



双退火温度 PCR 扩增 DNA

黄亚威¹, 杨昂¹, 上官云杰¹, 贺添艳¹, 徐文选¹, 刘亮伟^{1,2*}

¹河南农业大学生命科学学院, 河南 郑州 450002

²农业部农业酶工程重点实验室, 河南 郑州 450002

摘要:【目的】与设置单一退火温度的常规 PCR (S- T_m PCR)不同, 本研究探讨双退火温度 PCR (D- T_m PCR) 由高到低设置 2 条引物各自退火温度。【方法】以 PxF61 和 VPeI 为正/反向引物, 用 Q5 DNA 聚合酶扩增 4.3 kb 的模式 DNA pET20b-Xyn (黑曲霉木聚糖酶基因)。PCR 程序为: 98 °C 预变性 3 min, 30 次循环 {98 °C 变性 30 s, 设置双退火 [T_{m1} 70 °C (PxF61)退火 15 s、 T_{m2} 62 °C (VPeI)退火 15 s], 72 °C 延伸 130 s}。【结果】与 S- T_m PCR (61 °C)相比, D- T_m PCR 扩增 4.3 kb 的目的条带亮度更高, 减少 2 条杂带; 经 25 次循环目的 DNA 产物量最高。D- T_m PCR 用于长片段引物扩增 5.3 kb 重组质粒 DNA 条带更明显。【结论】D- T_m PCR 直接扩增目的条带, 避免了探讨 T_m 的麻烦, 不要求 2 条引物 T_m 相近, 从理论上更加清晰地认识引物与各自模板分步退火过程。

关键词: 双退火温度, PCR, DNA

PCR 是重要的分子生物学操作技术^[1], 广泛用于基因扩增、诊断^[2-4]、酶工程等领域^[5-6]。科学研究中开发了不同 PCR 扩增方式: 如多重 PCR, 逆转录 PCR, 非对称 PCR、重叠延伸 PCR^[7-8]、反向 PCR^[9]、荧光定量 PCR^[10-11]、连接 PCR^[12]、解旋酶 PCR^[13]等, PCR 还用于无限制性酶切 (restriction enzyme free) 的重组质粒构建^[14-15]。目的基因特异性和扩增量受模板量、引物量、dNTPs 与 Mg^{2+} 浓度等参数影响^[16-17]。

设置合适的退火温度(T_m)是 PCR 操作成功的

关键因素^[18-19]。引物 T_m 值根据引物与模板匹配序列长度、碱基种类和 GC% 含量, 通过理论公式、经验公式、软件、网上平台等方法计算, 以低于理论 T_m 值的温度设置为 PCR 退火温度。常规 PCR 选择两条引物中较低 T_m 值作为退火温度, 称为单一退火温度 PCR (S- T_m PCR)。S- T_m PCR 要求 2 条引物 T_m 值接近 ($\Delta T_m \leq 5$ °C), 但是 T_m 值涉及引物匹配区域 DNA 序列、引物 GC% 含量、碱基数目、种类等多种因素。要用温度梯度 PCR、降落 PCR (TD: Touchdown PCR) 探讨合适 T_m ^[20], 有时经过

基金项目: 国家自然科学基金(31371831)

*通信作者。Tel: +86-371-63555175; Fax: +86-317-63555790; E-mail: liangwei@henau.edu.cn

收稿日期: 2017-01-06; 修回日期: 2017-04-27; 网络出版日期: 2017-06-15

多次探索才能找到合适的退火温度^[21]。有时 2 条引物匹配区域的 DNA 中 GC%含量差异较大, 如 pET20b 中 6His 标签处 GC%含量较高, 而启动子序列处 AT%含量较高, 扩增此段 DNA 时所用 2 条引物 T_m 相差很大。设置 S- T_m 影响目的条带特异性、出现非特异性条带, 有时甚至难以扩增出目的 DNA 条带, 比如长片段引物(megaprimer)扩增重组质粒 DNA, 设置单一退火温度无法扩增出目的条带^[22]。

本课题组构建重复序列重组质粒用到 T_m 值 85 °C 的 4.2 kb 长片段引物作为正向引物, 在 80 °C DNA 双链复性温度下才能与模板退火。反向引物为 T_m 值 64 °C 的 19 bp 常规引物, 此时需要设置 80 °C 和 64 °C 2 个退火温度使每条引物分别与模板结合^[22]。受此退火过程启发, 本研究探讨双退火温度(D- T_m)PCR, 设置 2 条引物各自 T_m 扩增 4.3 kb 的 pET20b-Xyn 模式 DNA, Xyn 为 555 bp 的黑曲霉 GH11 家族木聚糖酶基因^[5-6], pET20b 长度 3.7 kb。以 PxF61 (T_{m1} =70 °C)为正向引物, VPel (T_{m2} =62 °C)为反向引物。通过反向 PCR 扩增 4.3 kb DNA 条带, 比较 D- T_m PCR (T_{m1} 70 °C 退火 15 s, T_{m2} 62 °C 退火 15 s)与 S- T_m (T_m 61 °C 退火 30 s) PCR 对扩增目的 DNA 特异性和扩增量的影响。目的是通过 D- T_m PCR 增加目的条带特异性, 减少非特异性条带, 减少探讨 T_m 的麻烦, 从理论上清晰地认识引物与各自模板分步退火过程。

1 材料和方法

1.1 材料

高保真 Q5 DNA 聚合酶和 dNTPs 购于 New England Biolab (中国, 北京), 以含有黑曲霉 GH11 家族木聚糖酶基因 Xyn、海栖热袍菌 GH10 家族

木聚糖酶碳水化合物结合结构域 C1 的 pET20b-Xyn 质粒(4.3 kb)、pET20b-Xyn-C1 质粒(4.8 kb), pET20b-C1-Xyn 质粒(4.8 kb)为模板(均由本实验室构建)^[5-6]。PxF61 引物(5'-AGTGCCTGCA TCAACTACGTGCAAAA-3', 26 bp, GC%为 46.2%), VPel 引物(5'-GATATCCATGGCCATCGC-3', 18 bp, GC%为 55.6%), LF 引物(5'-CCTGAGGTCCTTCCA C-3', 16 bp, GC%为 62.5%, T_m 为 51.3 °C), VRP 引物(5'-CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAA ACAAAT-3', 35 bp, GC%为 22.9%, T_m 为 60.4 °C), RX 引物(5'-AGAGGAGATCGTGACACTG-3', 19 bp, GC%为 52.6%, T_m 为 53.4 °C)均由 Genewiz 公司(中国, 北京)合成: 用 NEB 公司平台计算 PxF61 T_{m1} =70 °C, VPel T_{m2} =62 °C。 λ -DNA Hind III Marker(约 0.5 μ g/ μ L)购自 TaKaRa 公司(中国)。

热循环扩增设备为 Thermal Cycler Block 5020 PCR 仪(Thermo Fisher scientific)。胶纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京索莱宝(Solarbio)科技有限公司, 以 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific)检测质粒 DNA 浓度。DYY-5 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂)。凝胶成像系统及蛋白质电泳分析软件 Gel-Pro Analyzer 4.0 (USA, Media Cybernetics 公司)。

1.2 D- T_m /S- T_m PCR 扩增 DNA

1.2.1 pET20b-Xyn DNA (4.3 kb)的扩增: 在 200 μ L EP 管中加入 20 ng pET20b-Xyn 质粒模板, PxF61 和 VPel 引物各 500 nmol/L, 200 μ mol/L dNTPs, 1 U Q5 DNA 聚合酶, 10 μ L Q5 聚合酶 5 \times 缓冲液, 加水补足 50 μ L 扩增体系。D- T_m PCR 程序为: 98 °C 预变性 3 min, 30 次循环{98 °C 变性 30 s, D- T_m 退火 [T_{m1} 70 °C 退火 15 s (PxF61)、 T_{m2} 62 °C 退火 15 s (VPel)], 72 °C 延伸 130 s}, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保温。S- T_m PCR 程序中设置 61 °C 退火 30 s, 保证 D- T_m 和 S- T_m PCR 具有相同的退

火时间,其他程序与 D-T_m PCR 相同。预先均匀混合 100 μL 反应试剂,然后分成 2 管分别进行 D-T_m/S-T_m PCR 保证反应体系中试剂及浓度相同。选择同一台 PCR 仪同一个加热孔,分别进行 D-T_m/S-T_m PCR 保证扩增条件相同。分别取 5 μL PCR 产物以 1.4% 琼脂糖凝胶电泳检测,比较目的产物条带亮度及特异性。蛋白质电泳分析软件 Gel-Pro Analyzer 4.0 扫描计算 DNA 含量,λ-DNA *Hind* III DNA Marker 点样时取 3 μL 相当于 200 ng。

1.2.2 C1-pET20b-C1-Xyn DNA (5.3 kb)的扩增:(1)

长片段 C1-pET20b DNA 的扩增,先以 500 nmol/L LF/VRP 引物,20 ng pET20b-Xyn-C1 模板,10 μL 5×Q5 DNA 聚合酶 buffer,200 μmol/L dNTPs,1 U Q5 DNA 聚合酶,加水补足 50 μL 扩增体系。PCR 程序:94 °C 预变性 5 min,30 次循环(94 °C 变性 30 s,64 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 149 s),72 °C 延伸 10 min,4 °C 保温。(2) 取 241 ng 纯化的 C1-pET20b DNA (4.3 kb)作为长片段正向引物,100 nmol/L RX 为反向引物,40 ng pET20b-C1-X 质粒模板,10 μL Q5 聚合酶 5×缓冲液,200 μmol/L dNTPs,1 U Q5 DNA 聚合酶,加水补足 50 μL 扩增体系。D-T_m PCR 程序:94 °C 变性 5 min,15 次循环{94 °C 变性 30 s,D-T_m退火[T_{m1} 80 °C 退火 30 s 降温速度 1 °C/s,T_{m2} 64 °C 退火 20 s],72 °C 延伸 190 s},72 °C 延伸 10 min,4 °C 保温。S-T_m-PCR 设置 64 °C 退火 30 s,其他与 D-T_m PCR 程序相同。

1.3 不同循环次数对 DNA 扩增量的影响

以 pET20b-Xyn 质粒为模板,PxF61/VPel 为正/反向引物,用 D-T_m PCR (T_{m1} 70 °C 退火 15 s 和 T_{m2} 62 °C 退火 15 s) 35 次循环扩增 4.3 kb 的 pET20b DNA 条带,每 5 次循环取 5 μL PCR 产物

进行 1.4% 琼脂糖凝胶电泳检测,比较循环次数对 DNA 扩增量的影响。蛋白质电泳分析软件 Gel-Pro Analyzer 4.0 扫描计算 DNA 含量。

2 结果和分析

2.1 D-T_m/S-T_m PCR 扩增 DNA

2.1.1 pET20b-Xyn DNA (4.3 kb)的扩增:课题组长期实验检测 Q5 DNA 聚合酶扩增速度为 2 kb/min,所以设置 130 s 延伸时间扩增 4.3 kb 的 pET20b-Xyn DNA,30 次循环扩增后,各取 5 μL PCR 产物在 1.4% 琼脂糖凝胶电泳检测,D-T_m PCR [T_{m1} 70 °C 退火 15 s (PxF61),T_{m2} 62 °C 退火 15 s (VPel)] 扩增目的产物条带亮度略高,Gel-Pro Analyzer 4.0 计算目的 DNA 量为 93.9 ng,S-T_m PCR 扩增目的 DNA 量为 88.5 ng。D-T_m PCR 中减少 3.3 kb 和 11.3 kb 两条杂带(图 1,箭头所示),表明 D-T_m PCR 扩增

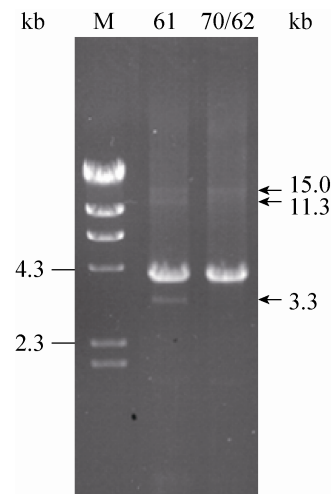


图 1. D-T_m/S-T_m PCR 扩增产物电泳检测

Figure 1. Electrophoresis of DNA amplified with D-T_m and S-T_m PCR. M: λ-DNA Marker; 61, 70/62: S-T_m (T_m 61) and D-T_m PCR [annealing at T_{m1} 70 °C for 15 s (PxF61) and at T_{m2} 62 °C for 15 s (VPel)]; arrows: two non-specific DNA bands of the S-T_m PCR more than the D-T_m PCR.

产物特异性更高。S-T_m PCR (*T_m* 61 °C 退火 30 s) 产物中有明显杂带, 3.3 kb 处杂带 26 ng, 11.3 kb 处杂带 29.5 ng, 15 kb 处杂带 14 ng, 而 D-T_m PCR 中只有 15 kb 处杂带 12 ng。非特异性条带可能是高温引物 PxF61 在较低温度 *T_m* 61 °C 时与模板非特异性区域匹配而产生的。

2.1.2 长片段引物扩增 5.3 kb DNA:先以 LF/VRP 正/反向引物、pET20b-Xyn-C1 质粒(4.8 kb)模板扩增 4.2 kb C1-pET20b DNA, 割胶回收纯化后取 241 ng 作为长片段正向引物、19 bp RX 作为反向引物、4.8 kb pET20b-C1-X 质粒模板扩增 5.3 kb C1-pET20b-C1-Xyn 线性重组质粒 DNA。结果显示 D-T_m PCR 中目的 DNA 条带明显好于 S-T_m PCR (图 2)。

2.2 D-T_m PCR 循环次数对 DNA 扩增量的影响

为确认 D-T_m PCR 扩增目的 DNA 最佳扩增次数, 探讨了不同循环次数对 pET20b-Xyn DNA 扩增量的影响。结果表明 10 次循环开始出现目的 DNA 条带(图 3-A), 25 次循环目的条带亮度最高, 30 次循环目的条带开始减少。20 次循环后目的条带上方开始出现杂带, 其亮度随扩增次数增加而

增加, 可能是扩增产物互为引物互为模板, 在 DNA 聚合酶作用下扩增出非特异性条带。30 次循环后目的 DNA 条带亮度开始减少, 35 次循环后目的 DNA 条带亮度少于 30 次循环, 35 次循环后目的条带亮度只略微多于 10 次循环, 表明 35 次循环后目的条带消耗量超过合成量, 从而导致目的条带减少。表明 20 ng pET20b-Xyn 模板经 25 次循环目的 DNA 扩增量达到最大值。模板量过多时平台期前移, 该结果与 S-T_m PCR、定量 PCR 相同。一般情况下 1.5 mL 菌液提取质粒浓度为 40–50 ng/μL,

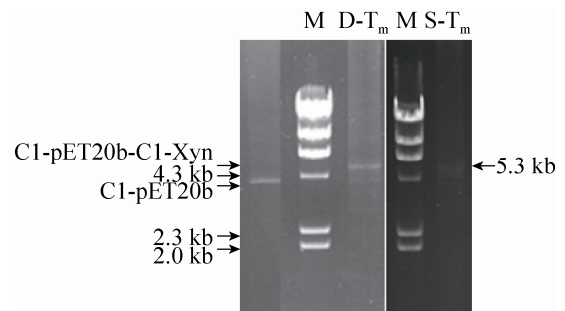


图 2. 长片段引物扩增 5.3 kb 重组质粒 DNA

Figure 2. Amplification of 5.3 kb recombinant plasmid DNA using megaprimer. M: λ-DNA Marker; D-T_m PCR: double annealing temperature PCR; S-T_m PCR: single annealing temperature PCR.

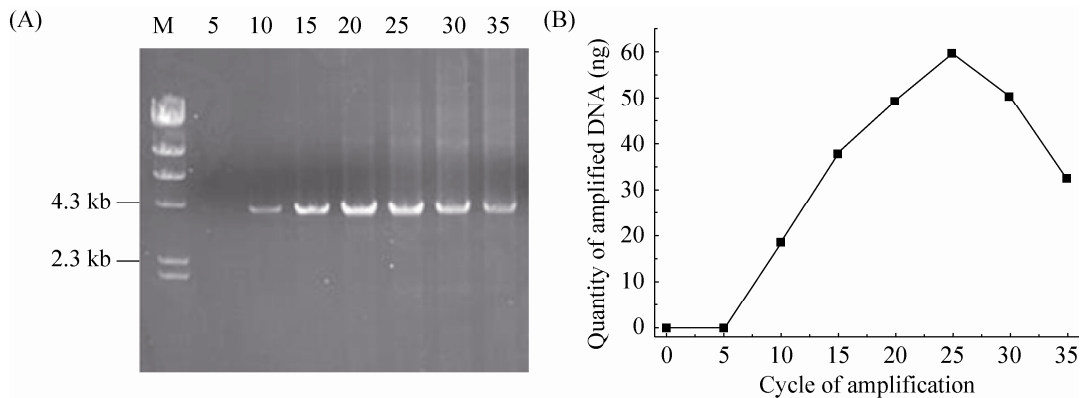


图 3. D-T_m PCR 不同循环次数对 DNA 扩增量影响

Figure 3. Effect of cycles on target DNA in D-T_m PCR. Electrophoresis (A) and gel analysis (B) of amplified DNA at different cycles. M: λ-DNA Marker; numbers: cycles of amplifications.

将其稀释 50 倍或 100 倍作为模板,均能够扩增出很好的目的条带。运用 Gel-Pro Analyzer 4.0 扫描计算清晰可见 DNA 扩增量随循环次数的变化(图 3-B),并且 25 次循环 DNA 扩增量达到最高值。

3 讨论

本研究探讨同一 PCR 循环中设置 2 条引物各自 T_m 作为分步退火过程的 D- T_m PCR,先设置高温 T_{m1} 70 °C 退火 15 s,而后低温 T_{m2} 62 °C 退火 15 s。常规 PCR 中只用 2 条引物中较低 T_m 作为退火温度,所以称为 S- T_m PCR。李庆生等用双退火温度扩增丙型肝炎病毒 NS5 基因^[23],实质上是不同 PCR 中的不同退火温度,第一步 PCR 用 T_m 57 °C 扩增 5 次循环,第二步 PCR 用 T_m 42 °C 扩增 25 次循环,还是以 2 条引物中较低 T_m 设置为退火温度的 S- T_m PCR。D- T_m PCR 则不同,是同一 PCR 中设置 2 条引物的各自退火温度。

3.1 D- T_m PCR 机理

退火是引物与对应单链模板结合过程,D- T_m PCR 选择 2 条引物各自 T_m 促使每条引物与对应模板结合,引物 P1 先在较高退火温度(T_{m1} 70 °C)下与负链模板结合(图 4),而后引物 P2 在较低退火温度(T_{m2} 61 °C)下与正链模板结合,从而完成退火过程。

S- T_m PCR 中隐含分步退火。S- T_m PCR 设置单一 T_m ,表观上同一 T_m (61 °C)下 2 条引物与各自模板同时结合(图 4),从而掩盖了引物的分步退火过程,使研究者误认为 2 条引物同时与各自模板结合,特别是刚接触 PCR 的初学者可能被这种错误认识影响一生。实质上 S- T_m PCR 也是 2 条引物在高、低 T_m 下分别与各自模板结合,因为从 98 °C 的变性温度到 T_m 61 °C 的退火是一个逐步降温过

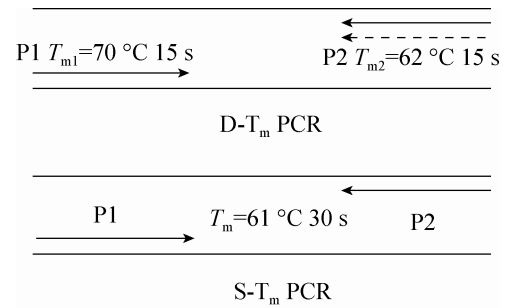


图 4. D- T_m 和 S- T_m PCR 退火比较

Figure 4. Comparison of annealing between S- T_m and D- T_m PCR. P1: primer with higher annealing temperature; P2: primer with lower annealing temperature; D- T_m PCR: double annealing temperature PCR; S- T_m PCR: single annealing temperature PCR.

程, Thermo Fisher Scientific PCR 仪默认样品升降温速度为 3.35 °C/s,从 98 °C 到 61 °C 需要 11 s,所以 S- T_m PCR 隐含分步退火过程。

TD-PCR 和温度梯度 PCR 中的分步退火操作。因为 S- T_m PCR 中 2 条引物间 T_m 不同,从而导致有时扩增不出目的条带,此时常用 TD-PCR 或温度梯度 PCR 探索合适的 T_m 值^[20,24]。TD-PCR 在每次循环后降低 0.5–1.0 °C 直至设定温度^[20,24],温度梯度 PCR 中设置一系列温度参数,所以 TD-PCR 和温度梯度 PCR 实质上是 2 条引物在不同温度下分别与各自模板的结合。D- T_m PCR 将这一过程从理论上清晰阐述出来,说明引物与各自模板分步结合过程,一条引物与模板结合与否与另一条引物无必然关系。

3.2 D- T_m PCR 优势

与 S- T_m PCR 相比, D- T_m PCR 有 3 点优势:

(1) 不需要考虑 2 条引物 T_m 值的差异。不受 2 条引物长度、碱基组成、匹配位置 DNA 的限制,不要求 2 条引物 T_m 差值小于 5 °C。本课题组在探讨 D- T_m PCR 过程中,曾用到温度差异达到 17 °C (T_{m1} 78 °C 和 T_{m2} 61 °C)的 2 条引物扩增出特异且

明亮的目的 DNA 条带。用 megaprimer 构建重组质粒时^[22], 4.2 kb 长片段正向引物 T_m 值 80 °C, 19 bp 反向引物 T_m 值 64 °C, 二者相差达到 16 °C, 只有用 D- T_m PCR 才能扩增出条带, S- T_m 无法扩增出目的条带, S- T_m PCR 中不允许设计温度差异这么大的引物。

(2) 不需要探索 T_m 。D- T_m PCR 能直接扩增特异性目的条带, 只需要从高到低依次设置各个引物的退火温度, 具有简便易行的特点。S- T_m PCR 需要花费很大时间和精力探究合适的退火温度, 科研新手使用温度梯度 PCR 或 TD-PCR 探索退火温度更不容易。

(3) DNA 条带特异性更好。D- T_m PCR 扩增目的 DNA 条带亮度略好, 而非特异条带数目明显减少, 杂带中 DNA 含量也明显减少, 说明 D- T_m PCR 特异性更好。这是因为: ① S- T_m 可能导致低温引物 P2 与其模板结合不牢固, 引物与模板结合是在分子热运动作用下结合-解离的动态平衡过程, 高温引物 P1 产生茎环结构影响与模板结合; ② 较低退火温度下单链模板容易形成茎环结构影响引物结合产生非特异性条带, PCR 扩增其实是双链 DNA 与引物竞争模板的结果^[25]。高保真 Q5 DNA 聚合酶与 Phusion DNA 聚合酶相同, 聚合酶端部均融合了提高 DNA 结合力和持续合成力的 DNA 结合结构域, 从而保证了长片段 DNA 扩增的准确性和完整性。保真性较低的 Taq DNA 聚合酶没有额外的 DNA 结合结构域, 利用 S- T_m PCR 扩增可能非特异性条带更多、更明显, 甚至扩增不出目的条带。

3.3 D- T_m PCR 对引物退火的说明

(1) 如何设置高、低温退火? 根据 2 条引物 T_m 值从高到低依次设置为 D- T_m PCR 退火温度,

不涉及程序中其他参数。这种次序不能改变, 否则在表观上与 S- T_m 相同, 在低温退火时高温、低温引物会同时与各自模板结合, 再进入高温退火时低温引物又与模板解离, 只有高温引物与模板结合。(2) 低温退火时高温引物是否会与模板再次结合? 这种担心是多余的, 因为高温退火时 P1 引物结合的对位位置已经饱和, 低温退火时不会再有 P1 引物结合, 所以 D- T_m PCR 是对退火过程的进一步认识。另外, 30 次 PCR 循环中常用 500 nmol/L 引物量, 探讨 D- T_m PCR 时发现 100、200 nmol/L 引物扩增出与 500 nmol/L 引物相同亮度的目的条带, 所以用 100、200 nmol/L 引物可以节约 2-5 倍引物量。

4 结论

本研究以 2 条引物各自 T_m 由高到底依次设置为退火温度的 D- T_m PCR, 比 S- T_m PCR 扩增 4.3 kb DNA 条带亮度更高, 杂带更少, 经 25 到 30 次循环得到最亮的目的条带。D- T_m PCR 不要求引物 T_m 相近, 不需要多次探讨就能有效扩增目的 DNA 条带, 理论上更加清晰地认识引物与各自模板分步退火过程。

参考文献

- [1] Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, 239(4839): 487-491.
- [2] Wang JC, Ji L, Yang XL, Ma YG, Lin MS. Diagnosis of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, by real-time fluorescent PCR using TaqMan probe. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2006, 36(3): 281-284. (in Chinese)
王金成, 季镭, 杨秀丽, 马以桂, 林茂松. 松材线虫 TaqMan 探针实时荧光 PCR 诊断. 植物病理学报, 2006, 36(3): 281-284.

- [3] Liu JS, Jiang Q, Si CD, Gan YD, Han LX, Qu LD. Establishment of PCR assay for differentiation of Muscovy duck parvovirus from goose parvovirus. *Veterinary Science in China*, 2007, 37(6): 469–472. (in Chinese)
刘家森, 姜骞, 司昌德, 甘一迪, 韩凌霞, 曲连东. 番鸭细小病毒与鹅细小病毒 PCR 鉴别诊断方法的建立. *中国兽医科学*, 2007, 37(6): 469–472.
- [4] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, 230(4732): 1350–1354.
- [5] Liu LW, Zhang GQ, Zhang Z, Wang SY, Chen HG. Terminal amino acids disturb xylanase thermostability and activity. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(52): 44710–44715.
- [6] Liu LW, Wang LM, Zhang Z, Guo XD, Li XQ, Chen HG. Domain-swapping of mesophilic xylanase with hyper-thermophilic glucanase. *BMC Biotechnology*, 2012, 12: 28.
- [7] Kleine J, Liebl W. Comparative characterization of deletion derivatives of the modular xylanase XynA of *Thermotoga maritima*. *Extremophiles*, 2006, 10(5): 373–381.
- [8] Mamo G, Hatti-Kaul R, Mattiasson B. Fusion of carbohydrate binding modules from *Thermotoga neapolitana* with a family 10 xylanase from *Bacillus halodurans* S7. *Extremophiles*, 2007, 11(1): 169–177.
- [9] Trinh Q, Zhu PY, Shi H, Xu WT, Hao JR, Luo YB, Huang KL. A-T linker adapter polymerase chain reaction for determining flanking sequences by rescuing inverse PCR or thermal asymmetric interlaced PCR products. *Analytical Biochemistry*, 2014, 466: 24–26.
- [10] Druml B, Kaltenbrunner M, Hohegger R, Cichna-Markl M. A novel reference real-time PCR assay for the relative quantification of (game) meat species in raw and heat-processed food. *Food Control*, 2016, 70: 392–400.
- [11] Carr AC, Moore SD. Robust quantification of polymerase chain reactions using global fitting. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37640.
- [12] Le YL, Chen HY, Zagursky R, Wu JHD, Shao WL. Thermostable DNA ligase-mediated PCR production of circular plasmid (PPCP) and its application in directed evolution via *in situ* error-prone PCR. *DNA Research*, 2013, 20(4): 375–382.
- [13] Vincent M, Xu Y, Kong HM. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Reports*, 2004, 5(8): 795–800.
- [14] Han LC, Ma SS, Liu YJ, Liu M, Liu LW. Construction of recombinant plasmid by a step-reverse PCR method. *Henan Science*, 2015, 33(8): 1321–1325. (in Chinese)
韩来闯, 马闪闪, 刘亚娟, 刘猛, 刘亮伟. 构建重组质粒的二步 PCR 方法. *河南科学*, 2015, 33(8): 1321–1325.
- [15] You C, Zhang XZ, Zhang YHP. Simple cloning via direct transformation of PCR product (DNA multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(5): 1593–1595.
- [16] Wu AJ, Wang H, Yu SY. Study about the relationship of dNTP, Mg²⁺ and multiplex polymerase chain reaction. *China Public Health*, 2001, 17(2): 109–110. (in Chinese)
吴爱军, 王红, 俞守义. 在多基因 PCR 中对 dNTP 与 Mg²⁺ 的浓度关系的研究. *中国公共卫生*, 2001, 17(2): 109–110.
- [17] Cobb BD, Clarkson JM. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(18): 3801–3805.
- [18] Subramanian A, Mamedov T, Pinnear E, Viljoen H. Importance of annealing times in the PCR amplification of GC-rich genes. *Journal of Biotechnology*, 2008, 136 Suppl: S100.
- [19] Mamedov TG, Pienaar E, Whitney SE, Termaat JR, Carvill G, Goliath R, Subramanian A, Viljoen HJ. A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Computational Biology and Chemistry*, 2008, 32(6): 452–457.
- [20] Zhang GX, Yuan BM, Xu PR, Xue LX. Modified touchdown PCR efficiently improves specificity of PCR. *Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences)*, 2003, 38(3): 352–354. (in Chinese)
张贵星, 袁保梅, 许培荣, 薛乐勋. 改良的降落 PCR 与普通 PCR 结果比较. *郑州大学学报(医学版)*, 2003, 38(3): 352–354.
- [21] Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(21): 6409–6412.
- [22] Liu M, Liu YJ, Xu WX, He TY, Liu LW. Construction of recombinant plasmid containing repeated sequence by megaprimer reverse PCR. *Henan Science*, 2016, 34(4): 501–505. (in Chinese)
刘猛, 刘亚娟, 徐文选, 贺添艳, 刘亮伟. 长片断引物反向 PCR 方法构建重复序列的重组质粒. *河南科学*, 2016, 34(4): 501–505.
- [23] Li QS, Guo JP, Tao QM. Amplification of NS5 gene of hepatitis C virus by “Two Annealing temperature” PCR. *Chinese Biochemical Journal*, 1996, 12(2): 249–250. (in

- Chinese)
李庆生, 郭建平, 陶其敏. “双退火温度”多聚酶链反应扩增丙型肝炎病毒 NS5 基因. 生物化学杂志, 1996, 12(2): 249–250.
- [24] Zhang ZY, Martineau D. Single-tube heminested PCR coupled with “touchdown” PCR for the analysis of the walleye dermal sarcoma virus *env* gene. *Journal of Virological Methods*, 1996, 60(1): 29–37.
- [25] Lee JY, Lim HW, Yoo SI, Zhang BT, Park TH. Simulation and real-time monitoring of polymerase chain reaction for its higher efficiency. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 29(1/2): 109–118.

Amplification of DNA with double annealing temperature PCR

Yawei Huang¹, Ang Yang¹, Yunjie Shangguan¹, Tianyan He¹, Wenxuan Xu¹, Liangwei Liu^{1,2*}

¹ Life Science College, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China

² Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002, Henan Province, China

Abstract: [Objective] Instead of standard PCR setting a single annealing temperature (S- T_m), we studied double annealing temperature PCR (D- T_m PCR) setting respective annealing temperature for forward and reverse primers from higher to lower. [Methods] A 4.3 kb pET20b-Xyn (*Aspergillus niger* xylanase gene) model DNA was amplified with Q5 DNA polymerase by using PxF61 and VPel as forward and reverse primers. The PCR procedure was: pre-denaturation at 98 °C for 3 min, and 30 cycles of denaturation at 98 °C for 30 s, annealing at T_{m1} 70 °C (PxF61) for 15 s and at T_{m2} 62 °C (VPel) for 15 s, extension at 72 °C for 130 s. [Results] The 4.3 kb target DNA band of D- T_m PCR was a little brighter, whereas non-specific DNA bands were two less than those of the S- T_m PCR ($T_m=61$ °C). Twenty-five cycles of amplification created the brightest target DNA band in the D- T_m PCR. A 5.3 kb recombinant plasmid DNA was clearly amplified in the D- T_m PCR than the S- T_m PCR. [Conclusion] The D- T_m PCR amplified directly target DNA band without demanding for investigation of an optimal annealing temperature and for setting closer annealing temperatures between forward and reverse primers. Moreover, two respective annealing steps were clearly elucidated from theoretical viewpoint.

Keywords: Double annealing temperature, PCR, DNA

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31371831)

*Corresponding author. Tel: +86-371-63555175; Fax: +86-371-63555790; E-mail: liangwei@henau.edu.cn

Received: 6 January 2017; Revised: 27 April 2017; Published online: 15 June 2017