

利用 MPprimer 设计引物并优化扩增条件以提高多重 PCR 效率的实验研究*

王稳^{1, 2)} 屈武斌¹⁾ 申志勇¹⁾ 任长虹¹⁾ 刘虎岐^{2)**} 张成岗^{1, 2)**}

¹⁾ 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 蛋白质组学国家重点实验室, 医学神经生物学国家重点实验室, 北京 100850;

²⁾ 西北农林科技大学生命科学院, 杨凌 712100)

摘要 多重 PCR 技术广泛应用于多个研究领域, 其中引物设计及扩增条件是多重 PCR 实验效率的关键因素。为探讨优化多重 PCR 实验的方法, 以小鼠 5 个看家基因为研究对象, 使用实验室新近开发的 MPprimer 程序设计多重 PCR 引物, 并通过改变多种反应条件来优化多重 PCR 实验。结果表明, MPprimer 程序能够设计出理想的多重 PCR 引物, 并且通过对退火温度及延伸时间进行优化, 可显著提高多重 PCR 实验效率, 对于提高基因表达的规模化检测能力具有积极的促进作用。

关键词 PCR, 多重 PCR, 引物设计, MPprimer

学科分类号 Q52

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00552

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术是目前广为使用的分子生物学技术, 并进而衍生出多种类型的相关技术, 包括差异显示 PCR、实时定量 PCR、巢式 PCR、多重 PCR 和不对称 PCR 等^[1], 其中多重 PCR(Multiplex PCR)早在 1988 年就被用来快速检测人杜氏肌营养不良相关基因外显子的缺失情况^[2], 可大幅度提高 PCR 效率。同时, 这种通过在同一 PCR 反应体系里提供两对或两对以上引物、能够同时扩增出多个核酸片段的 PCR 技术以其简便、高效、灵敏的突出优势已被广泛用于动物疫病诊断^[3]、植物病虫害检测^[4]、食品病原微生物检测^[5]等研究领域。然而, 正是由于多重 PCR 技术是在反应过程中添加多对引物, 必然会增加引物设计的难度以及针对不同扩增产物的最佳退火温度、延伸时间、循环次数等诸多复杂因素的“众口难调”而极易导致非特异性扩增反应的发生, 从而导致多重 PCR 的实用性受到影响^[6]。其中, 多重 PCR 引物设计是一个关键环节^[7], 因此, 如能在引物设计这一关键环节避免非特异扩增反应的发生, 那么就有可能显著提高多重 PCR 实验效率。基于本实验室新近设计完成的多重 PCR 引物设计系统 MPprimer (<http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer/>) 和多因素引物特异性评估系统 MFEprimer (<http://biocompute.bmi.ac.cn/MFEprimer/>)^[8],

本研究以小鼠的 5 个看家基因为对象, 重点介绍多重 PCR 引物设计程序 MPprimer 的使用以及多重 PCR 实验中的一些优化方案, 旨在为提高多重 PCR 效率提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级成年雄性 C57BL/6J 小鼠(购自军事医学科学院实验动物中心)。

1.2 主要试剂

TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司; DEPC 购自 Sigma 公司; DNase I 购自 Promega 公司; 琼脂糖购自 Genetech 公司; ExTaq 酶、DNA Marker DL2000、dNTP Mixture 均为 TaKaRa 公司产品; 反转录试剂盒为 ToYoBo 公司产品; 水饱和酚购自北京博迈德科技发展有限公司; 糖原购自上海生物

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2006CB504100), 国家科技重大专项课题(2009ZX09503-002, 2009ZX09301-002), 国家自然科学基金(30800196, 30772293, 30600365)和医学神经生物学国家重点实验室开放课题(09-02)。

** 通讯联系人。

刘虎岐. Tel: 029-87092262, E-mail: liuhuqi@yahoo.com.cn

张成岗. Tel: 010-66931590, Fax: 010-68169574

E-mail: zhangcg@bmi.ac.cn

收稿日期: 2009-09-20, 接受日期: 2009-12-21

工程有限公司; GoldView™ 核酸染料为北京赛百盛基因技术有限公司产品; 氯仿、异戊醇、无水乙醇、75%乙醇均为国产分析纯试剂。

1.3 引物设计

选取小鼠 5 个管家基因(β -actin, B2m, Pgl1, GAPDH, Rpl13a)进行测试。从 GenBank 数据库下载其 cDNA 序列(GenBank 序列号分别是: NM_007393, NM_009735, NM_008828, NM_008084, NM_009438), 在 MPprimer 系统中进行引物设计。所有引物均由 Invitrogen 公司合成。

1.4 总 RNA 的提取及反转录

采用 TRIzol 试剂提取小鼠皮层组织总 RNA。采用 ToYoBo 公司的反转录试剂盒, 以提取的总 RNA 为模板, 反转录出 cDNA 一链, 具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。反转录体系如下: a. RNase Free H₂O 7 μ l, 25 μ mol/L 随机引物 1 μ l, 10 μ mol/L Oligo(dT)₂₀ 1 μ l, 总 RNA 3 μ l, 混匀后, 65°C \times 5 min, 然后立即置于冰上。b. 加入 5 \times RT 缓冲液 4 μ l, dNTP 混合液(各 10 mmol/L) 2 μ l, 10 U/ μ l RNase 抑制剂 1 μ l, 反转录酶 1 μ l。混匀后按以下条件进行反转录: 30°C \times 10 min \rightarrow 42°C \times 30 min \rightarrow 85°C \times 5 min \rightarrow 4°C 停止。瞬时离心后, -20°C 保存。

1.5 多重 PCR

实验中分别采用五重、四重、三重、二重和单对引物 PCR, 其中单对引物 PCR 为 12.5 μ l 反应体系, 不同类型的多重 PCR 反应按比例混合均匀各引物对后, 使用相同的反应体系进行实验。反应条件为: 94°C 预变性 5.5 min; 然后 94°C \times 30 s \rightarrow 58°C \times 45 s \rightarrow 72°C \times 50 s, 36 个循环后 72°C 延伸 5 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测, 具体为

将 PCR 产物(20 μ l)与 6 \times 加样缓冲液(4 μ l)混匀后, 加入含 GoldView™ 核酸染料(0.05 ml/L)的 1.5% 琼脂糖凝胶中, 稳压 100 V, 电泳 60 min。用凝胶成像分析系统将电泳后的琼脂糖凝胶拍照并保存图像。

2 结 果

2.1 使用 MPprimer 设计多重 PCR 引物

进入 MPprimer 网站主页(<http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer/>), 然后将 5 个小鼠基因的 cDNA 序列输入序列框。为便于区分扩增产物的电泳条带, 分别限定 5 个扩增片段长度范围(101~200、201~300、400~520、650~720、851~1 000)以及引物长度参数(Min: 20、Opt: 25、Max: 30), 其余为默认选项。MPprimer 自动生成多个候选引物对组合供实验选择使用。本实验选用结果清单中的 2 号引物对组合(表 1), 点击后显示各引物序列的具体信息(包括 T_m 值、产物长度、各引物罚分值等, 图 1a), 同时 MPprimer 提供 4 种浓度(0.5%、

Table 1 Primer sequences and target genes used in this study

Gene	Primer sequence(5' \rightarrow 3')	Amplicon size/bp
Rpl13a	Forward: ACGGAAGGAAAAGGCCAAGATGCAC Reverse: ATTGGGTTACACCAGGAGTCCGTT	143
GAPDH	Forward: AGCCTCGTCCCGTAGACAAAATGGT Reverse: AGATGGTGATGGGCTTCCCGTTGAT	243
Pgl1	Forward: CGGTGTTGCCAAAATGTCGCTTTCC Reverse: GGCCGGCTCAGCTTTAACCTTGTTT	448
B2m	Forward: ACCGGAGAATGGGAAGCCGAACATA Reverse: ACAGGGTTGGGGGTGAGAATTGCTA	665
β -Actin	Forward: GAGCACAGCTTCTTTCAGCTCCTT Reverse: TCCTGTCAGCAATGCCTGGGTACAT	994

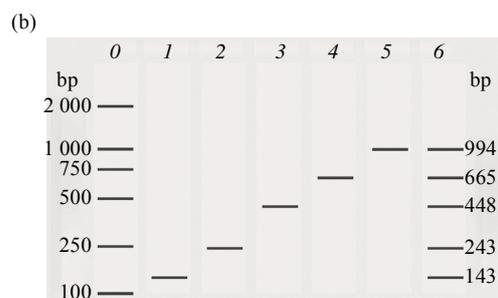
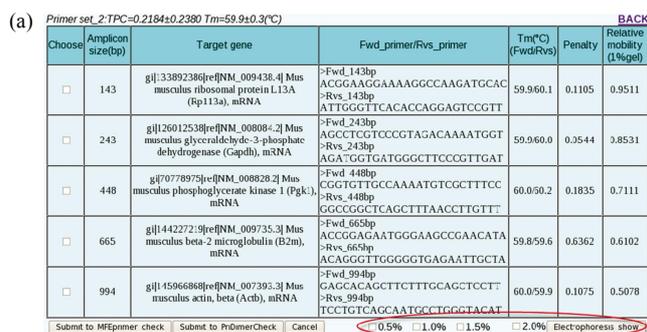


Fig. 1 Results of primer set and virtual electrophoresis from MPprimer

(a) The specific information of primer set including primer sequences, amplicons size, T_m , penalty and relative mobility. (b) The 1.5% virtual electrophoresis of five target products.

1.0%、1.5%、2.0%)的虚拟琼脂糖凝胶电泳图谱,方便用户在实际实验前对电泳结果具有直观印象.选择相应浓度值后提交 MPprimer 软件分析,便可得到虚拟电泳结果(图 1b).

以上 5 对引物提交 MFEprimer 软件(参数设定: word size 为 7, E-value 为 1000, 选用小鼠 RefSeq 数据库)进行引物特异性核查, 均未发现非特异性扩增.

2.2 多重 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

为了系统摸索 PCR 实验条件, 我们首先用针对 5 个基因的 5 对引物分别做了单对引物 PCR. 由于在设计引物时 MPprimer 系统会尽可能将各对引物的 T_m 值设定在 60℃ 左右, 因此在进行单对引物 PCR 时利用梯度 PCR 技术, 以(60±2)℃ 为限进行退火温度的摸索(限于篇幅, 细节未提供). 最终确定了适合各对引物的最佳退火温度为 58℃, 此时各引物对均能很好地扩增出期望长度的目的片段, 而且无非特异扩增条带出现(图 2).

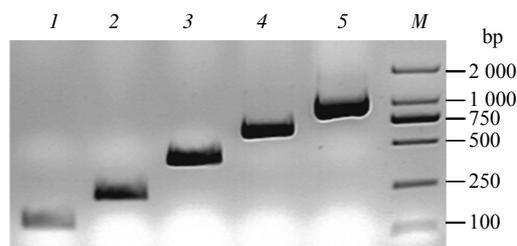


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of single PCR products
1: Rpl13a (143 bp); 2: GAPDH (243 bp); 3: Pgk1 (448 bp); 4: B2m (665 bp); 5: β -Actin (994 bp); M: DNA marker DL2000.

在确定单对引物 PCR 能够正常工作的基础上, 我们进行了多重 PCR(含两对及两对以上引物)实验, 结果显示各种多重 PCR 反应均能特异性地扩增出期望长度的目的片段. 为了更直观地显示几组不同类型多重 PCR 的效果, 针对凝胶电泳的上样顺序按照字母“P”、“C”、“R”的形状进行排列, 如图 3 所示, 左起泳道为 DNA marker DL2000, 第 1、7 泳道为五重 PCR 的结果, 第 9

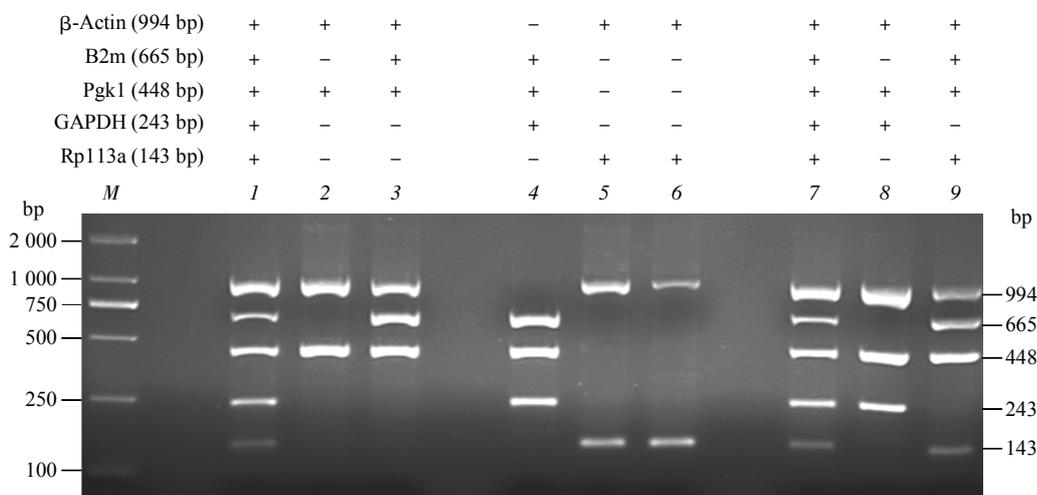


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of different multiplex PCR products

泳道为四重 PCR 的结果, 第 3、4、8 泳道为三重 PCR 的结果, 第 2、5、6 泳道为二重 PCR 的结果. 从电泳图谱可以清晰地看到目的电泳条带, 并且没有非特异性扩增. 另外, 以三重 PCR 为例, 不论是哪三种引物对的组合, 均可得到理想结果. 如图 3 所示, 3 号泳道显示的是 β -Actin、B2m、Pgk1 的组合, 4 号泳道显示的是 B2m、Pgk1、GAPDH 的组合, 8 号泳道显示的是 β -Actin、Pgk1、GAPDH 的组合. 这也说明由 MPprimer 设

计的五重 PCR 中的 5 对引物可以兼容任意引物对的组合.

3 讨 论

多重 PCR 的反应原理、反应试剂和操作过程与常规普通 PCR 相同, 但多重 PCR 在反应过程中显然比单对引物 PCR 更复杂. 根据我们的研究经验, 在进行多重 PCR 实验之前, 需要考虑诸多因素对结果的影响.

首先, 高质量的多重 PCR 引物设计是关键. 针对目前尚缺乏简单实用的多重 PCR 引物设计软件现状, 本研究所使用的 5 对引物均是用实验室新近开发完成的 MPprimer 软件设计完成. 在多重 PCR 引物设计时, 除考虑单对引物的 T_m 值、GC 含量、 ΔG 和引物是否特异等因素^[9]外, 还需要确保这些引物对之间有相近的 T_m 值, 例如本研究中所选 5 对引物的 T_m 值都在 60℃ 左右, 这为后续在 58℃ 的同一退火温度下同时扩增所有目的片段奠定了基础, 而 MPprimer 系统在给出候选引物对时兼顾了所有这些因素, 使用起来十分便捷. 同时, 在设计多重引物时还要考虑各个扩增产物的长度, 因为适度的电泳迁移率能够很方便地在电泳图谱上区分各个目的条带. MPprimer 系统提供对各个扩增产物长度的设定, 用户可以自行设定. 本研究分别对 5 个扩增产物的大小进行了限定, 如图 3 的 1 号泳道所示, 5 个扩增产物能够很清晰地用肉眼辨认出来. 当引物设计完成时, 还需对各个引物对的特异性进行严格地核查. 本研究利用实验室开发的引物特异性核查系统 MFEprimer 对 5 对引物的特异性进行了评估, 均未发现存在非特异性扩增, 为后续实验的成功奠定了重要基础.

其次, 在多重 PCR 的实际操作过程中, 建议重点优化反应的退火温度及延伸时间, 可使用梯度 PCR 技术摸索出最佳的退火温度. 本研究经过摸索, 对各种组合的多重 PCR 均采用了 58℃ 的同一退火温度和 72℃ × 50 s 的延伸时间, 得到了理想的扩增片段.

全面考虑各种影响多重 PCR 的因素后, 多重 PCR 相对于常规普通 PCR 的优势就十分明显. 多重 PCR 不仅保留了一般 PCR 的高敏感性和特异性, 而且一次反应可检出多个目的基因, 可显著提高检测效率. 例如在食品安全检测中, 往往需要使用多重 PCR 技术来同时检测食品中可能存在的多种病原微生物. 肖勇等^[10]将多重 PCR 技术用于公共卫生突发事件食源性病原菌的快速检测. 陈静等^[11]将多重 PCR 技术用于线粒体突变聋病的临床检测, 同样收到了良好的效果. 此外, 如果在多重 PCR 中引入内参照后, 能够更真实地对所检测基因的相对表达情况进行定量, 这比目前很多实验室采用的将目的基因与内参照基因分开进行 PCR、然后电泳的方法更能准确地反映目的基因的相对表达丰度. 显然, 多重 PCR 的定量也将成为未来发展的方向, 对于相对准确地评估基因表达谱具有重

要意义.

随着多重 PCR 技术的不断推广与成熟, 多重 PCR 技术将不仅仅停留在目前仅检测少数几个基因表达这一层次. 基于 MPprimer 的引物设计以及优化的反应条件, 有望使多重 PCR 技术达到与小规模基因芯片同样的效果, 能够同时且快速检测一批基因的表达情况, 这将会大幅度节约芯片检测的成本, 并将真正提高多重 PCR 实验的效率.

参 考 文 献

- [1] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W, 著. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 597-701
Sambrook J, Russell D W, *et al.* Translated by Huang P T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. Beijing: Science Press, 2002: 597-701
- [2] Chamberlain J S, Gibbs R A, Ranier J E, *et al.* Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus *via* multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*, 1988, **16**(23): 11141-11156
- [3] Chaharaein B, Omar A R, Aini I, *et al.* Detection of H5, H7 and H9 subtypes of avian influenza viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *Microbiol Res*, 2009, **164**(2): 174-179
- [4] Olufemi J A, Kumar P L, Naidu R A. Multiplex PCR for the detection of African cassava mosaic virus and East African cassava mosaic Cameroon virus in cassava. *J Virol Methods*, 2008, **154**(1): 111-120
- [5] Del R B, Binetti A G, Martin M C, *et al.* Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiol*, 2007, **24**(1): 75-81
- [6] 黄银花, 胡晓湘, 徐慰倬, 等. 影响多重 PCR 扩增效果的因素. 遗传, 2003, **25**(1): 65-68
Huang Y H, Hu X X, Xu W Z, *et al.* *Hereditas*, 2003, **25**(1): 65-68
- [7] Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, *et al.* Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 1997, **23**(3): 504-511
- [8] Qu W B, Shen Z Y, Zhao D S, *et al.* MFEprimer: multiple factor evaluation of the specificity of PCR primers. *Bioinformatics*, 2009, **25**(2): 276-278
- [9] Schoske R, Vallone P M, Ruitberg C M, *et al.* Multiplex PCR design strategy used for the simultaneous amplification of 10 Y chromosome short tandem repeat (STR) loci. *Anal Bioanal Chem*, 2003, **375**(3): 333-343
- [10] 肖勇, 吴家林, 凌霞, 等. 沙门菌、志贺菌、副溶血性弧菌多重 PCR 检测方法的研究. 微生物学杂志, 2009, **29**(2): 101-105
Xiao Y, Wu J L, Ling X, *et al.* *J Microbiol*, 2009, **29**(2): 101-105
- [11] 陈静, 程祖建, 欧启水. 多重 PCR 诊断线粒体突变聋病的临床应用价值. 中国实验诊断学, 2008, **12**(3): 355-358
Chen J, Cheng Z J, Ou Q S. *Chin J Lab Diagn*, 2008, **12**(3): 355-358

Improvement of Multiplex PCR Efficiency by Using The MPprimer to Design Primers and Optimizing The Amplification Conditions*

WANG Wen^{1,2)}, QU Wu-Bin¹⁾, SHEN Zhi-Yong¹⁾, REN Chang-Hong¹⁾, LIU Hu-Qi^{2)**}, ZHANG Cheng-Gang^{1,2)**}

¹⁾ Beijing Institute of Radiation Medicine, State Key Laboratory of Proteomics, State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Beijing 100850, China;

²⁾ The College of Life Science, Northwest Agriculture and Forest University, Yangling 712100, China)

Abstract Multiplex PCR was used in many biological fields. Primer design and amplification conditions are critical for enhancing the efficiency of multiplex PCR. In order to improve the multiplex PCR assay, five house-keeping genes of mouse were selected to design primers for multiplex PCR analysis by using the MPprimer program, followed with optimizing the conditions for PCR reactions. Result showed that MPprimer is a valuable tool for multiplex PCR primer design. In addition, by optimizing the conditions for multiplex PCR such as the annealing temperature and extension time, the efficiency of multiplex PCR assay could be significantly improved. This work can be used to advance large-scale gene expression analysis in the post-genome era.

Key words PCR, Multiplex PCR, primer design, MPprimer

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00552

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2006CB504100), Special Key Programs for Science and Technology of China (2009ZX09503-002, 2009ZX09301-002), The National Natural Science Foundation of China (30800196, 30772293, 30600365) and The General Program of State Key Laboratory of Medical Neurobiology (09-02).

**Corresponding author.

LIU Hu-Qi. Tel: 86-29-87092262, E-mail: liuhuqi@yahoo.com.cn

ZHANG Cheng-Gang. Tel: 86-10-66931590, Fax: 86-10-68169574, E-mail: zhangcg@bmi.ac.cn

Received: September 20, 2009 Accepted: December 21, 2009