Application News

No.B65

微芯片电泳

微芯片电泳 MultiNA 分析异源双链迁移率（Heteroduplex Mobility Assay）

前言

随着利用转录激活样效应因子核酸酶(Transcription Activator-Like Effector Nuclease) 和 CRISPR/CAS9 (Clustered Regularly InterspacedShort Palindromic Repeats/CRISPR Associated Proteins 9) 的基因组编辑工具的诞生，使得对靶基因进行特异性的破坏和引入基因成为可能。

由于能适用于微生物、动物、植物等过去难以进行基因修饰的生物，因此其普及速度十分迅速。

评估靶部位有无发生突变的方法包括直接分析序列的方法以及使用酶识别切割不匹配双链的方法，无论哪种方法均费时费力，成本相对较高。

HMA（异源双链迁移率分析）是一种简便、迅速、以低成本实施的方法（图 1）。在通常的电泳中，DNA 是完全互补的同源双链体，其迁移率取决于分子量（大小）。另一方面，双链中其中一条链的一部分发生了突变的 DNA，其不匹配的部分不形成互补链，而是成为异源双链 DNA。异源双链 DNA 的不匹配部分与同源双链 DNA 具有不同的立体结构。因此，异源双链 DNA 在电泳中呈迁移率较低的趋势。HMA 能利用上述现象测定有无发生突变，并通过电泳判断基因型。

本应用程序将使用模型 DNA，通过 DNA/RNA 分析用微芯片电泳装置 MCE-202 MultiNA，对异源双链迁移率 HMA（Heteroduplex Mobility Assay）检测的分析例进行介绍。

Sogabe

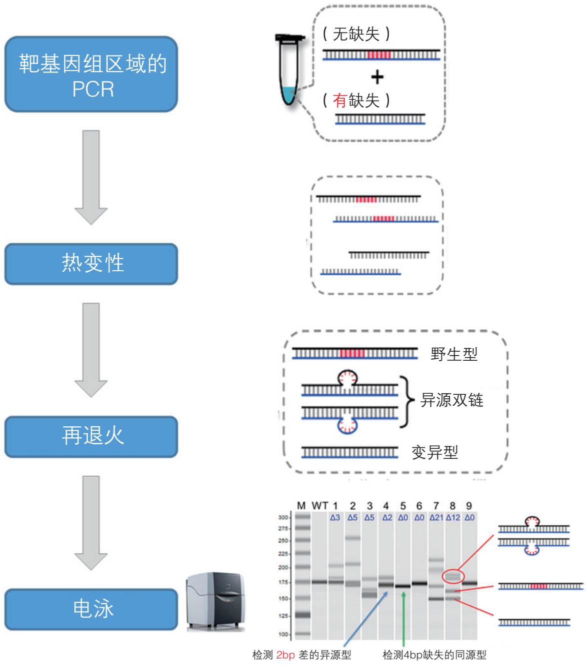

图 1 HMA 的流程

标准样品的准备

以 110 bp 的 DNA 片段作为参考，制作缺失两个碱基的 108 bp 和缺失五个碱基的 105 bp 的模型 DNA。将每种模型 DNA 插入质粒中，用作 PCR 扩增的模板。各模型 DNA 的碱基序列如下所示。“*”表示缺失。

> 模型 DNA110 bp
ACACAACTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTG

> 模型 DNA108 bp
ACACAACTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCC**AGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTG

> 模型 DNA105 bp
ACACAACTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTC*****GAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTG

方法

·反应溶液

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 ℃	1 min	
98 ℃	10 sec	x30 cycles
60 ℃	15 sec	x30 cycles
68 ℃	15 sec	x30 cycles
68 ℃	7 min	
4 ℃	∞	

●形成异源双链

将遵循上一页条件反应的 PCR 产物以 110 bp–108 bp、110 bp–105 bp、108 bp–105 bp 的组合分别按 1:1 的比例混合。将混合产物于 95℃下静置 5 分钟待其变性后，以 0.1℃ /sec 的速度冷却至 5℃，形成异源双链。

●电泳

采用微芯片电泳装置 MultiNA 对 PCR 产物和形成异源双链的样本进行分析。分析的荧光染料选用 SYBR Gold，分离缓冲液选用 DNA–500 试剂盒。

■分析结果

根据 MultiNA 的电泳，得到了类似于图 2 的清晰分析结果（凝胶图像）。由左至右的前 3 个凝胶图像分别为 110 bp、108 bp、105 bp 的 PCR 产物的分析结果。从左起第四个开始分别为 110–108 bp、110–105 bp、108–105 bp 的 HMA 的分析结果。

在形成了异源双链的 110–108 bp、110–105 bp 以及 108–105 bp 的 HMA 中分别检测出了多个条带。

高分子侧的条带（图 2 的红框）相当于异源双链的条带。确认了不匹配的碱基数越多，越呈现出在高分子侧检测出异源双链条带的倾向。尤其是在 110–108 bp 的 HMA 的结果中，低分子侧的条带为来自 108 bp 和 110 bp 的混合物的条带，高分子侧的条带则相当于异源双链的条带。这样，MultiNA 成功分离了 2 bp 差的异源双链。

MultiNA 以电泳图谱（波形数据）的形式获取电泳结果的数据。通过数据浏览软件（MultiNA Viewer）的功能，使各样本的电泳图谱的选择和重叠显示成为可能。图 3 为对组合使用 HMA 的 2 种 PCR 产物和 HMA 的分析结果进行了比较的电泳图谱。

相比于琼脂糖凝胶电泳，MultiNA 的分离度和再现性均优于前者，HMA 样本中的同源双链和各自的 PCR 产物的波峰一致。

此外，电泳图谱会根据峰面积自动计算摩尔浓度。利用该功能比较异源双链和同源双链的摩尔浓度，可简单的在基因组编辑中得到各个体的突变率。

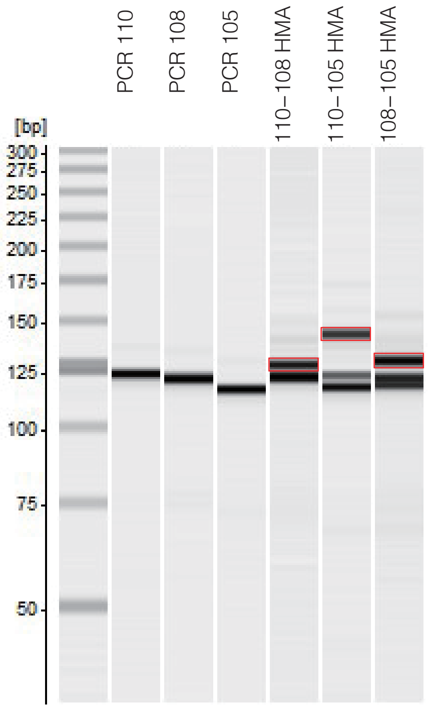

图 2 通过 MultiNA 得到的 PCR 产物和 HMA 的凝胶图像

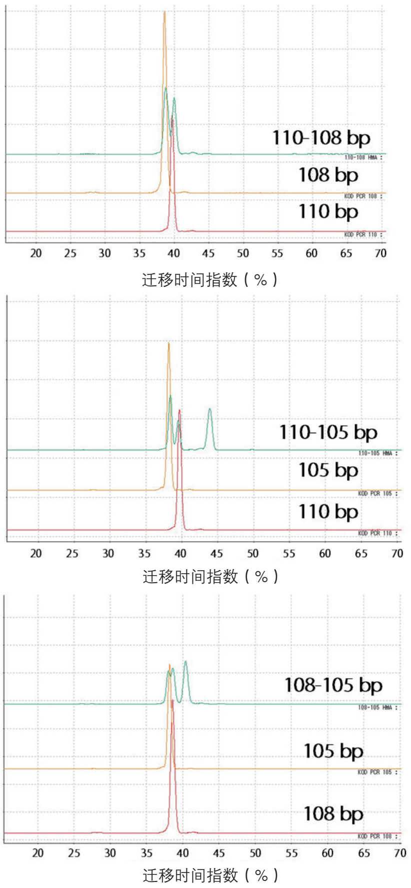

图 3 PCR 产物和 HMA 的迁移率比较（电泳图谱）

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：2017 年 8 月