

降落 PCR

尽管目前 PCR 技术已相当普遍和成熟，但由于 PCR 反应中许多条件（如 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、模板、循环中的参数等）仍然会影响实验结果，特别对于一些复杂的基因组 DNA 模板，普通 PCR 往往存在非特异性扩增，得不到理想的产物。为了解决 PCR 非特异性扩增的问题，Don 等人于 1991 年发明了降落 PCR (touchdown PCR, TD-PCR) 技术。

技术原理

降落 PCR 是通过对反应体系中退火温度进行优化来提高反应的特异性，其基本原理为：根据引物的 T_m 值，设置一系列从高到低的退火温度，开始选择的退火温度高于估计的 T_m 值，每一个（或 n 个）循环降低 $1^{\circ}C$ （或 $n^{\circ}C$ ）退火温度，随着循环的进行，退火温度逐渐降低至 T_m 值，最终低于 T_m 值达到一个较低的退火温度。最后以此退火温度进行 10 个左右的循环。

PCR 反应中退火温度会对扩增结果产生影响，随着退火温度的升高，扩增特异性会变好，同时扩增效率会变低。退火温度过高会使 PCR 效率过低，退火温度过低则会使非特异性扩增过多。降落 PCR 一开始先用高温扩增，保证扩增的严谨性（在较高的退火温度下通常得到特异性扩增产物），待目的基因的丰度上升后，降低扩增的温度，提高扩增的效率。当退火温度降到非特异扩增发生的水平时，特异产物会有一个几何级数的起始优势，在剩余反应中非特异的位点由于丰度低无法和特异位点竞争，从而产生单一的占主导地位的扩增产物。

降落 PCR 具有以下三个特点：

- 第一、低水平、高特异性的扩增在循环的早期开始，此时的退火温度高于“最合适”的退火温度；
- 第二、当退火温度在目的产物的 T_m 值与假阳性产物的 T_m 值之间时，目的产物的竞争优势更加明显；
- 第三、较低的退火温度能很有效地增加目的产物的产量，同时使非特异性的扩增降到最低，因为特异序列在较高退火温度时得到扩增，等退火温度降到较低时，已积累大量的特异产物，减少了特异引物与非特异序列结合的机会。

退火温度设置

通常降落 PCR 的退火温度范围可跨越 15°C，从高于 T_m 值几度到低于其 10°C 左右，在每个温度上循环 1~2 个周期，然后在较低的退火温度上循环 10 个周期左右。

降落 PCR 的改进

人们为了简化实验流程，同时避免最低退火温度过低会有非特异性产物出现的可能性，将 TD-PCR 退火温度缩短至 10 个系列温度，此扩增方法称作 MTD-PCR。后来人们又将 MTD-PCR 再次改进，将退火温度缩短至 5 甚至 4 个温度范围，并将这种方法称为 SMTD-PCR。改良后的 TD-PCR 在每一个停留的退火温度上循环 4 或者 5 次，最后一个退火温度循环次数增加至 20~30 个循环，以最大可能提高其特异产物与非特异产物的比率。但改良后的 TD-PCR 需要从较低的退火温度开始降落，因为尽管 Taq 等酶耐热，但经过太长时间的高温后其活性也会下降，会由于 DNA 聚合酶活性丧失过多而得不到足量的 PCR 产物。

注意事项

- 由于降落 PCR 在较早的循环中需避免低 T_m 值配对，在降落 PCR 中最好应用热启动技术。
- 降落 PCR 虽然有一定的优势，但它并非万能，降落 PCR 只能做到“锦上添花”，即能看见主带，但是存在杂带，可以利用降落 PCR 进行优化，但是如果连主带也看不见，只有杂带，那么用了降落 PCR 也不会有很好的效果。

如果扩增后跑胶观察到许多产物带或高分子量成片产物，可采取以下措施：

- 提高 DT-PCR 的最高退火温度和最低退火温度，使其范围上移；
- 减少最低退火温度条件的循环次数；
- 使各退火温度下的循环数增加一个，如三个循环降低 1°C；
- 用嵌套式引物重新扩增第一次 PCR 产物的稀释物（[巢式 PCR](#)）；
- 放弃此套引物，重新设计引物扩增；

降落 PCR 与温度梯度 PCR 比较

降落 PCR 与温度梯度 PCR 都是对反应体系中的退火温度进行优化，但两者在原理上有所不同。

温度梯度 PCR 是指在退火温度不太明确时，为了找到最优退火温度，在一台 PCR 仪上同时做多管 PCR，每一管放在仪器内不同列（有的是不同行）上，分别进行 PCR（如 50-60℃ 可以分 6 管，分别 50℃，52℃，54℃，56℃，58℃，60℃），最终找到最合适的退火温度，并进一步以此退火温度进行普通 PCR 扩增。

降落 PCR 是为了提高反应的特异性，通过设计一系列不断降低的退火温度，在同一 PCR 管内进行 PCR 扩增，最终获得大量的特异性扩增产物。

与温度梯度 PCR 相比，降落 PCR 更有优势，因为采用梯度 PCR 选择合适的退火温度时需要多次反应或多管反应，并且即使通过多次试验找到最佳的退火温度后，在更换其它的 PCR 仪进行同样的扩增时最适的退火温度也有可能发生改变，需要重新进行最佳温度的摸索。而降落 PCR 只需一次反应就可以获得很好的扩增效果，避免了对每对引物进行最佳复性温度的优化和测定工作，并且降落 PCR 在很大程度上削弱了仪器性能对扩增效果的制约。

降落 PCR 应用

降落 PCR 适用于经常更换引物的实验，在不知道 T_m 值，同时不想很麻烦的找出最佳 T_m 值的情况下，使用降落 PCR 可以快速、特异的得到目的扩增片段。现在很多 PCR 仪具有设置降落 PCR 的程序，降落 PCR 在研究领域中已得到了广泛的应用。根据各种不同工作的需要，降落 PCR 还可与其它 PCR 方法同时使用，如实时定量降落 PCR、竞争降落 PCR 等，这些联合 PCR 的反应体系，所需材料均与实时定量 PCR 和竞争定量 PCR 相同，所不同的是在 PCR 的循环过程中使用退火温度渐低的降落 PCR 方法，检测 PCR 产物的方法与硬件也均同于[实时定量 PCR](#)和竞争定量 PCR。

更多优质服务推荐

1

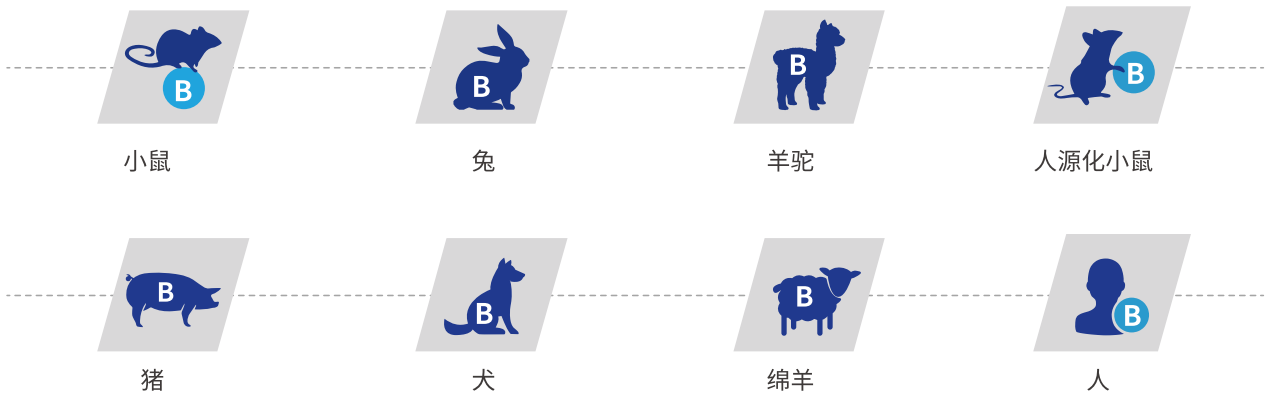
SingleB® mAb Discovery Service SingleB®单B细胞快速单抗发现

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。

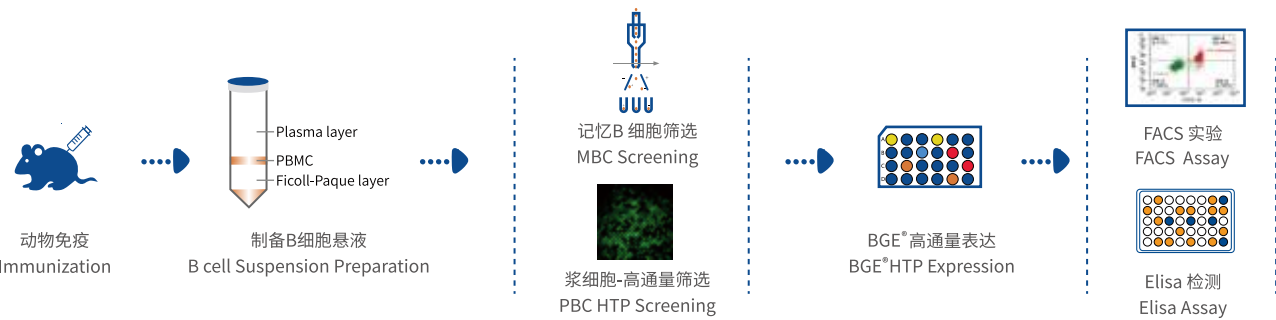
平台优势

 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

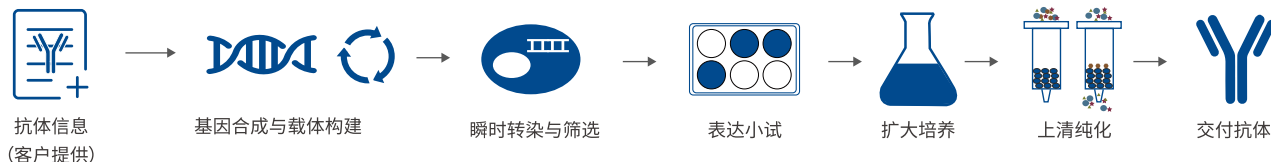
重组抗体表达

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、 $(\text{Fab}')_2$ 、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

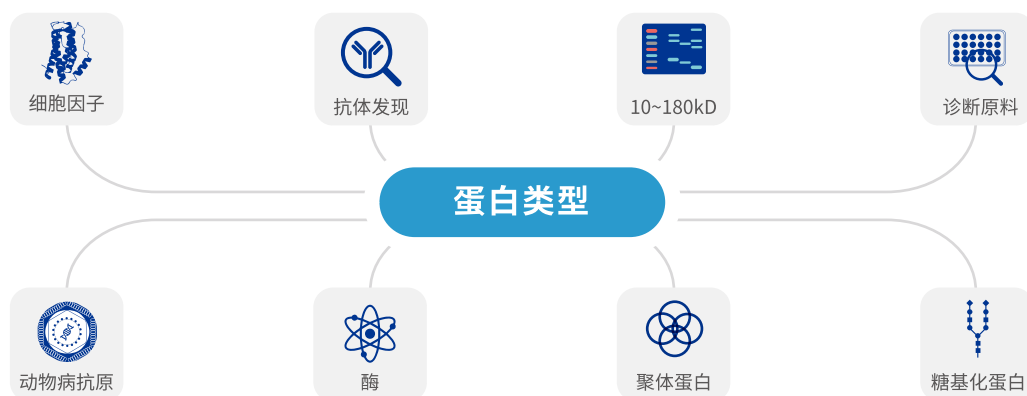


Recombinant Protein Expression Service

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。

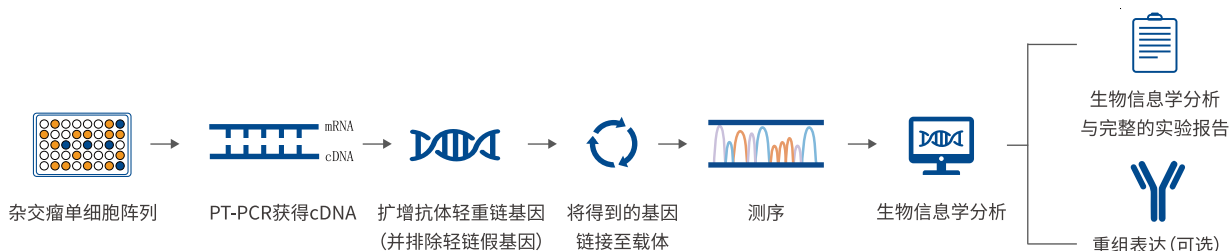
应用场景

- 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k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



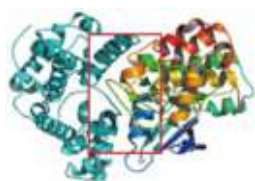
5

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,能够实现对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。



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



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



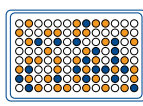
基因合成&质粒抽提



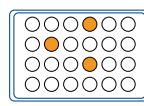
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

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