

反向 PCR

常规的 PCR 技术只能对两端序列已知的 DNA 片段进行扩增,但在实际工作中常常需要通过基因上一小段已知序列对其邻近序列进行扩增。为了解决这一问题,科学家们对常规 PCR 进行技术改进,发明了多种获得已知基因两侧序列的方法,包括反向 PCR、锚定 PCR、RACE-cDNA 末端的快速扩增等。本文主要对反向 PCR 做一介绍。反向 PCR (inverse-PCR, IPCR) 具有与常规 PCR 方向相反的引物,并且 IPCR 的扩增方向与普通 PCR 相反,因此称为反向 PCR。

实验原理

IPCR 实验是将待扩增片段环化,通过一对方向相反的引物实现已知序列两侧基因序列的扩增(见下图)。常规 PCR 的方向是相对的,可以扩增一对引物之间的片段,因此想要扩增引物两侧的基因片段,需要设计方向相反的引物。但用方向相反的引物进行 PCR 扩增,是无法得到足够的产物的,因为每个引物只能对各自的模板线性扩增,无法进行指数级增长。为了解决这个问题,需对扩增的 DNA 模板先进行酶切,然后连接环化,使其引物方向成为相对,而后再进行 PCR 扩增。



图 1 : 反向 PCR 技术原理

制备流程

引物设计

引物的方向与常规 PCR 相反,其设计原则与常规 PCR 相同。

模板制备

取基因组 DNA，先用适宜的限制性酶进行切割，随后去除反应中的限制性酶，再用连接酶将酶切片段进行自身连接，形成一环状结构（为了提高 IPCR 效率，有时会将环化模板再次线性化会有利于扩增，即在已知序列的引物之间寻找一合适的酶切位点，且该位点在待研究的侧翼未知序列上不存在，用相应的限制性酶消化，即可获得线性化的模板）。

PCR 反应

根据模板设置合适的条件进行 PCR 扩增。一般来说，在 IPCR 实验中只进行一轮 PCR 是不够的，通常会设计不同的引物进行两轮或两轮以上的 PCR 反应（[巢式 PCR](#)）。

产物分析

扩增产物可以通过琼脂糖凝胶电泳分析判断其分子量，也可以进行 TA 克隆并进行测序获得基因序列。

注意事项

1. 用限制性酶酶切基因组 DNA 要彻底（电泳条带弥散）
2. 在进行连接反应时，反应体系中不能存在乙醇（痕量的乙醇也会对随后的连接产生不利影响）
3. 对基因组的复杂度有一定的限制，对于大于 10^9 bp 的基因组需要构建小一些的文库
4. 扩增片段的长度有一定的限制，尽管现在利用长片段 PCR 可以对长达几十 kb 的片段进行扩增，但对 IPCR 来说还是很难达到这种境地。为了增加实验的成功率，最好将 IPCR 的扩增长度限制在 2-3kb

应用

反转录 PCR 对克隆侧翼未知 DNA 序列快速有效，是常规 PCR 技术的重要补充，是分子生物学技术的重要方法之一。IPCR 在分子生物学研究中应用广泛，可以检测病毒、转座子^[1]等在基因组中的整合位点，克隆基因的邻接序列以及建立基因组步移^[2]文库等。虽然该技术目前存在一定的缺陷（如基因组的复杂度、扩增的长度等有一定的限制），但随着分子生物学技术的发展，必将会得到不断的完善。

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

SingleB® 单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

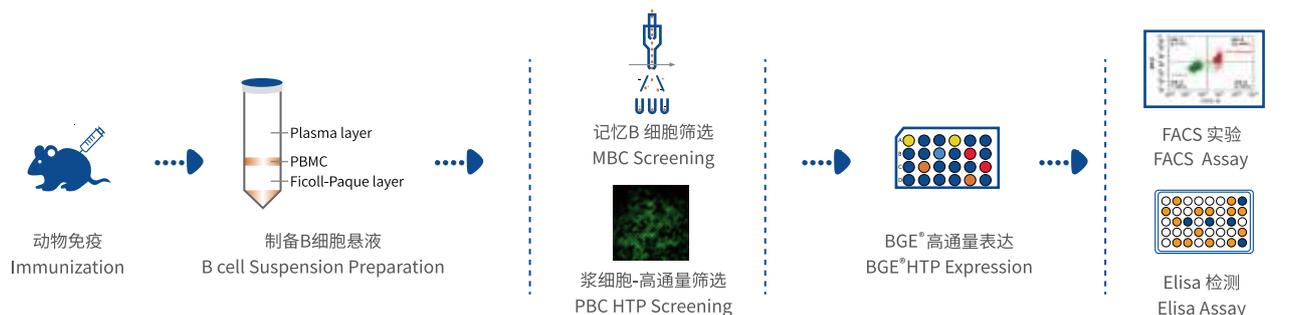
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

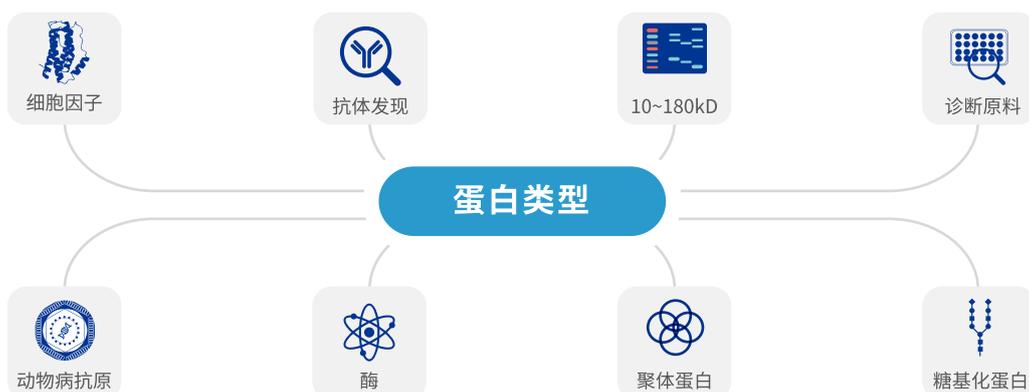


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

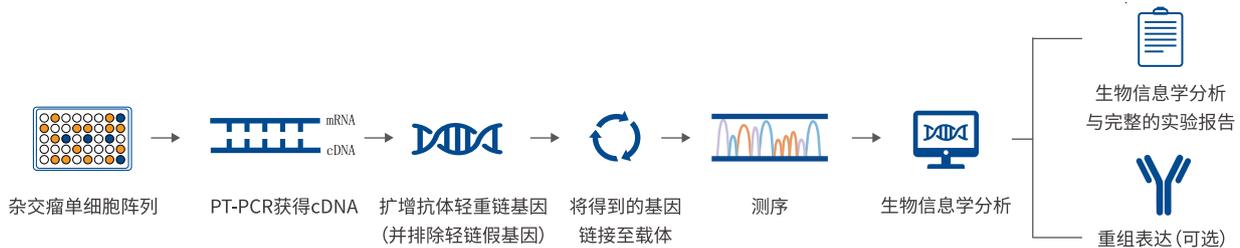
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



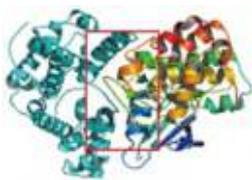
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

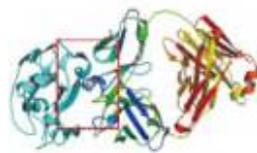
检测范围



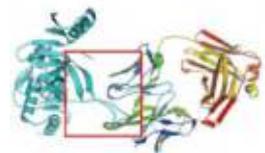
蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6

Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

7

Stable Cell Line Development Service

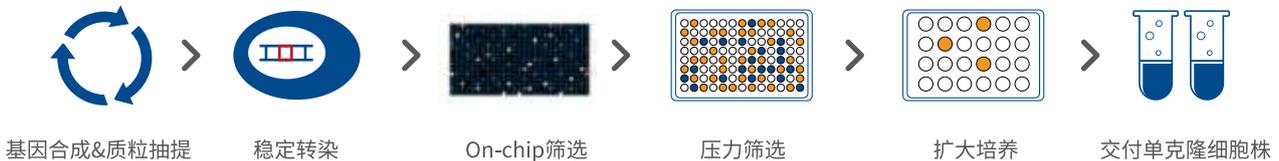
生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L