

纳米基因扩增技术及其应用

桑付明* 李鑫 刘佳

(哈尔滨工业大学(威海)海洋科学与技术学院,威海 264209)

摘 要 聚合酶链式反应(PCR)是 20 世纪 80 年代中期发展起来的一种应用广泛的体外 DNA 扩增技术,但目前该技术仍然存在着一些问题,如特异性差、灵敏度低和假阳性等。近年来,随着纳米科技的发展,一些纳米粒子如金属纳米粒子、碳纳米材料、量子点和纳米金属氧化物等被引入到 PCR 反应体系中,即纳米基因扩增技术(NanoPCR)。该技术大幅度提高了 PCR 的扩增效率、选择性、灵敏度和特异性,推动了生物学技术的发展,具有非常重要的理论意义和应用价值。本文综述了近年来纳米基因扩增技术的主要研究进展、反应机理,并探讨了其应用研究。

关键词 纳米基因扩增技术; 纳米材料; 特异性; 扩增效率; 热启动; 评述

1 引言

聚合酶链式反应(PCR)是美国的 Mullis 于 1985 年提出的可以在体外进行特定 DNA 复制的技术^[1]。PCR 技术操作简单省时,可将微量的目的基因片段在短时间内扩增到数百万倍,已广泛用于基因克隆^[2]、DNA 测序^[3]、基因分析^[4]、基因芯片^[5]及法医学^[6]等领域。尽管 PCR 技术发展已经很成熟,但在实际操作中,始终存在一些问题,如假阴性、假阳性、产物特异性差、扩增效率低甚至不扩增,以及富含 GC 碱基对的 DNA 很难通过 PCR 扩增得到产物^[7]等情况,限制了 PCR 技术的进一步发展及其更广泛的应用,因此如何提高 PCR 技术的特异性、灵敏度及稳定性至关重要^[8]。目前,采用较多的方法是使用 PCR 增效剂,如二甲亚砜(DMSO)、甘油、甲酰胺和甜菜碱等^[9~11]。这些增效剂有利于减少 DNA 的二级结构并降低 GC 富集区的熔点及解链温度,有助于模板完全变性,促进模板与引物的特异性结合,因此在一定程度上提高了 PCR 的扩增效率和特异性,但其扩增结果仍然不理想,未完全解决 PCR 中存在的上述难题。

近年来,纳米材料由于其独特的化学、物理特性,例如大的比表面积、小尺寸效应等,受到研究者的广泛关注,并逐步渗透到生命领域,推动了生命科学技术的发展。一些纳米材料如纳米金^[12]、量子点(Quantum dots, QDs)^[13]、碳纳米管^[14]等被应用到 PCR 扩增中,形成了纳米基因扩增技术(NanoPCR)。该技术显著地提高了 PCR 的特异性、扩增效率及灵敏度,并加快了 PCR 反应进程,已成为当前的研究热点。本文主要从各种纳米材料对 PCR 扩增技术的影响、机理探讨及其应用 3 个方面分别进行概述。

2 纳米材料对 PCR 扩增体系的影响

纳米材料晶粒极小,比表面积大,因而具有许多特殊的性质,如表面效应、量子效应等,但不同的纳米材料又有不同的特性,如水溶性、生物相容性及热稳定性等^[15],因此对 PCR 体系的影响也不相同。

2.1 纳米金对 PCR 体系的影响

Li 等^[12]首先用柠檬酸钠为稳定剂制备粒径为 10 nm 的纳米金,作为 PCR 增效剂进行实验。当纳米金浓度为 0.4 ~ 0.8 nmol/L 时,提高了两轮再扩增体系的特异性,明显抑制了非特异性片段的扩增(图 1)。但当纳米金浓度超过 1.0 nmol/L 时,过量的纳米金对 PCR 产生抑制作用。另外,即使在较低的退火温度(25 ~ 40℃)下,PCR 扩增特异性仍然非常高,即纳米金拓宽了 PCR 的退火温度。随后, Pan 等^[16]以多轮 PCR 为研究体系,发现加入纳米金后,经过六轮扩增,仍然可得到特异性强的目标条带,而

2017-02-17 收稿; 2017-09-04 接受

本文系国家自然科学基金(No. 21407035)、山东省自然科学基金(No. ZR2014BM021)和威海市大学共建项目(No. 2014XGJ15)资助

* E-mail: sangfuming@hitwh.edu.cn

普通 PCR 体系(未加入纳米金)扩增到第四轮时就不能得到目标条带,这进一步证实了纳米金可以提高 PCR 扩增的特异性。Vu 等^[17]以多重 PCR 为研究体系,研究纳米金对 PCR 扩增的影响。他们认为纳米金不能直接提高 PCR 特异性,而是更有利于体系中小片段 DNA 的扩增,对大片段 DNA 的扩增起抑制作用;另外,他们推测 AuNPs 的这种作用源于其良好的表面效应而非热传导效应,且纳米金与 DNA 聚合酶吸附作用更强,导致体系中聚合酶的实际浓度降低,促进了小片段的扩增。

Li 等^[18]研究了 0.7 nmol/L 纳米金(13 nm)对 PCR 扩增的影响,发现纳米金可以显著提高 PCR 扩增效率,缩短反应时间。他们对不同的 PCR 体系、不同 DNA 聚合酶及不同长度的 DNA 片段分别进行研究,发现对于普通 PCR,其灵敏度可以提高 5~10 倍,而对于实时定量 PCR,至少可以提高 10^4 倍。Li 等^[18]将纳米金的这些作用归于其良好的热传导性,可以有效改善 PCR 体系的升降温速率。纳米金有助于双链 DNA 的解链,利用这一点,Yang 等^[19]研究发现,加入纳米金可以促进高 GC 模板 GNAS1 启动子区域(~84% GC)的扩增。Girilal 等^[20]则从生物合成的角度出发,用嗜热脂肪土芽孢杆菌的无细胞提取物来合成纳米金。该方法合成的纳米金具有良好的热传导效应和热稳定性,可以缩短 PCR 的反应时间,提高其特异性、扩增效率。

不同表面修饰的纳米金与 PCR 组分的相互作用不同,因而其对 PCR 的影响也不同。Cao 等^[21]研究发现聚酰胺胺(PAMAM)树状大分子(G5-NH₂)可以提高 PCR 的特异性,随后 Chen 等^[22]采用氨基末端聚酰胺胺(PAMAM)树状大分子(G5-NH₂)包裹纳米金(Au-DENPs),并将其应用到 PCR 体系中。研究结果表明,Au-DENPs 能够有效地提高 PCR 的特异性及扩增效率。当 Au 原子与 G5-NH₂ 摩尔比例为 100:1 时,检出限可达 0.37 nmol/L。作者认为包含有纳米金的树形大分子可以保持 3D 球形形态,能更好地与 PCR 组分进行相互作用。该课题组^[23]还进一步探究不同末端聚酰胺胺(PAMAM)树状大分子(G5-NH₂)包裹纳米金(Au-DENPs)对于 PCR 体系的影响,发现氨基和羟基末端修饰的纳米金更加有效,所需浓度最低。

2.2 量子点对 PCR 反应的影响

量子点作为一种新型荧光无机纳米材料,具有发光波长可调性、发光效率高和发光峰窄等特点,受到广泛关注,例如单分子检测、细胞成像、肿瘤靶向和诊断等应用^[24]。另外,量子点具有优异的理化性质及生物相容性,被用于 PCR 扩增中,包括巯基乙酸修饰 CdTe 量子点和巯基乙酸修饰的 CdSe 以及 CdSe/ZnS 量子点等^[25~27]。

Wang 等^[25]考察了在不同退火温度和不同长度模板 DNA 条件下,羧基修饰的 CdTe 量子点对 PCR 体系特异性的影响。通过与纳米金结果对比发现,量子点可以显著提高 PCR 体系的特异性,但当 CdTe 量子点浓度超过最佳浓度时会产生抑制作用。特别对于短 DNA 片段,量子点的效果更加显著。和纳米金类似,采用量子点的 PCR 体系,在退火温度范围为 30~45℃ 时仍可得到特异性强的扩增产物。

Ma 等^[26]采用巯基乙酸修饰量子点,发现在低退火温度下(25~45℃),仍可大幅度提高 PCR 体系产率和特异性。通过对不同表面修饰的量子点的研究,他们指出,量子点提高 PCR 特异性的原因是基于量子点核自身结构与 DNA 聚合酶作用,而不是其表面状态。Liang 等^[27]以多重 PCR 为研究模板,采用粒径 4.5 nm 的 CdTe QDs 进行研究,证实 QDs 可以减少多重 PCR 体系中非特异性的扩增,因而显著

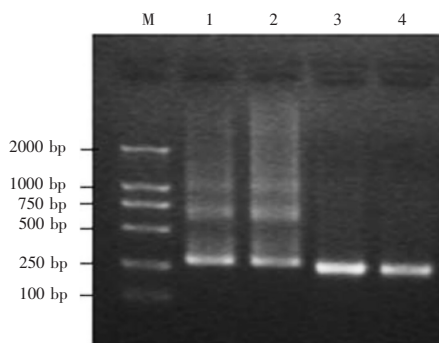


图1 纳米金(0.4 nmol/L, 10 nm)对 PCR 特异性的影响。 λ -DNA 为模板,目标片段长度 283 bp。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。M: maker。泳道 1 和泳道 2: 无纳米金的 PCR 结果;泳道 3 和泳道 4: 添加纳米金的 PCR 结果^[12]

Fig. 1 Effect of gold nanoparticles (10-nm AuNPs, 0.4 nmol/L) on the specificity of polymerase chain reaction (PCR). PCR was performed by employing a 283-bp target sequence from a λ -DNA template, and PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis (1.5%). Lane M is marker; lanes 1 and 2 show the results of PCR performed in the absence of AuNPs; lanes 3 and 4 show the results of PCR performed with AuNPs. bp = base pair^[12]

提高扩增的特异性,进一步证实了以前的研究结果。本课题组的研究发现,量子点可以加快 PCR 的扩增速率,将扩增时间由 143 min 降到 46 min^[28]。

热启动 PCR 是实现可重复性好、灵敏度高、特异性强的基因扩增的一种非常重要的技术。该技术利用各种物理、化学方法控制 PCR 反应的必须组分,如 DNA 聚合酶和 Mg^{2+} 等来影响 PCR 的进行,从而有效的抑制非特异性产物以及引物二聚体的形成,提高引物和模板结合的效率。目前应用广泛的是商品化的热启动酶,但其价格昂贵,不适合大量实际样本的常规检测。最近,本课题组发现,量子点可以动态调控常规 PCR 中高保真聚合酶(Pfu 酶)的活性,实现类似“热启动”的高效 DNA 体外复制过程^[29]。加入了量子点的 PCR 反应体系在 50℃ 分别温育不同时间(0~1 h),仍然得到特异性的扩增,且结果可以与商品化的热启动酶相媲美,而对照(未加量子点)实验则出现了大量非特异性扩增片段(如图 2)。

随后,本研究组将该技术应用于荧光定量 PCR,构建了基于量子点的高通量荧光定量 PCR 体系^[30]。分别以质粒 DNA 和 PCR 产物为模板,PCR 反应液在 50℃ 温育 1 h,即使是在再轮扩增体系中,仍得到特异性强的扩增(图 3),而对照实验得到的都是二聚体以及非特异性扩增。实验中还发现,CdTe 量子点对基于高保真聚合酶的 PCR 体系效果明显,而普通 Taq 聚合酶则没有明显效果。实验初步证实了量子点与普通 Taq 聚合酶的非特异性吸附相互作用弱于其与高保真聚合酶之间的作用,所以对于普通 Taq 聚合酶没有明显效果。在低温下量子点和聚合酶结合从而降低酶的活性,抑制了非特异性片段的扩增;在高温时,二者分离,聚合酶的活性恢复,因而量子点起到了很好的热启动效果。不过考虑到 PCR 体系的复杂性,量子点影响 PCR 的机理还有待进一步的探究。相对于其它热启动技术,该技术具有简单、成本低、重复性好、普适性好、易于推广等优点,可以应用于大量实际样品的高通量扩增。

2.3 碳纳米管对 PCR 反应体系的影响

碳纳米管具有导电性好、比表面强度高、机械强度高^[31]、韧性高等优点,广泛的应用于生物传感器、DNA 纳米科技等方面,且该材料具有良好的表面性能和高热传导效率,因而碳纳米管在 PCR 扩增中也得到较多的应用。

Cui 等^[32]首先提出单壁碳纳米管(SWNTS)可以提高 PCR 的产率,但其浓度超过 3 $\mu\text{g/mL}$ 时反而会起抑制作用。此外,研究还发现,即使没有 Mg^{2+} ,SWNTS 可以替代 Mg^{2+} 的作用,保证 DNA 聚合酶的正常催化聚合活性。

为了满足实验分析需要,DNA 样品通常需要重复扩增多次。在实际 PCR 操作中,也会采用上一轮扩增的结果来作为下一轮扩增的模板 DNA,因此当遇到 DNA 扩增效果不好、产率低的现象,便会导致重复扩增次数增加,产物特异性降低。基于这样的考虑,Zhang 等^[33]提出碳纳米管的悬浮体有助于这样的重复 PCR 扩增以及长片段 PCR 扩增。实验结果表明,当体系加入碳纳米管后,PCR 进行到第六轮扩增后仍可得到目标产物,同时还发现,该粒子还可提高长片段 PCR 的扩增效率。Zhang 等^[34]以长度为 14.3 kb 的长 DNA 片段作为模板,发现 0.8~1.6 mg/mL 多壁碳纳米管(MWCNTs)可以提高 PCR

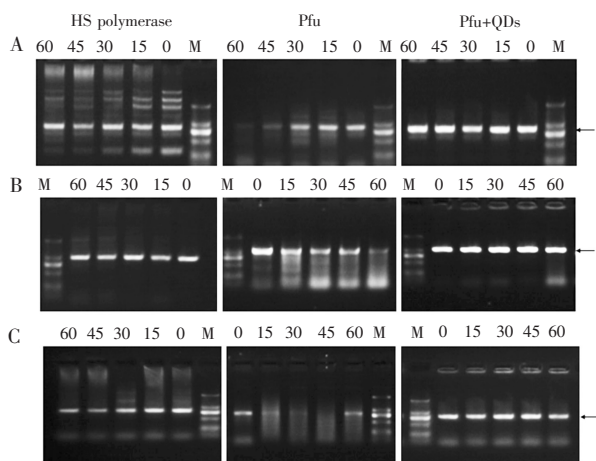


图 2 基于量子点的热启动及其与热启动酶结果的对比。PCR 体系在 50℃ 下分别预温浴不同时间(0~1 h); 引物分别为 (A) B9-10; (B) B17-18; (C) A99-100; 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。M: MW DL2000^[29]。

Fig. 2 Confirmation of hot-start (HS) effects by three pairs of primers with three test models after incubation for different time (0~1 h). (A) B9-10; (B) B17-18; and (C) A99-100. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis (1.2%). Lane M: MW DL2000^[29].

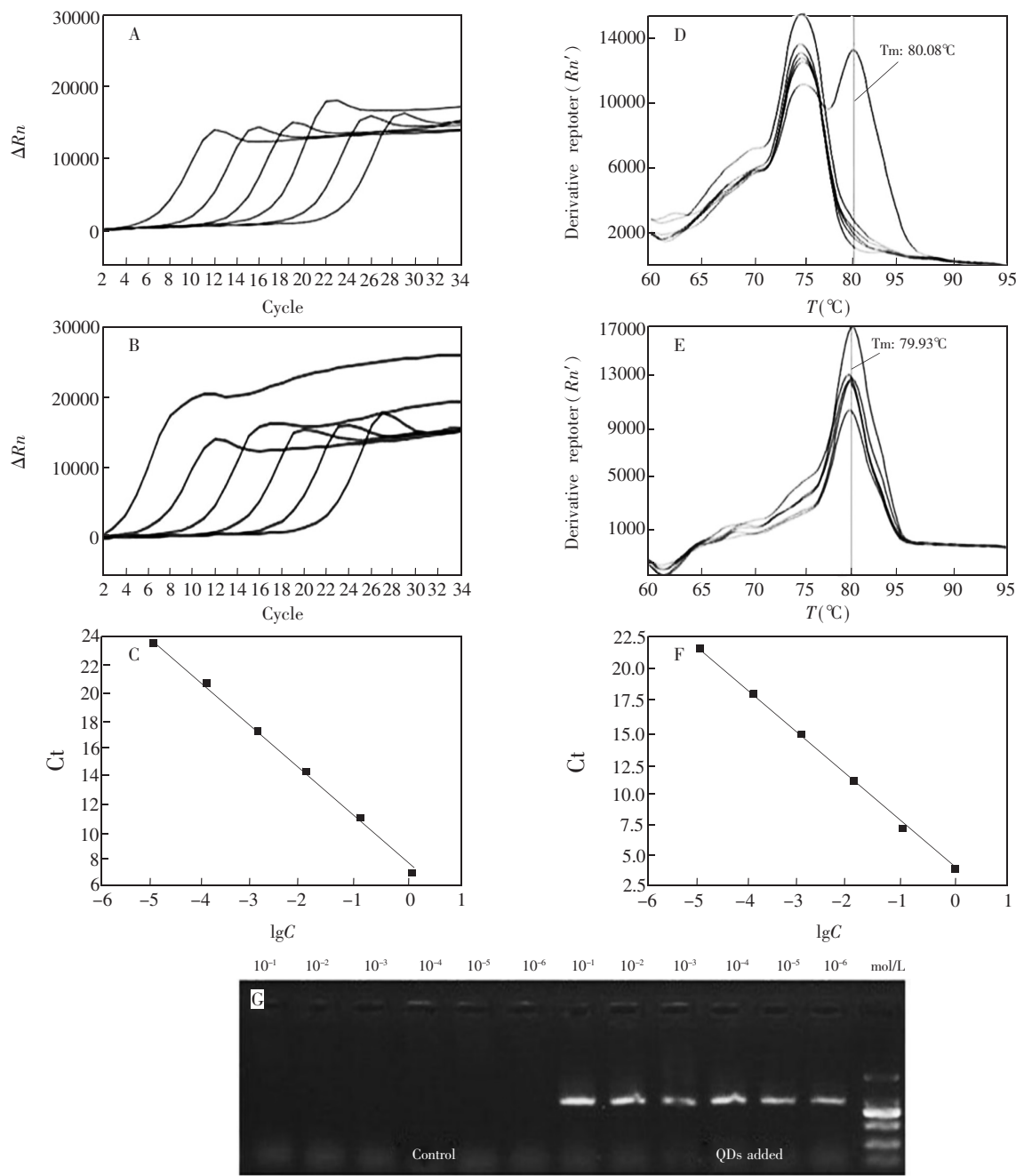


图3 基于量子点的热启动在实时定量 PCR 中的应用。模板为人类基因组的长度为 963 bp 的 PCR 产物,荧光染料是 EvaGreen,PCR 体系在 50℃ 中预温育 1 h,采用 Pfu 聚合酶。(A)Pfu 扩增曲线;(B)Pfu+QDs 扩增曲线;(C)Pfu 标准曲线;(D)Pfu 熔解曲线;(E)Pfu+QDs 熔解曲线;(F)Pfu+QDs 标准曲线;(G)上述结果的琼脂糖凝胶电泳图(1.2%)。Lane M: MW DL2000^[30]。

Fig. 3 Real time PCR analysis of the second round amplification of a 96.3 bp target from human genomic DNA after 1 h preincubation at 50°C using the EvaGreen detection system. Pfu DNA polymerase was used as polymerase. (A) Linear amplification data for control without QDs; (B) linear amplification data with QDs; (C) standard curve for control without QDs; (D) melting curve analysis for control without QDs; (E) melting curve analysis with QDs; (F) standard curve with QDs; (G) agarose gel (1.2%) electrophoresis of real time PCR products for different template dilutions. Lane M: MW DL2000^[30].

体系的产率和特异性,其最佳浓度为 0.8 mg/mL。另外纳米碳粉也对 PCR 体系产生促进作用,并且由于其尺寸和表面性能,浓度不同会产生不同的影响。Quaglio 等^[35]将 MWCNTs 与 PDMS 相结合,这种复合纳米材料具有良好的热传导性和热稳定性,运用到 PCR 体系中提高了 PCR 的扩增效率,整体时间比之前减少了 75%,因此通过改变复合碳纳米管含量,可以更精确的控制生物反应的流程效率。

2.4 氧化石墨烯与还原石墨烯纳米材料对 PCR 反应体系的影响

石墨烯(GO)是碳原子以 sp^2 杂化方式形成的一种单原子层厚度的准二维的纳米材料,具有高比表面积、良好的稳定性和生物相容性等,在生物医学等领域得到了广泛的应用^[36,37]。另外,其还具有良好的传热、导电以及与单链 DNA 及蛋白质相结合的特性等,因而广泛应于 PCR 扩增中^[38,39]。

Jia 等^[37]首先发现当在 PCR 中添加 12 mg/mL ~ 60 mg/mL 的 GO 时,可以提高 PCR 扩增的特异性,而 GO 浓度低于 12 mg/mL 时对 PCR 体系没有影响,GO 浓度高于 70 mg/mL 时则会产生抑制作用。还原石墨烯(rGO)对于 PCR 体系的最佳添加浓度为 0.8 mg/mL,在添加浓度超过 12 mg/mL 时则会产生明显的抑制作用。对于多轮 PCR 的扩增,rGO 作用更加明显,经过 8 轮扩增后仍然得到特异性的扩增,可能由于 GO 和 rGO 相比,其负电位较强,和 DNA 分子之间的斥力更大,因此效果不如 rGO。

石墨烯良好的热传导性可以提高 PCR 的选择性和特异性。Abdul 等^[39]研究也证明了 GNFs 可以提高 PCR 的导热系数,且效果主要取决于 GNFs 的浓度。当加入 GNFs 过量时,会起到抑制作用。同时,粒子的大小也是关键因素,影响其表面积,当表面积增大时,PCR 的产率也会提高。实验通过流体力学(CFD)模型模拟是否添加 GNFs 的对照实验,其结果也说明了 GNFs 优良的热导效应是增强 PCR 效率的主要原因。

2.5 金属氧化物纳米材料对 PCR 体系的影响

TiO_2 和 SiO_2 等金属氧化物纳米粒子对于 PCR 体系的影响也比较明显。Abdul 等^[40]研究发现,将粒径为 25 nm 的 TiO_2 加入到不同 DNA 模板来源(如质粒 DNA,基因 DNA,互补 DNA)的 PCR 体系中,扩增效率和空白对照组相比高 2.9 ~ 6.9 倍,且通过减少每个循环周期的时间,最终所用时间是原来的一半,其最佳使用浓度为 0.4 nmol/L。 TiO_2 良好的热传导效应,加速了模板 DNA 的变性,从而缩短反应时间。Wan 等^[41]也研究了 TiO_2 在 PCR 中的作用,并与其它纳米材料进行比对。实验发现,当 TiO_2 浓度达到 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 时会对体系产生抑制作用,当浓度达到 5 $\mu\text{g/mL}$ 时,反应被完全抑制。实验还证明了当 TiO_2 与银纳米粒子结合时,其促进效果更加显著。Lenka 等^[42]分别在普通 PCR、q-PCR(实时定量 PCR)、RT-PCR(反转录 PCR)中,对粒径为 7 nm 的 TiO_2 所产生的作用进行探究,发现在普通 PCR 体系中,0.2 nmol/L TiO_2 可实现目标 DNA 在极低模板浓度下的扩增,并且和前人的结果对比,发现加入小粒径的 TiO_2 的 PCR 产率是大粒径(25 nm)的 3 倍甚至更高,但在 q-PCR、RT-PCR 中,则没有明显效果。

Park 等^[43]将聚多巴胺包覆的 SiO_2 (PDA silica)和碳化的聚多巴胺包覆的 SiO_2 (C-PDA silica)纳米粒子分别加入到 PCR 反应体系中,考察它们对 PCR 体系的作用。研究发现 C-PDA 粒子表面可以提供多个接触点用来结合引物和聚合酶,增加了体系稳定性,而碳化的聚多巴胺包覆的 SiO_2 效果最突出。由此可见,复合纳米材料可以不同程度改善 PCR 体系的环境,使其更有利于反应的进行。

Ma 等^[44]认为磁性纳米粒子具有良好的磁化强度、超顺磁性,相对于其它纳米材料,其表面更容易功能化,他们对粒径为 8 ~ 10 nm 的表面修饰了羧基的 Fe_3O_4 纳米材料进行研究,研究结果表明,其可以提高 PCR 的灵敏度,检出测限可达到 4.26 amol/L。

3 纳米 PCR 中纳米材料的作用机理

引物错配和非特异性扩增严重影响了 PCR 扩增的灵敏度和特异性,而纳米材料通常具有良好的表面性能、热传导作用以及与单链 DNA 和蛋白质特异性结合等特性,广泛地应用于纳米基因扩增中,并极大地提高其扩增特异性、灵敏度和产率。但是由于 PCR 体系自身的复杂性,目前对于纳米 PCR 的机理仍然不是很清楚。根据目前的研究结果,推测纳米材料优化 PCR 主要基于以下两个方面。

3.1 纳米材料的表面作用

纳米材料表面积大,表面效应强,其作用主要可以分为两方面:一方面与引物或模板 DNA 作用,另

一方面则是与体系中的聚合酶相互作用。

Li 等^[45]利用纳米金团聚所产生的颜色变化设计了杂交试验,根据实验结果提出,纳米金对于单链 DNA(ssDNA)作用更强。Li 等^[11]也采用纳米金进一步验证了以上结论,并提出纳米金与单链结合蛋白(SSB)作用类似。首先双链 DNA(dsDNA)由于磷酸基团暴露在外面,与单链 DNA(ssDNA)相比,碱基暴露程度小,由于静电效应,纳米金更容易与 ssDNA 结合。在粒径 1 ~ 50 nm 范围内,ssDNA 相对 dsDNA 更加柔软,易于缠绕在纳米金的表面。SSB 或者纳米金选择性地结合 ssDNA,阻碍引物和模板的错配,降低了体系错配的可能性,减少了非特异性的扩增。

除 DNA 以外,PCR 反应体系中还包含蛋白质等。Yi 等^[46]观考察了有无羧基化的多壁碳纳米管和单壁碳纳米管对于 PCR 体系的影响,研究结果表明,纳米材料会与体系内的限制性内切酶、DNA 聚合酶相互作用,从而降低甚至抑制酶的活性,基于此提出了蛋白质和纳米材料相互作用机理。Mi 等^[47]认为纳米金可以动态调节 DNA 聚合酶活性,起到类似热启动 PCR 的作用,有效抑制非特异性扩增。实验中还发现,在较低温度时,纳米金会降低高保真 Pfu 聚合酶的活性,即使在 30 ~ 60℃ 温育 1 h 后,仍然可以得到特异性很高的单一目标产物。本研究组的研究也发现量子点具有类似的热启动效应^[29],初步认为这种类似热启动的效应主要源于量子点和高保真聚合酶 Pfu 的相互作用,使得扩增结果更加准确可信,此外,还可以减少实验成本,对于未来研究具有重要意义。

Lou 等^[48]利用纳米金进一步验证了以上的结论,并从 PCR 作用流程进行了深层次探究。首先,他们证明了纳米粒子可以作用于体系中的聚合酶,通过良好的表面性能与聚合酶结合从而改变聚合酶的有效浓度。其次,他们更深入地探究了纳米材料对于错配过程的影响,发现纳米材料的加入会使得错配体系温度更低。实验结果表明,1 nmol/L 纳米金可以使正反向错配体系的退火温度降低 1.0℃ 和 1.7℃,而完全匹配体系则减少 0.3℃ 和 1.0℃,通过增加引物完全匹配和错配之间的退火温度差增强 PCR 体系的特异性。他们还提出了纳米材料表面与 PCR 产物结合,在变性时促进其分解的机理。

Bai 等^[49]采用氨基修饰的二氧化硅磁性纳米材料(ASMNPs)对纳米 PCR 反应机理进行了更全面的研究。首先,他们认为纳米材料表面的活性基团会结合 PCR 中的 DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、引物或 DNA 模板等,所以当加入过量时,会降低反应速率,抑制 PCR 的进行。其次,纳米材料并不会抑制因错配而导致的非特异性扩增,而是低浓度的纳米粒子会抑制长片段的扩增,高浓度的纳米粒子则会抑制小片段的扩增,即纳米粒子的表面性能对 PCR 产生显著的影响。因此,了解每种纳米材料的表面特征,对于优化其在 PCR 上的作用有很大的帮助。

3.2 纳米材料的热传导性

纳米材料良好的热传导性在 PCR 体系不同温度变化的循环过程中也可能会起到重要的作用。Li 等^[18]通过改变 PCR 体系、DNA 聚合酶、模板 DNA 的长度等探究其作用机理,提出纳米材料良好的热传导性能,可以有效的改善 PCR 体系升/降温速率,从而缩短反应时间,使体系的反应效率明显增加。实验结果发现,纳米金可使 PCR 的灵敏度提高 5 ~ 10 倍,对于 q-PCR 的灵敏度可以提高 10^4 倍。Lin 等^[50]提出金纳米粒子通过提高体系的热传导性,来提高热循环效率,因而提高 PCR 体系的特异性和扩增效率。纳米金促进 DNA 模板解链,同时大幅度提高引物、DNA 片段与模板发生错配的解离速率,缩短了反应时间,从而提高 PCR 的特异性和效率。Xun 等^[51]制备了表面修饰 mPEG2000 的 CdSe/ZnS 量子点(QD590-mPEG2000),该量子点可在体系进行 40 个热循环后仍保持稳定,荧光信号没有降低,同时也保证了该材料在 PCR 体系中与其它成分的兼容性,作用不会受到影响,进一步证实了纳米材料的热传导性对于体系的调节起到不可忽视的作用。Abdul 等^[39]证明 GNFs 可以提高 PCR 体系的导热系数,进而提高 PCR 的扩增效率及其特异性,其中 GNFs 的尺寸大小起到了关键性作用。

4 纳米 PCR 的应用及展望

NanoPCR 具有高灵敏度、高特异性及高选择性等优点,目前该技术在病毒检测、基因测序中应用广泛。Ma 等^[52]利用 NanoPCR 技术来检测和区分野生型和基因缺失型伪狂犬病病毒(PPV),从病毒中选取 3 组引物进行特异性扩增,分别得到 431 bp(gB)、316 bp(gE)和 202 bp(gG)3 组产物。实验结果表

明,当采用这种纯化质粒构建的带有特殊基因片段产物,其灵敏度是传统 PCR 的 100 ~ 1000 倍。

Cui 等^[53]利用该技术实现了对猪细小病毒(PPV)的检测,对该病毒有良好的灵敏度和选择性,成功实现对 109 份试剂样品的检测,对于研究 PPV 有重要意义,同时也为研究其它病毒提供了新的思路。

Wang 等^[54]利用 NanoPCR 技术对猪的博卡病毒检测(PBoV)进行检测,与普通 PCR 技术相比,灵敏度为原来的 100 倍,最低检测限为 6.70×10^1 个拷贝。而 Yuan 等^[55]则首次利用 NanoPCR 技术对猪流行性腹泻病毒(PEDV)的 RNA 基因组进行检测,灵敏度是常规 RT-PCR 的 100 倍, PEDV RNA 最低检测限为 2.7×10^{-6} ng/ μ L,这项研究可以应用于临床诊断和 PEDV 的现场实时监测。他们还利用这项技术对鸭坦布苏病毒(DTMUV)进行检测^[56],灵敏度提高了 10 倍,最低 RNA 检测拷贝数为 1.8×10^2 / μ L。该课题组还进行脑心肌炎病毒(EMCV)方面的检测^[57],在保证体系与样品中其它病毒无交叉作用条件下,实现了最低检测 RNA 拷贝数为 1.2×10^2 / μ L,同时这也是 nanoPCR 技术在该病毒研究领域的首次应用。而 Elhusseini 等^[58]则采用粒径为 15 nm 的纳米金加入到 PCR 体系中,将马疱疹病毒 1 型(EHV-1)的检出限从 $10^4 \sim 10^5$ 个降到 10^2 个 DNA 拷贝,并改善了原检测体系出现假阴性的问题。

在人类病毒研究方面,沙门氏菌在很多发展中国家依旧是对健康有严重威胁的病毒,对于这样的伤寒类病毒多采用血样检测,灵敏度和对病毒的选择性都有待提高。Rehman 等^[59]采用磁性纳米粒子对 PCR 技术进行改进,降低了基于 VNTRs 的伤寒杆菌 PCR 检测的非特异性,促进了该技术的发展。

细菌气溶胶含量微小,且成分复杂,其定量检测一直是难点。Xu 等^[60]利用 TiO_2 纳米粒子结合银纳米粒子引入 PCR 中来检测空气中的细菌气溶胶。通过检测大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的数量,发现将两种纳米粒子混合后的效果明显高于单个纳米粒子,最低检测浓度可达到 40 pg/ μ L,灵敏度约为传统 PCR 的 500 倍。

NanoPCR 技术的发展为生物分子的研究开辟了一个新的思路和方向,相比传统 PCR 技术,当体系中添加入纳米材料时,通过其优良的表面性能和热传导效应,可以有效缩短反应时间,提高扩增效率和体系特异性,进而提高检测灵敏度。NanoPCR 在实际研究尤其是在病毒检测方面具有重要的应用价值和意义,为人类病毒的研究发展提供了新的可能,在未来生物医学领域具有良好的应用前景。另一方面,由于 PCR 反应体系的复杂性以及纳米材料的自身特点等原因,NanoPCR 的反应机理仍然不清楚,因此详实的探究 NanoPCR 的反应机理非常重要,而开发更多无毒高效的纳米材料并将其应用 PCR 技术中是未来重要的研究方向。

References

- 1 Mullis K B, Faloona F A. *Methods Enzymol.*, **1987**, 155: 335-350
- 2 Filteau M J, Lagace G, LaPointe G, Roy D G. *Syst. Appl. Microbiol.*, **2010**, 33(3): 165-173
- 3 Tiba M R, Moura d C, Carazzolle M F, Leite D d S. *Braz. J. Infect. Dis.*, **2011**, 15(2): 144-150
- 4 Jung Y L, Jung C, Parab H, Park H G. *ChemBioChem*, **2011**, 12(12): 1387-1390
- 5 Huber M, Mündlein A, Dornstauber E, Schneeberger C, Tempfer C B, Mueller M W, Schmidt W M. *Anal. Biochem.*, **2002**, 303(1): 25-33
- 6 Kasai K, Nakamura Y, White R. *J. Forensic Sci.*, **1990**, 35(5): 1196-1200
- 7 Zhang Z Z, Yang X, Meng L Y, Liu F, Shen C C, Yang W G. *BioTechniques*, **2009**, 47(3): 775-779
- 8 HE Qi-Di, HUANG Dan-Ping, HUANG Guan, CHEN Zuan-Guang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2016**, 44(4): 542-550
何启迪, 黄丹萍, 黄冠, 陈缙光. *分析化学*, **2016**, 44(4): 542-550
- 9 Varadaraj K, Skinner D M. *Gene*, **1994**, 140(1): 1-5
- 10 Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D, Loening S A. *Nucleic Acids Res.*, **1997**, 25(19): 3957-3958
- 11 Chou Q, Russell M, Birch D E, Raymond J, Bloch W. *Nucleic Acids Res.*, **1992**, 20(16): 4371
- 12 Li H K, Huang J H, Lv J H, An H, Zhang X D, Zhang Z Z, Fan C H, Hu J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44(32): 5100-5103
- 13 Wang L B, Zhu Y Y, Jiang Y, Qiao R R, Zhu S F, Chen W, Xu C L. *J. Phys. Chem. B*, **2009**, 113(21): 7637-7641
- 14 Cui D X, Tian F R, Kong Y, Titushikin I, Gao H J. *Nanotechnology*, **2004**, 15(1): 154-157

- 15 Nel A E, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek E M V, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M. *Nat. Mater.*, **2009**, 8(7): 543–557
- 16 Pan J K, Li H K, Cao X Y, Huang J H, Zhang X D, Fan C H, Hu J. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2007**, 7(12): 4428–4433
- 17 Vu B V, Litvinov D, Willson R C. *Anal. Chem.*, **2008**, 80(14): 5462–5467
- 18 Li M, Lin Y C, Wu C C, Liu H S. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33(21): e184
- 19 Yang W C, Li X H, Sun J L, Shao Z F. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2013**, 5(22): 11520–11524
- 20 Girilal M, Mohammed Fayaza A, Mohan Balaji P, Kalaichelvana P T. *Colloids Surf. B*, **2013**, 106(6): 165–169
- 21 Cao X Y, Shi X Y, Yang W C, Zhang X D, Fan C H, Hu J. *Analyst*, **2009**, 134(1): 87–89
- 22 Chen J J, Cao X Y, Guo R, Shen M W, Peng C, Xiao T Y, Shi X Y. *Analyst*, **2011**, 137(1): 223–228
- 23 Cao X Y, Shen M W, Zhang X D, Hu J, Wang J H, Shi X Y. *Electrophoresis*, **2012**, 33(16): 2598–2603
- 24 Walling M A, Novak J A, Shepard J R E. *Int. J. Mol. Sci.*, **2009**, 10(2): 441–491
- 25 Wang L B, Zhu Y Y, Jiang Y, Qiao R R, Zhu S F, Chen W, Xu C L. *J. Phys. Chem. B*, **2009**, 113(21): 7637–7641
- 26 Ma L, He S B, Huang J, Cao L, Yang F, Li L J. *Biochimie*, **2009**, 91(8): 969–973
- 27 Liang G F, Ma C, Zhu Y L, Li S C, Shao Y H, Wang Y, Xiao Z D. *Nanoscale Res. Lett.*, **2011**, 6(1): 1–7
- 28 Sang F M, Yang Y, Zhao H X, Ma M R, Zhang Z Z. *J. Exp. Nano.*, **2015**, 10(6): 476–482
- 29 Sang F M, Yang Y, Wang J J, Huang X Y, Ren J C, Zhang Z Z. *J. Exp. Nano.*, **2014**, 9(10): 1051–1063
- 30 Sang F M, Yang Y, Yuan L, Ren J C, Zhang Z Z. *Nanoscale*, **2015**, 7(38): 15852–15862
- 31 Hüttel A K, Steele G A, Witkamp B, Poot M, Kouwenhoven L P, Zant H S J. *Nano Lett.*, **2009**, 9(7): 2547–2552
- 32 Cui D X, Tian F R, Kong Y, Titushikin I, Gao H J. *Nanotechnology*, **2004**, 15(1): 154–157
- 33 Zhang Z Z, Wang M C, An H J. *Nanotechnology*, **2007**, 18(35): 355706
- 34 Zhang Z Z, Shen C C, Wang M C, Han H, Cao X H. *BioTechniques*, **2008**, 44(4): 537–545
- 35 Quaglio M, Bianco S, Castagna R, Cocuzza M, Pirri C F. *Microelectron. Eng.*, **2011**, 88(8): 1860–1863
- 36 Daniel R, Dreyer R S, Ruoff. Christopher W B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49(49): 9336–9345
- 37 Cai W W, Piner R D, Stadermann F J, Park S J, Shaibat M A, Ishii Y, Yang D X, Velamakanni A, An S J, Stoller S M, An J H, Chen D M, Ruoff R S. *Science*, **2008**, 321(5897): 1815–1817
- 38 Jia J, Sun L P, Hu N, Huang G M, Weng J. *Small*, **2012**, 8(13): 2011–2015
- 39 Abdul K R, Kafafy R M, Salleh H M, Faris W F. *Nanotechnology*, **2012**, 23(45): 455106
- 40 Abdul K R, Sonawane P J, Sasi B K, Sahu B S, Pradeep T, Das S K, Mahapatra N R. *Nanotechnology*, **2010**, 21(25): 255704
- 41 Wan W J, Yeow J T W, Dyke M I V. *IEEE C Nanotechnol.*, **2009**, 9: 458–461
- 42 Lenka G, Weng W H. *Dig. J. Nanomater. Bios.*, **2013**, 8(4): 1435–1445
- 43 Park J Y, Back S H, Chang S J, Lee S J, Lee K J, Park T J. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, 7(28): 15633–15640
- 44 Ma W, Yin H H, Xu L G, Wang L B, Kuang H, Xu C L. *Chem. Commun.*, **2013**, 49(47): 5369–5371
- 45 Li H X, Rothberg L. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2004**, 101(39): 14036–14039
- 46 Yi C Q, Fong C C, Chen W W, Qi S J, Tzang C H, Lee S T, Yang M S. *Nanotechnology*, **2007**, 18(2): 1055–1060
- 47 Mi L J, Wen Y Q, Pan D, Wang Y H, Fan C H, Hu J. *Small*, **2009**, 5(22): 2597–2600
- 48 Lou X H, Zhang Y. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2013**, 5(13): 6276–6284
- 49 Bai Y L, Cui Y, Paoli G C, Shi C L, Wang D P, Shi X M. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, 7(24): 13142–13153
- 50 Lin Y, Li J, Yao J, Liang Y, Zhang J, Zhou Q F, Jiang G B. *Environ. Chem.*, **2013**, 58(36): 4593–4601
- 51 Xun Z, Zhao X Y, Guan Y F. *Nanotechnology*, **2013**, 24(35): 355504
- 52 Ma X J, Cui Y C, Qiu Z, Zhang B K, Cui S J. *J. Virol. Methods*, **2013**, 193(2): 374–378
- 53 Cui Y, Wang Z, Ma X, Liu J, Cui S. *Lett. Appl. Microbiol.*, **2014**, 58(2): 163–167
- 54 Wang X L, Bai A Q, Zhang J, Kong M M, Cui Y C, Ma X J, Ai X, Tang Q H, Cui S J. *J. Virol. Methods*, **2014**, 202(16): 106–111
- 55 Yuan W Z, Li Y N, Li P, Song Q Y, Li L M, Sun J G. *J. Virol. Methods*, **2015**, 220: 18–20
- 56 Yuan W Z, Li J N, Li P, Sun J G, Chen L G, Liu J X. *Lett. Appl. Microbiol.*, **2015**, 62(1): 63–67
- 57 Yuan W Z, Li Y N, Wang J C, Wang J F, Sun J G. *Vet. Arhiv*, **2016**, 86(1): 1–8

58 Elhusseini D M, Helmy N M, Tammam R H. *RSC Adv.* , **2016**, 6(60) : 54898–54903

59 Rehman A, Sarwar Y, Raza Z A, Hussain S Z, Mustafa T, Khan W S, Ghauri M A, Haque A, Hussain I. *Analyst*, **2015**, 140(21) : 7366–7372

60 Xu S Y, Yao M S. *J. Aerosol. Sci.* , **2013**, 65(65) : 1–9

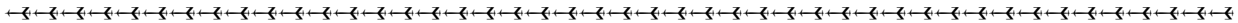
Development of Nano-Polymerase Chain Reaction and Its Application

SANG Fu-Ming* , LI Xin, LIU Jia
(School of Marine Science and Technology, Harbin Institute of Technology (Weihai) , Weihai 264209, China)

Abstract Polymerase chain reaction (PCR) has become one of the powerful technique since its invention in 1980s. Nevertheless, PCR technique is still frequently impaired by its low specificity, poor sensitivity, false positive results, etc. Recently, nanomaterials including metal nanoparticles, carbon nanomaterials, quantum dots and nano metal oxide have been added into PCR solution to improve both quality and productivity of PCR. The nanoparticles assisted PCR (NanoPCR) has received considerable attentions due to its unprecedented sensitivity, selectivity and efficiency. In this view, the mainly used nanoparticles in NanoPCR, including gold nanoparticles, quantum dots, carbon nanomaterials, graphene and metallic oxide, was firstly summarized. And then, the possible mechanisms for highly improved sensitivity and selectivity were discussed. Finally, recent applications of NanoPCR were described.

Keywords NanoPCR; Nanomaterials; Specificity; Amplification efficiency; Hot-start; Review
(Received 17 February 2017; accepted 4 September 2017)

This works was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21407035)



卓立汉光新品推出：Omni-λBright300 光纤输出可调单色光源

卓立汉光多年专注于光谱仪与高稳定光源研发,积累了丰富的经验,可提供多种可调单色光源(其组件包括氙灯、溴钨灯、氙灯等光源以及光谱仪),主要用于光、电子元器件的表征。典型应用如下:光探测器量子效率(QE)测量系统、太阳能电池光电转换效率测量(QE/ IPCE)系统、各类 CCD/CMOS 影像器件模组光色标定系统等。承载十年研发经验,全新推出高性能、高输出功率的可调单色光源 Omniλ-Bright 系列。

典型应用:
PEC 光电化学测试;透反吸测试系统;太阳能电池量子效率测试系统;用于荧光光谱测试系统的激发光源;表面光电电压测试;探测器光谱响应度测试系统;光学镜头透过率测试系统;防护眼镜产品测试系统;CCD/CMOS 影像器件模组的光色标定。

Omni-λBright 系列可调单色光源主要由 200 mm 焦距影像光谱仪、75W 氙灯光源以及其他配件组成。整个系统的光学设计经过多次优化,以保证最佳的分辨率和最大的光通量,同时又最大程度地抑制了杂散光,提升测量的准确度,用户通过简单的几个步骤就可以快速实现测试。