

三种不同核酸分析系统的效率比较分析

刘亚 李翔 任雯 蒋惠泉 赵久然

(北京市农林科学院 玉米研究中心 北京 100097)

摘要:以4种转基因玉米基因组DNA为研究对象,使用转基因事件特异性引物进行普通PCR及多重PCR扩增,并分别应用普通琼脂糖电泳以及ABI 3730XL、岛津MultiNA、QIAGEN QIAxcel这3种核酸分析仪进行分析,比较了各种检测方法的优缺点。研究结果对不同检测需求的核酸片段大小分析方法提供了重要参考。

关键词:转基因检测;复合PCR扩增;核酸分析系统

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)06-0058-04

Efficiency Comparative Analysis of Three Different Nucleic Acid Analysis System

LIU Ya, LI Xiang, REN Wen, JIANG Hui-quan, ZHAO Jiu-ran

(Maize Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: Four kinds of genetically modified maize genomic DNA were extracted, using specific primers for PCR and multiplex PCR detection in this study. The PCR products were analyzed respectively by ordinary agarose gel electrophoresis and other three kinds of nucleic acid analyzer ABI 3730XL, Shimadzu MultiNA and QIAGEN QIAxcel. The experimental results were compared and summarized the advantages and disadvantages of the detection methods for nucleic acid fragments of different size, which provided an important reference for different analysis requirements.

Key words: Transgenic detection; Multiplex PCR; Nucleic acid analysis system

在分子生物学试验中,PCR扩增产物核酸片段大小一般经琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析。传统的凝胶电泳分析方法虽然成熟,但在大规模、多批次的数据收集和分析时就显得耗时、耗力,而且也存在着灵敏度、分辨率不高的问题^[1]。近年来,随着生物科学的快速发展,针对DNA片段大小分析的快速、高通量分析仪器也不断研发出来。荧光标记毛细管电泳检测技术因具有高效、自动化的优点,在核酸片段大小分析研究中显示出极为广阔的应用前景。易红梅等^[2]以192份玉米品种为材料,用7对SSR引物对毛细管电泳荧光检测和常规的变性PAGE银染检测2种SSR标记检测方法进行比较分析,结果表明,毛细管电泳荧光检测法检测的结果更为精确、灵敏、高效,更适用于高通量材料的检测分析。第13届北京分析测试学术报告会及展

览会(BCEIA 2009)上,岛津公司展出了MultiNA微芯片电泳系统,其采用最新的专利技术,用于DNA和RNA的碱基长度分析^[3]。而QIAGEN QIAxcel分析系统则被认为是准确、自动化的DNA大小分析系统,可以用来代替琼脂糖凝胶电泳,实现快速、高通量的分子片段大小分析^[4]。

本研究以转基因玉米DNA为对象进行转基因检测,通过普通琼脂糖电泳以及ABI 3730XL、岛津MultiNA、QIAGEN QIAxcel这3种核酸分析系统检测分析,比较各自的优缺点,从而为不同检测需求的核酸片段大小分析提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

NK603、Bt11、Tc1507和Mon810共4种转基因

收稿日期:2012-10-08

基金项目:北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJ CX201102003);北京市科技新星项目(Z111105054511066)

作者简介:刘亚(1977-),男,湖北宜昌人,副研究员,主要从事玉米转基因研究。

通讯作者:赵久然(1962-),男,北京平谷人,研究员,主要从事玉米遗传育种和玉米高产栽培研究。

玉米样品 ,以郑单 958 作为非转基因(阴性) 对照。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器与耗材 基因扩增仪 Mycycler(Bio-rad) ,凝胶分析成像系统(北京天能) ,微量加样器多种量程(德国 Eppendoff) ,高压灭菌锅 YXQ-LS-30S(上海博讯) ,琼脂糖电泳装置(北京六一) ,ABI 3730XL(美国 ABI) ,MultiNA(日本岛津) ,QIAxcel System(德国 QIAGEN)

1.2.2 试剂 超纯甲酰胺和 GS3730-500 分子量内

标(美国 ABI) ,荧光染料 SYBR Gold(美国 Invitro-gen) ,DNA 500kit(日本岛津公司) ,Taq DNA 聚合酶及 dNTPs(北京康为世纪) ,DNA 分子量标记(北京全式金) 。普通引物由上海生物工程有限公司合成 ,荧光引物由 Invitrogen 公司合成。试验中使用引物终浓度为 10 μmol/L。

1.3 引物设计

NK603、Bt11、Tc1507 和 Mon810 转基因事件特异性引物见表 1 ,Z_{ein} 基因作为玉米内标基因。

表 1 转基因玉米检测引物一览

Tab.1 Primers of genetically modified maize

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	设计位点 Position designed	目的片段/bp Object fragment
NK603 ^[5]	F: 5'-CAAATCCTCTGGCCTTTCCG-3' R: 5'-TCGCCGATGAAGGTGCTGTC-3'	tNOS/Maize genome	108
Bt11 ^[6]	F: 5'-GCAGACTCCCGTGTTCCTC-3' R: 5'-TGTCCAATCGTAAGCGTTCC-3'	Maize genome/ adh1 ehancer	207
Tc1507 ^[7]	F: 5'-CCAGTTTCTGCGAACATACC-3' R: 5'-TTGCGTGAGCTAACTAAGTGTC-3'	T-35S/Maize genome	279
Mon810	F: 5'-ACCGACCTGAACGAGGACTT-3' R: 5'-CAGGTCTTAGTGCTCTGGCTC-3'	Cry1A(b) /Maize genome	466
Z _{ein} ^[8]	F: 5'-TGAACCCATGCATGCAGT-3'	Z _{ein}	195

1.4 PCR 产物检测

普通琼脂糖电泳: 用电泳缓冲液(0.5 × TBE) 制备 1% 琼脂糖凝胶 ,将 5 ~ 10 μL PCR 扩增产物分别和 1 ~ 2 μL 6 × Loading Buffer 上样缓冲液混合 ,进行点样。用 100 bp Ladder DNA Marker 作为分子标记 ,10 V/cm 电泳 50 min 后凝胶成像仪观察并分析记录。

ABI 3730XL 分析: 将 PCR 产物稀释 10 倍后 ,取充分混合后 PCR 产物 1.5 μL 于 96 孔裙边板中 ,然后在每孔中分别加上 10 μL 去离子甲酰胺(含 1% 的 GS3730_500 分子量内标) ,95℃ 变性 5 min ,4℃ 保温 10 min ,3 000 r/min 离心 10 min ,在 ABI 3730XL 上进行自动荧光检测。预电泳 15 kV 2 min; 2 kV 电泳进样 10 s; 电泳 15 kV 20 min ,分析输出数据。

MultiNA 电泳分析: 将 PCR 产物稀释 10 倍后 ,取 10 μL 产物于 96 孔板中 ,在 MultiNA 主机中安装好 4 块微芯片 ,加入 DNA 500 kit 和分离缓冲液 ,电泳 2 h ,分析输出数据。

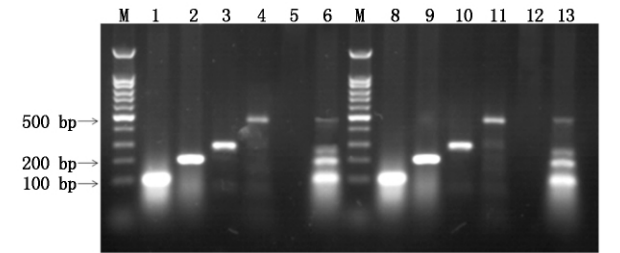
QIAxcel 电泳分析: 取 10 μL PCR 产物加入 96 孔板中 ,放入 QIAxcel 仪器卡槽中 ,安装好预置胶夹 ,在内标孔中加入 20 μL 内标 ,开机电泳 40 min ,分析输出数据。

2 结果与分析

2.1 转基因玉米琼脂糖检测结果

将 4 种转基因玉米分为 2 次重复(I 和 II) ,分别进行 PCR 试验。经过反复对扩增体系中关键因

素进行摸索和优化 ,最终确立一套稳定的最优化扩增体系。由琼脂糖电泳结果发现 ,4 种转基因玉米材料均可观测到高特异性的有效扩增条带 ,所获目的条带预期与大小一致(NK603 为 108 bp ,Bt11 为 207 bp ,Tc1507 为 279 bp ,Mon810 为 466 bp) 。



M. 100 bp ladder DNA Marker; 1 ,8. NK603 扩增产物; 2 ,9. Bt11 扩增产物; 3 ,10. Tc1507 扩增产物; 4 ,11. Mon810 扩增产物; 5 ,12. 阴性对照; 6 ,13. 四重 PCR 扩增结果。

M. 100 bp ladder DNA Marker; 1 ,8. NK603 PCR products; 2 ,9. Bt11 PCR products; 3 ,10. Tc1507 PCR products; 4 ,11. Mon810 PCR products; 5 ,12. Negative control; 6 ,13. Mixture of four PCR products.

图 1 转基因玉米 PCR 产物琼脂糖电泳分析结果
Fig.1 Agarose electrophoresis results of four kinds of transgenic maize PCR production

2.2 多重 PCR 琼脂糖检测结果

为简化检测步骤、提高检测效率 ,将提取的 DNA 模板进行多重 PCR 检测。参考前人研究^[9-11] ,经过对缓冲液浓度、模板浓度、退火温度以及引物浓度等条件进行试验设计 ,最终确定了最优化试验方案。从图 1 中可以看出 ,NK603、Bt11、Tc1507 和 Mon810 特异引物在同一 PCR 反应体系中进行扩增反应 ,可以获得 108 207 279 466 bp 产

物条带清晰,大小一致,没有非特异性条带产生,说明 NK603、Bt11、Tc1507 和 Mon810 可以在同一体系中完成多重 PCR 反应(图 1)。

2.3 ABI3730XL 分析结果

通过 ABI 3730XL 对样品进行检测,4 种转基因玉米材料均可观测到高特异性的有效扩增条带,所获目的条带与预期大小一致(图 2),通过 Genemapper 软件,选定分析方法及分子量内标,对 Data Collection 软件收集的原始数据进行分析,系统将各峰值的位置与其泳道中的分子量内标进行比较得出。

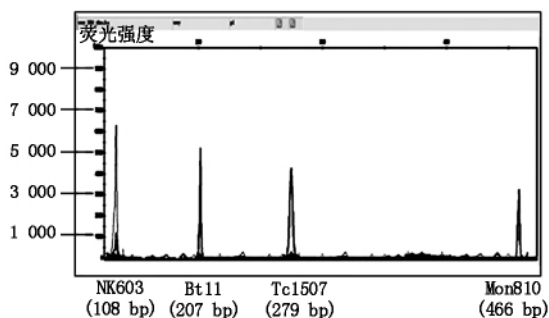


图 2 转基因玉米 PCR 产物毛细管荧光电泳检测结果

Fig. 2 Capillary electrophoresis fluorescent light results of four kinds of transgenic maize PCR production

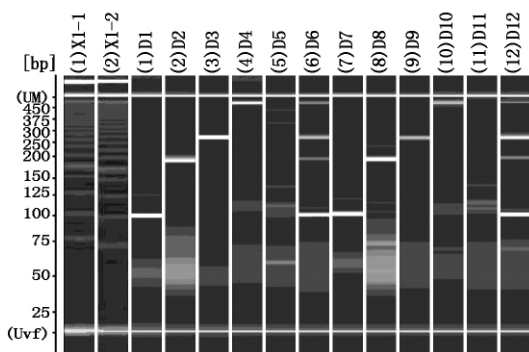


图 3 转基因玉米 PCR 产物 MultiNA 分析结果

Fig. 3 MultiNA analyzer results of four kinds

of transgenic maize PCR production

2.4 MultiNA 分析结果

通过 MultiNA 对样品进行检测,4 种转基因玉米材料均可观测到高特异性的有效扩增条带,所获目的条带与预期大小一致(图 3),产生数据为模拟胶图和峰值图 2 种形式,并对各泳道中的条带进行浓度分析导出在 Excel 表中。

2.5 QIAxcel 电泳分析结果

通过 QIAxcel 对样品进行检测,4 种转基因玉米

材料均可观测到高特异性的有效扩增条带,所获目的条带与预期大小一致(图 4),产生数据为模拟胶图和峰值图 2 种形式,并对各泳道中的条带进行浓度分析导出在 Excel 表中。

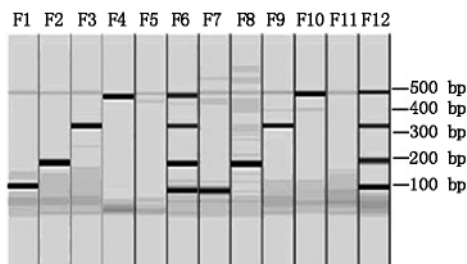


图 4 转基因玉米 PCR 产物 QIAxcel 分析结果

Fig. 4 QIAxcel analysis results of four kinds of transgenic maize PCR production

3 讨论

3.1 三种核酸分析仪的 DNA 片段分析特征

本研究将 4 种转基因玉米 NK603、Bt11、Tc1507 和 Mon810 的基因组 DNA 提取后,使用事件特异性引物进行扩增,扩增产物分别用 ABI 3730XL、岛津 MultiNA、QIAGEN QIAxcel 这 3 种核酸分析仪进行分析,通过各自的系统软件将所得到的数据进行收集、整合以及分析,对比发现,这 3 种仪器分析的结果均比普通琼脂糖凝胶分析产生的结果更加精细、全面,不仅可以直接反映出产物的大小,还能够对产物进行定量分析。

毛细管荧光标记技术是通过带有荧光标记基团的引物参与扩增反应,产生带有荧光标记的产物,并通过毛细管电泳分离后,将各峰值的位置与其泳道中的分子内标进行比较得出扩增产物的大小^[12],该技术已在分子标记、群体划分等方面得到广泛应用^[13-14]。岛津 MultiNA、QIAGEN QIAxcel 均采用了 SYBR Gold 染料对 PCR 产物进行标记,前者是将产物在特制的微芯片中进行分离,通过与同一泳道中的分子内标进行比对分析后输出模拟胶图和峰值图 2 种形式数据;后者则通过毛细管对产物进行分离。SYBR Gold 是一种特有的能激发荧光的非对称花青染料,与 DNA 具有很高的亲和力,并且结合后能够极大程度地增强荧光信号。据统计,SYBR Gold-DNA 复合物激发的荧光信号强度是 EB-DNA 复合物的 1 000 多倍^[15]。

3.2 三种核酸分析仪应用优缺点比较

从分析灵敏度上看,由于 3 种核酸分析仪都采

用特有的荧光标记,其灵敏度都远远高于普通琼脂糖中的 EB,都可以识别低于 1 ng/ μ L 以下的片段,而这个浓度的 DNA 片段在琼脂糖上是无法检测的。

从分辨率上看,3 种核酸分析仪的理论分辨率都可达到 1 bp,每种核酸分析仪检测的每个电泳样品中均含有分子量内标,各泳道的 DNA 片段大小直接与其泳道中的分子量内标相比就可以精确获得,而琼脂糖电泳不同样品 DNA 片段大小要与已知的分子量 Marker 进行比较才能得出大概的 DNA 分子量。

从分析周期角度来看,由于 3 种仪器使用的分析模块不同,在分析周期上也存在着一定的差异。ABI 3730XL 采用 96 道毛细管分析模块,可以对 96 个样品同时进样、电泳并产生数据,96 个样品的分

析时间为 20 min 左右;QIAxcel 采用的是 12 道毛细管分析模块,分析周期要略长一些,分析 96 个样品的总时间为 40 min 左右;岛津 MultiNA 采用的分析模块与前 2 种不同,为四芯片联用单孔进样分析模式,经过测试一个样品从进样到数据的产生时间为 75 s,完成 96 个样品的分析需要 2 h 左右。

此外,在自动化程度、分析成本、核酸质量要求等方面也存在一定的差异。如 ABI 3730 在分析周期和自动化程度等方面都占有优势,但因其其在扩增体系中加入荧光引物,故对 DNA 模板质量相对要高很多。通过比较发现,不同检测系统都具有各自的特点,适合不同试验的需要(表 2)。

表 2 不同核酸分析系统的主要优缺点比较

Tab. 2 Contrast of several kinds of nucleic acid analyzer merits and demerits

	分辨率 Resolution	灵敏度 Sensitivity	分析周期 Alalysis cycle	自动化程度 Automation degree	分析成本 Cost analysis	核酸质量要求 Nucleic acid quality requirements
Agarose Gel	低	低	慢	低	低	适中
ABI 3730XL	高	高	快	高	高	高
MultiNA	高	高	适中	较高	适中	适中
QIAxcel	高	高	较快	适中	较高	适中

总的来说,ABI 3730XL、岛津 MultiNA、QIAGEN QIAxcel 检测系统都能够自动灌胶、上样、电泳和使用软件收集数据,与普通的琼脂糖电泳相比,省时省力,能有效地将实验人员从低效率、大强度的工作中释放出来。并且 3 种系统软件都能够校正各毛细管(微芯片)间的电泳差异,从最大程度上减少了试验的系统误差,其具有高精度、高通量、高自动化程度等优点,尤其适用于大规模材料高通量分析研究。

参考文献:

[1] 刘晓鑫,谢传晓,赵琦,等. 基于 SSR 荧光标记技术的玉米群体混合样本基因频率分析方法[J]. 中国农业科学 2008 41(12): 3991-3998.

[2] 易红梅,王凤格,赵久然,等. 玉米品种 SSR 标记毛细管电泳荧光检测法与变性 PAGE 银染检测法的比较研究[J]. 华北农学报 2006 21(5): 64-67.

[3] 汪正范. 从第 13 届 BCEIA 看分析测试仪器进展[J]. 现代仪器 2011(12): 92-95.

[4] Claire L, McMurray, Katherine J, et al. Rapid, automated epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Microbiological Methods, 2010 80(1): 109-111.

[5] 农业部科技发展中心,农业部 869 号公告-43-2007 转基因植物及其产品成分检测耐除草剂玉米 NK603 及其衍生品定性 PCR 方法[S]. 北京: 全国农业转基因生物安全管理标准技术委员会 2007.

[6] Isabel T, Pieter W, Marc V, et al. Event-specific plasmid standards and real-time PCR methods for transgenic Bt11, Bt176 and GA21 maize and transgenic GT73 canola [J].

Agric Food Chem 2005 53(8): 3041-3052.

[7] 农业部科技发展中心,农业部 869 号公告-7-2007,转基因植物及其产品成分检测抗虫和耐除草剂玉米 Tc1507 及其衍生品定性 PCR 方法[S]. 北京: 全国农业转基因生物安全管理标准技术委员会 2007.

[8] 国家认证认可监督管理委员会,SN/T 1196-2003,玉米中转基因成分定性 PCR 检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社 2004.

[9] 曹际娟,朱水芳,曹远银. GA21 转基因玉米实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 中国生物工程杂志 2003, 23(8): 87-95.

[10] Onishi M, Matsuoka T, Kodama T. Development of a multiplex polymerase chain reaction method for simultaneous detection of eight events of genetically modified maize [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2005 53(25): 9713-9721.

[11] Sunlan Bai, Jie Zhang, Shucheng Li, et al. Detection of six genetically modified maize lines using optical thin-film biosensor chips [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry 2010, 58: 8490-8494.

[12] 许琪,吴冠芸. 毛细管电泳与核酸分析[J]. 国外医学: 分子生物学分册 2000 22(2): 120-122.

[13] 张海泉,张宝石. 山羊草及普通小麦遗传多样性的研究[J]. 沈阳农业大学学报 2004, 35(3): 165-169.

[14] Reif J C, Melchinger A E, Xia X C. Genetic distance based on simple sequence repeats and heterosis in tropical maize population [J]. Crop Science 2003 43: 1275-1282.

[15] 余亮,吴青核. 核酸荧光染料,不光灵敏,更要安全[N]. 生物通 2009, 11: 19.