol/L 的 AuNPs ($\Phi 10\text{nm}$, Sigma)组合使用。扩增反应在 PCR 仪(Eppendorf Mastercycler Gradient, 德国)上按照如下程序运行: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5min 预变性, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30s 变性, 52 $^{\circ}\text{C}$ 30s 退火, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30s 延伸, 重复 28 个循环, 最后再延伸 5min。产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 分子量标准为 DL-2000(含有 6 个条带, 分别代表 2000、1000、750、500、250 与 100 bp, TaKaRa), 5 μL DL-2000 电泳时, 每条带代表 50 ng 的 DNA。最后应用复日 FR-980 生物电泳图像分析系统检测产物, 并与 DL-2000 对比, 对扩增产量进行定量分析。

1.2 PCR 产物纯化

按照常规乙醇沉淀 DNA 的方法^[19]纯化 PCR 产物。首先加入 2.5 倍容积的冰冷无水乙醇(上海振兴化工一厂), 置于冰上 15—30 min, 12000 rpm 离心 30 min, 使 DNA 沉于管底, 用微量移液枪轻轻吸出乙醇; 加入 70% 的乙醇漂洗两遍以除去残余的盐, 5000 rpm 离心 10 min, 吸去上清; 让乙醇在室温下挥发; 使用原体积量的双蒸水悬浮沉淀。

1.3 扩增产物在 APS 云母上制样及 AFM 观察

将 0.01% 的 APS 滴加在新解理的云母表面, 通过自组装方法制备 APS 云母基底 (APS-云母)^[15]。纯化的扩增产物稀释成约 10 ng/ μL , 取 3 μL 滴在洁净的疏水膜上, 将尺寸为 0.8 cm $\times$ 0.8 cm 的 APS-云母倒置加盖液滴, 静置 1 min, 吹干; 用双蒸水冲洗一遍, 吹干, 制成待测样品。

AFM, 美国 DI 公司(Multi-mode Scanning Probe Microscopy IIIa, Digital Instruments/Veeco, Inc., Santa Barbara, CA)。成像时, 样品温度在 20~30 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度控制在 30~35%, 使用 Mikromasch 的 NSC11 针尖(弹性系数为 48 N/m), 在空气中进行 TMAFM 高度成像。

2 结果

2.1 常规 PCR 产物和纳米粒子 PCR 产物的制备

按照§1.1 描述的条件, 制备常规 PCR 产物和纳米粒子 PCR 产物, 即优化的扩增体系添加 0.6 nmol/L 的 AuNPs, 此系优化的适宜浓度^[7-8]。通常的质粒模板数量为 0.05 pg—1 ng, 考虑后续纯化步骤, 本实验选择 0.5 ng/ μL 的 pBR322/pst I DNA Marker 作为起始模板量, 扩增长度为 886 bp 的 DNA 序列。结果如图 1 所示, 常规 PCR 产物(图 1a, 泳道 1—5)与纳米粒子 PCR 产物(图 1a, 泳道 6—10)均得到较理想扩增; 用软件进一步分析电泳结果, 常规 PCR 产物量的平均值为(63.34 $\pm$ 2.58) ng/5 μL (标准偏差, 下同); 纳米粒子 PCR 产物量的平均值是(66.83 $\pm$ 5.04) ng/5 μL , 常规 PCR 产物的产量略低于纳米粒子 PCR 产物, 这是由于 AuNPs 具有提高扩增产量的作用^[18], 结果见图 1b。

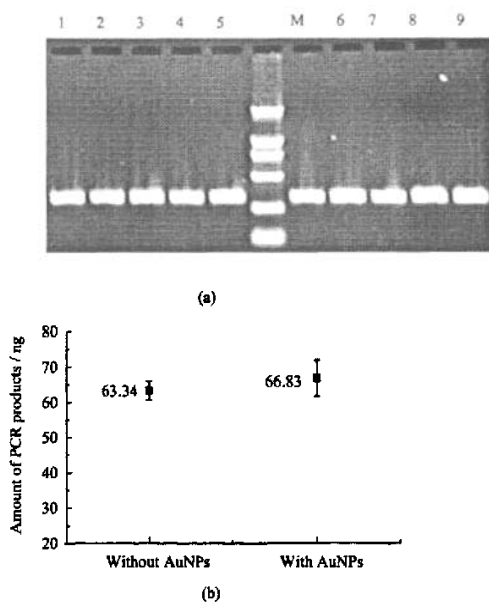


图 1 制备常规 PCR 和纳米金优化的 PCR 产物
(a) 常规扩增体系总体积为 25 μL , 模板 pBR322/pst I 的量为 0.5 ng/ μL , Taq DNA 聚合酶为 1.75 U, 与常规 PCR(泳道 1—5)不同之处在于, 纳米金优化的 PCR 反应中(泳道 6—10), 添加 0.6 nmol/L 的纳米金; M 是分子量标准 DL2000
(b) 对两种 PCR 过程的产物定量比较

Fig. 1 Preparation of DNA products in conventional PCR and Au nanoparticles assisted PCR

(a) The conventional PCR system (25 μL) (Lanes 1-5) contains 0.5 ng/ μL template of pBR322/pst I and 1.75 U Taq polymerases while Au nanoparticles assisted PCR process (Lanes 6-10) contains additional 0.6 nmol/L AuNPs. M is DNA Marker DL-2000.

(b) Comparison of amounts of DNA products between two kinds of PCR processes.

2.2 纳米粒子 PCR 产物纯化方法

按照上述扩增条件,制备系列 PCR 产物,用于纯化效率比较。当使纯化前后体积一致时,纯化效率是 DNA 纯化后与纯化前的电泳条带荧光强度的比值。实验以常规 PCR 产物经乙醇沉淀后的纯化效率作为参照,比较了 AuNPs 去除与否的纯化效率,还分析 AuNPs 沉淀中的 DNA 量。纯化流程如图 2a。其中 P1、P2 与 P3 分别表示途径 1、2、3(Pathway 1、2 与 3)。P1(C)为常规 PCR 产物的纯化过程,按§1.2 作乙醇纯化处理,即无水乙醇沉淀 DNA 和 70%乙醇漂洗 DNA,以去除残余的盐。P1(AuNPs)为纳米粒子 PCR 产物的纯化过程,按照与常规 PCR 产物相同的流程纯化纳米粒子 PCR 产物,此时 DNA 沉淀为黑红色;P2(AuNPs)为无水乙醇沉淀 DNA 前,增加一步高速离心,吸取上清液,之后的纯化流程同 P1;P3(AuNPs)的纳米粒子 PCR 产物为高速离心

的沉淀部分,主要是 AuNPs。图 2b 是对 3 批次样品(每批 3 个平行样)的统计结果。其中, P1(C)和 P2(AuNPs)纯化产物各有 1 个未见电泳条带,这应是吸取上清时搅起沉淀,使 DNA 完全损失所致,故统计时舍弃该结果。统计结果表明,常规 PCR 产物的乙醇纯化方法 P1(C)中, DNA 的纯化效率为 $84.52\% \pm 9.78\%$; P1(AuNPs)是按常规方法纯化纳米粒子 PCR 产物,纯化效率较高,达 $92.07\% \pm 3.81\%$,因为存在 AuNPs,在弃去上清时,操作误差较小,纯化效率的数据平行性也最好,但 AuNPs 的存在降低了扩增产物的纯度;增加高速离心步骤后的 P2(AuNPs),DNA 的纯化效率降为 $76.27\% \pm 7.18\%$,沉淀中没有可辨别的黑色物质;P3(AuNPs)中有 $4.81\% \pm 6.09\%$ 的 DNA 与 AuNPs 共沉淀。总体而言,该纯化步骤的改进对纳米粒子 PCR 产物纯化是有效的。

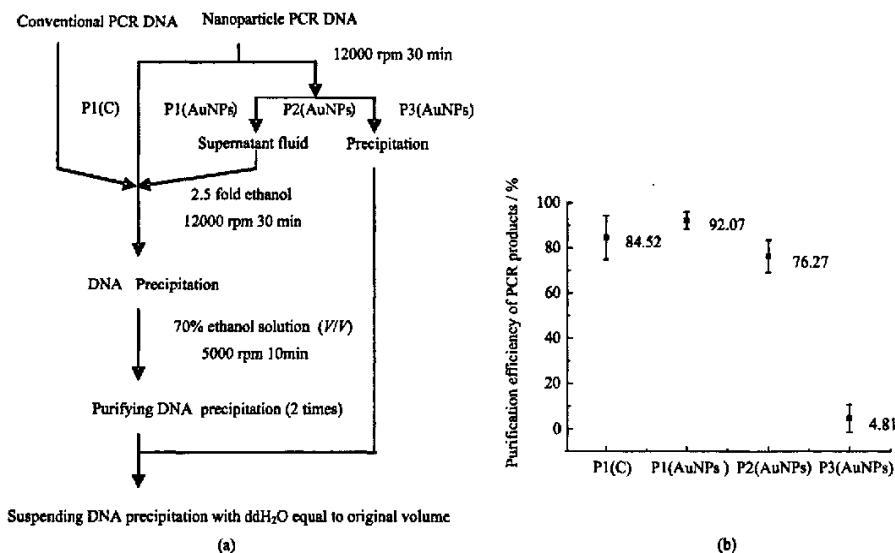


图 2 乙醇沉淀法纯化纳米粒子 PCR 产物

(a) PCR 产物乙醇沉淀纯化流程。P1 (C), 常规 PCR 产物纯化; P1 (AuNPs), 纳米粒子 PCR 产物常规纯化; P2 (AuNPs), 改进的纳米粒子 PCR 产物纯化方法; P3 (AuNPs) 获得与纳米金共沉淀的 DNA
(b) 各种 PCR 产物不同纯化方法效率比较

Fig. 2 Purification of DNA products in nanoparticle PCR by ethanol deposition

(a) The flow chart of purification of DNA products in PCR by ethanol deposition. P1 (C), DNA products purified from conventional PCR; P1 (AuNPs), products purified directly from nanoparticle PCR; P2 (AuNPs), a sample purified after eliminating AuNPs by 12000 rpm centrifugation; P3 (AuNPs), DNA products of co-precipitation with AuNPs.
(b) The comparison of purification efficiency.

2.3 纳米粒子 PCR 产物的 AFM 图像

按照§1.3 的制样方法,将不同纯化途径获得的纳米粒子 PCR 产物分别制备在 APS 修饰的云母表面,观察不同途径获得的 DNA 的形貌。图 3a 是按照 P1 纯化产物的 AFM 图像,其 DNA 自然吸附在 APS 云母表面,形态弯曲,其中白色亮点高度为 1~2

nm,但未见粒径约 10 nm 的 AuNPs。图 3b 是经 P2 高速离心去除 AuNPs 后 DNA 的 AFM 图像,多为舒展状态的线状结构,长度约为 270~330 nm,与理论上 886 bp DNA 片段的长度一致;高度约 0.4~0.5 nm,通常 APS 云母表面通过 TMAFM 测得的 DNA 高度在此范围。这表明 AuNPs 优化的 PCR 产物没

有发生可辨别的显著变化。图 3c 是纳米粒子 PCR 纯化步骤中的沉淀, 即按 P3 获得的 DNA, 其 AFM 图像上白色亮点明显增多。

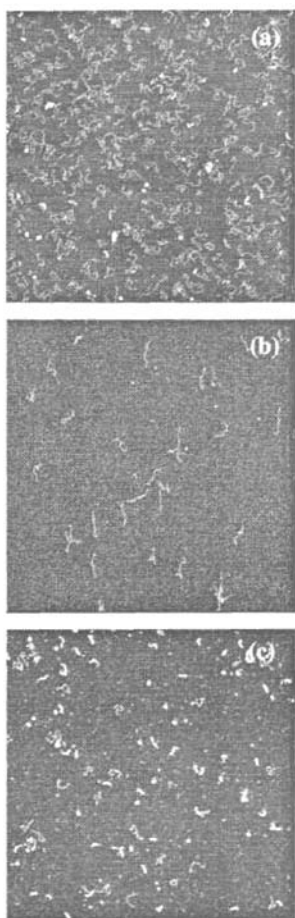


图 3 纳米粒子 PCR 产物的 TMAFM 图像

扫描范围 $3\mu\text{m}\times 3\mu\text{m}$, 高度尺度 2 nm

(a) P1 途经直接纯化纳米金 PCR 产物

(b) P2 途经去除纳米金后乙醇沉淀 PCR 产物

(c) P3 途径中与纳米金粒子共沉淀的 PCR 产物

Fig.3 TMAFM images of nanoparticle PCR products

Scan size: $3\mu\text{m}\times 3\mu\text{m}$; height scale: 2 nm

(a) DNA products purified directly from nanoparticle PCR (P1);
(b) a sample purified after eliminating AuNPs by 12000 rpm centrifugation (P2)

(c) DNA products of coprecipitation with AuNPs (P3)

3 讨论

前文提及, AuNPs 优化的 PCR 产物中会有微量红色沉淀, 为摒除 AuNPs 对扩增产物可能的影响, 须对纯化程序进行改进。Li H X^[10]研究 DNA 对 AuNPs 稳定性的影响时, 指出单链 DNA 可通过暴露的碱基与 AuNPs 结合, 从而增加其在高盐溶液中的稳定性, 而双链 DNA 不具有稳定 AuNPs 的作

用。因而可认为, 纳米粒子 PCR 产物经常规乙醇沉淀处理后出现的黑红色的沉淀物是 AuNPs 与 DNA 的混合物, 而非化学键合作用形成的复合物, 因此可分离 AuNPs 与 DNA。其次, AuNPs 易于聚集, 即使不增加分离步骤, 部分 AuNPs 也会沉至 PCR 管底, 此系 AuNPs 的比重高于溶液所致。但这种自然沉积并不彻底, 部分 AuNPs 仍会残留在溶液中, 若不提前分离, 势必会与乙醇沉淀的 DNA 混在一起, 故需高速离心处理。而双链 DNA 产物只有在乙醇作用下引起大量沉淀, 这一特性为有效分离 AuNPs 与 DNA 提供了可能。上述实验结果也验证了这种推测。

利用我们建立的纯化方法, 虽有 4.81% 的 DNA 与 AuNPs 共沉淀, 但绝大多数(76.27%)的 DNA 仍在上清液中。与常规 PCR 产物的纯化效率相比, 纯化纳米粒子 PCR 产物的效率有所降低, 但可有效地将 PCR 产物中的 AuNPs 去除, 可减少或消除对 DNA 后续反应的影响。所以, 从效率和纯度两方面考虑, 高速离心法适用于对纳米粒子 PCR 产物的纯化处理。AuNPs 对扩增具有优化作用^[7-8], 尤宜于一些非特异或产量较低的扩增体系的纳米粒子 PCR 应用及其后续产物纯化。

上述 AFM 图像中, 样品浓度、制样时吸附时间并不一致, 故不能以图中的 DNA 数量判定其浓度差异, 但它们的形貌当具有代表性。在不同样品处理条件下, AuNPs 均未与 DNA 共同吸附在 APS 云母表面。APS 云母表面制备 AuNPs 样品的浓度通常为 10 nmol/L, 纳米粒子 PCR 中 AuNPs 的浓度仅为 0.6 nmol/L, 而 PCR 产物的浓度又高达 20—50 ng/ μL (需稀释 2~5 倍, 方可获得分散较好的 DNA 分子), 因此, 在实际制样过程中, AuNPs 浓度低于 APS 云母表面吸附所需浓度, 不易观察到与 DNA 共吸附的 AuNPs。

另外, 基于 AFM 观察, 本文初步分析了 AuNPs 对 DNA 形貌的可能影响。图 3a 和图 3c 中的 AuNPs 含量相当, 但 DNA 含量差异较大, 前者存在大量的扩增产物, 后者去除了大量扩增产物。AuNPs 与 DNA 都带负电荷, 虽未与 DNA 共同吸附在 APS 云母表面, 但可能对溶液中 DNA 产生影响。AuNPs 浓度甚高于 DNA 时(图 3c), TMAFM 图像上白色亮点增多。乙醇沉淀和漂洗过程可去除 PCR 扩增体系的盐和其它杂质, 故这些白色颗粒并非杂质。它们的高度与 AuNPs 的 TMAFM 高度差异较大, 却与 AFM 操纵 DNA 时的卷曲状态相近^[20]。由此可推测该结构可能是卷曲的 DNA。然而, AuNPs 与 DNA 之间的相互作用, 有待进一步深入研究。

比较纳米粒子 PCR 产物乙醇纯化效率以及纳米粒子 PCR 产物的 AFM 图像, 可得出如下结论: (1)直接纯化纳米粒子 PCR 产物的纯化效率较高, 且不会对大量扩增产物造成影响, 但可能影响少量 DNA 的形貌; (2)欲在后续工作前除去 AuNPs, 可采用高速离心法, 此时少量 DNA 会共沉降, 使纯化效率略有损失。

本文从分析扩增产物的角度, 提出 AuNPs 不会改变大量扩增产物的形貌, 同时建立了从扩增体系去除 AuNPs 的简单方法, 为纳米粒子 PCR 在 DNA 检测方面更广泛应用提供了依据。

参考文献

- Schmidt M, Roth W K, Meyer H, *et al.* Transfusion, 2005, **45** (3): 399-403
- Pavlov A R, Belova G I, Kozyavkin S A, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 2002, **99** (21): 13510-13515
- Yang S-W, Astatke M, Potter J, *et al.* Nucleic Acids Res, 2002, **30**: 4314-4320
- Nagai M, Yoshida A, Sato N, *et al.* Biochem Mol Biol Int, 1998, **44** (1): 157-163
- Bachmann B, Luke W, Hunsmann G, *et al.* Nucleic Acids Res, 1990, **18** (5): 1309
- Hengen P N. Trends in Biochemicle Sciences, 1997, **22**: 225-226
- Li H K, Huang J H, Lv J H, *et al.* Angew Chem-Int Edit, 2005, **44**: 2-5
- Li M, Lin Y-C, Wu C-C, *et al.* Nucleic Acids Res, 2005, **33** (21): e184
- Patel H E, Das S K, Sundararajan T, *et al.* Appl Phys Lett, 2003, **83** (14): 2931-2933
- Li H X, Rothberg L. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, **101** (39): 14036-14039
- Mukhopadhyay K, Phadtare S, Vinod V P, *et al.* Langmuir, 2003, **19** (9): 3858-3863
- Zheng M, Davidson F, Huang X Y. J Am Chem Soc, 2003, **125** (26): 7790-7791
- Zheng M, Huang X Y. J Am Chem Soc, 2004, **126** (38): 12047-12054
- Engel A, Lyubchenko Y, Müller D, *et al.* Trends in cell biology, 1999, **9**: 77-79
- Hu J, Wang M, Weier H U G, *et al.* Langmuir, 1996, **12**: 1697-1700
- Rothmund P W K. Nature, 2006, **440**: 297-302
- Lü J H, Li H K, An H J, *et al.* J Am Chem Soc, 2004, **126**: 11136-11137
- 米丽娟, 朱红平, 张晓东等. 科学通报, 2007, **52**(8): 893-897
- Mi L J, Zhu H P, Zhang X D, *et al.* Chinese Science Bulletin, 2007, **52**(8): 893-897
- 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999, 66-67
- Lu S D. Protocols of modern molecular biology. Peking: Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College Press, 1999, 66-67
- 吕军鸿, 吴世英, 王国华, 等. 电子显微学报, 2003, **22**(3): 185-188
- LV Junhong, WU Shiyong, WANG Guohua, *et al.* J Chin Electr Microsc Soc, 2003, **22**(3): 185-188

Purification of nanoparticle PCR products and their topography observed with AFM

MI Lijuan^{1,2} LI Bin¹ ZHOU Hualan¹ WANG Hubin^{1,2} HU Jun¹

1(Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

2(Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Nanoparticle PCR (NP-PCR) is a new method to optimize PCR amplification. Suitable amount of Au nanoparticles can improve specificity, sensitivity and extension rate of PCR. In this paper, we compare efficiency of purifying NP-PCR products with different methods. In addition, topographies of DNA products in NP-PCR were observed with atomic force microscope (AFM). The results show that most of DNA products purified directly by routing method remain almost free due to less effect of nanoparticale. The yields decrease when the AuNPs were removed by high-speed centrifugation. A little amount of DNA subsided with AuNPs.

Key words PCR, Au nanoparticle, DNA Purification, AFM

CLC O6.05