

使用 MultiNA™ 检测基因组编辑多碱基突变

随着基因组编辑技术的出现，对靶基因进行特异性破坏或者引入靶基因已经很容易。

确认基因组编辑结果时，需要确认靶基因上是否存在突变。最可靠的方法是直接分析序列，但是当对多个样本进行验证时这种方法成本很高。有一种简易方法是，通过电泳分析野生型和突变型的异源双链体，并利用同源双链体与异源双链体之间的迁移率差异进行确认（异源双链体迁移率分析：HMA 法）。该方法作为一种可以通过使用全自动电泳装置轻松确认基因组编辑结果的工具得到了普及。

但是，使用 HMA 法时，如果多碱基（1 ~ 5 bp）存在差异，则会抵消同源双链体和异源双链体的立体结构形成的迁移率差异，存在无法确认编辑结果的情况。在这种情况下可以使用一种被称为 T7 Endonuclease I 或 Cel1 酶的方法。上述酶具有识别和切割双链 DNA 错配的活性。普遍认为这种酶还可以识别多碱基的错配，对检测使用 HMA 等无法检测的突变是有效的。在这里为您介绍使用微芯片电泳系统简便、快速地检测 T7 Endonuclease I 识别错配的切割实例。

Y. Sogabe

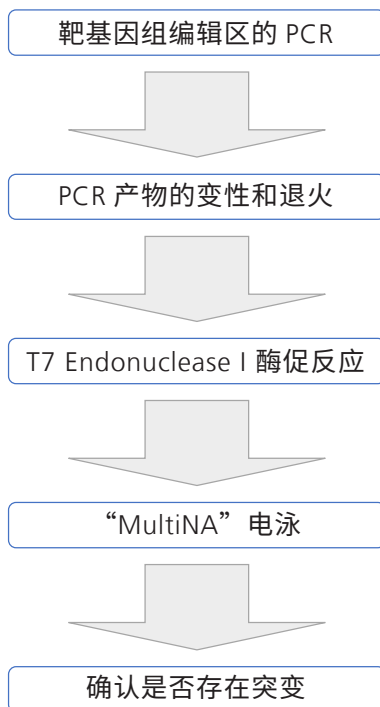


图 1 分析流程



图 2 DNA/RNA 分析用微芯片电泳系统 MultiNA™

■ 标准样品的准备

分析时在人 β- 球蛋白基因 (HBB@) 及人 β- 球蛋白基因座转录本 3 (非蛋白编码) (BGLT3) 中随机设定了 110 bp 片段，将其作为野生型的模板。通过从野生型序列中插入或缺失 1-5 个碱基来制备五种突变型 DNA。将其分别插入质粒后进行合成。实施 PCR 时，野生型和各 5 种突变型的 2×10^8 拷贝以 1: 1 的比例混合，用作野生型 - 突变型异源双链样品。

■ 方法

• PCR

PCR 按照表 1 的条件实施。

表 1 PCR 分析条件

PCR 反应液	
Sample	0.5 μL
2xBuffer	5.0 μL
dNTPs (2 mM)	1.0 μL
Primer F (2 μM)	1.0 μL
Primer R (2 μM)	1.0 μL
DW	1.4 μL
KOD FX	0.1 μL
Total	10.0 μL
PCR 循环	
98 °C	1 min
98 °C	10 sec
60 °C	15 sec
68 °C	15 sec
68 °C	7 min
4 °C	∞

} x35 cycles

• 形成异源双链体

使用热循环仪进行 PCR 产物的变性和退火。反应条件参照日本基因公司生产的 T7 Endonuclease I reaction Mix 的使用说明。

95°C	5min
95°C→85°C	2°C/sec
85°C→25°C	0.1°C/sec

• 酶促反应 (T7 Endonuclease I)

取形成了异源双链体的 PCR 产物 9 μL, 加入 1 μL T7 Endonuclease I reaction Mix, 37 °C 反应 60 min。

• 电泳

使用微芯片电泳系统 MCE-202 MultiNA 对使用 T7 Endonuclease I 酶切处理的 PCR 产物进行电泳, 确认其尺寸。出于比较的目的, 对未使用 T7 Endonuclease I 处理的 PCR 产物也进行了电泳。使用 MultiNA 分析时采用了 MultiNA 专用的 DNA-500 试剂盒。

■ 分析结果

使用 MultiNA 电泳获得了如图 3 所示的清晰的分析结果 (凝胶图像)。样品名称中带 Δ1···Δ5 标识的部分表示插入或缺失的数量。

(a) 是 T7 Endonuclease I 处理前的 PCR 产物的凝胶图像。在实施热变性、退火处理之前, 具有碱基缺失的 Δ5 已经检测到异源双链体, 因此, 即使不进行 T7 Endonuclease I 处理, 也可以确认发生了突变。

(b) 是 T7 Endonuclease I 处理后的 PCR 产物的凝胶图像。在 Δ1 至 Δ5 的所有样品中, 分别检测到了使用 T7 Endonuclease I 切割后的片段。每个已消化的片段尺寸不同, 是因为碱基的插入或缺失位置不同。关于检测到异源双链体的 Δ5, 可以观测到使用 T7 Endonuclease I 酶切后异源双链体消失。

■ 总结

如本分析例所示, 在通过几个碱基差异难以分析野生型纯合子和突变型纯合子的尺寸差异时, 使用 T7 Endonuclease I 酶切后检测其片段, 可以更加简单地判定是否存在突变。

在实验动物个体数量多的情况下, 判定是否存在基因组编辑需要花费更多的时间和成本。使用 MCE-202 MultiNA 进行自动分析可以大幅减轻作业负担。

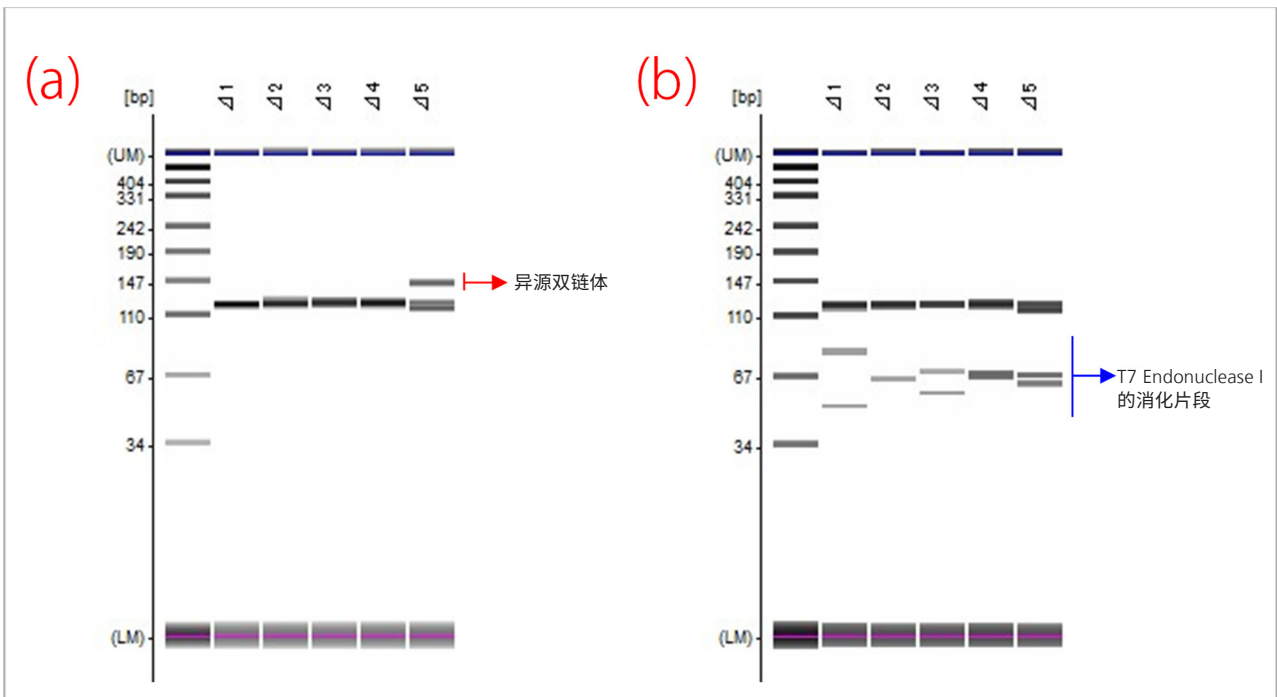


图 3 MultiNA 的电泳结果 (凝胶图像)
(a) PCR 结束后的凝胶图像、(b) 经过 T7 Endonuclease I 处理的 PCR 产物的凝胶图像

※ 本方法可能因为目标序列及其周边序列的原因导致分析结果出现差异。

岛津应用云



MultiNA 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。
此外, 本文中出现的公司名称和产品名称是各公司的商标及注册商标。
本文中可能对“TM”和“®”进行了省略。



岛津企业管理 (中国) 有限公司
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

※ 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
※ 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2020 年 1 月