

DNA 外显子的定性与定量分析

MultiNA-002

摘要：本文利用 MultiNA 微芯片电泳对 12 个经过不同引物相同 PCR 反应和限制性内切酶酶切后可能含某 DNA 外显子片段的样品进行定性与定量，发现第 10-12 个样品在 104 bp，101 bp 和 102 bp 处各有 1 个浓度较高的片段，推断应该为同一片段，并且是目标外显子，尺寸约为 102 bp，浓度分别为 1.73 ng/μL，2.16 ng/μL，和 1.37 ng/μL。

关键词：MultiNA 微芯片电泳 外显子

外显子 (expressed region) 是真核生物基因的一部分，它在剪接 (Splicing) 后仍会被保存下来，并可在蛋白质生物合成过程中被表达为蛋白质。外显子是最后出现在成熟 RNA 中的基因序列，又称表达序列。既存在于最初的转录产物中，也存在于成熟的 RNA 分子中的核苷酸序列。术语外显子也指编码相应 RNA 外显子的 DNA 中的区域。所有的外显子一同组成了遗传信息，该信息会体现在蛋白质上。

剪接方式并不是唯一的，所以外显子只能在成体 mRNA 中被看出。即使是使用生物信息学方法，要精确预测外显子的位置也是非常困难的。真核生物的基因，其线性表达被内含子阻断，这就是所谓的断裂基因 (split gene)，该现象的发现者 Richard J. Roberts 和 Phillip A. Sharp 获得了 1993 年诺贝尔奖。

在反式剪接中，不同 mRNA 的外显子可以被接合在一起。外显子在剪接 (Splicing) 后仍会被保存下来，并可在蛋白质生物合成过程中被表达为蛋白质。外显子是最后出现在成熟 RNA 中的基因序列，又称表达序列。既存在于最初的转录产物中，也存在于成熟的 RNA 分子中的核苷酸序列。术语外显子也指编码相应 RNA 外显子的 DNA 中的区域。简言之，外显子就是指真核细胞的基因在表达过程中能编码蛋白质的核苷酸序列。关键概念：比较不同物种的相关基因，发现相应的外显子序列通常是保守的，而内含子序列则很少保守。编码蛋白质的序列通常处于选择压力之下，内含子由于没有选择压力，因此比外显子的进化得多。通过确定在多种生物中出现的片段来鉴定编码区域，而外显子的保守性可以作为这种鉴定的基础。

PCR 技术的基本原理类似于 DNA 的天然复制过程，其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR 由变性 -- 退火 -- 延伸三个基本反应步骤构成：

①模板 DNA 的变性：模板 DNA 经加热至 93℃ 左右一定时间后，使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离，使之成为单链，以便它与引物结合，为下轮反应作准备；②模板 DNA 与引物的退火 (复性)：模板 DNA 经加热变性成单链后，温度降至 55℃ 左右，引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合；③引物的延伸：DNA 模板 -- 引物结合物在 TaqDNA 聚合酶的作用下，以 dNTP 为反应原料，靶序列为模板，按碱基互补配对与半保留复制原理，合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链，重复循环变性 -- 退火 -- 延伸三过程就可获得更多的“半保留复制链”，而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2~4 分钟，2~3 小时就能将待扩目的基因扩增放大几百万倍。

PCR 反应扩增出了高的拷贝数，下一步检测就成了关键。荧光素 (溴化乙锭, EB) 染色凝胶电泳是最常用的检测手段。电泳法检测特异性是不太高的，因此引物二聚体等非特异性的杂交体很容易引起误判。但因为其简捷易行，成为了主流检测方法。近年来以毛细管电泳结合荧光检测为代表的分析方法，有逐渐取代电泳法的趋势。另外在 PCR 的过程中，由于条件难于最优化，影响因素较多，所以经常会出现假阴性结果，非特异性扩增带，片状拖带或涂抹带的问题。

本文利用 MultiNA 微芯片电泳对 PCR 产物进行了定性与定量分析，并由此鉴定了外显子片段。

实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津 MultiNA microchip electrophoresis instrument; Eppendorf tube; 1×TE Buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)。

1.2 分析条件

样品: 12 个经过不同引物相同 PCR 反应和限制性内切酶酶切可能含某 DNA 外显子的未知样品 (BGI 提供), 分别溶解于 1×TE Buffer

检测模式: DNA-1000 模式

空白对照: 1×TE Buffer

试剂盒: DNA-1000 reagent kit(Shimadzu Inc)

DNA 染料: SYBR Gold Nucleic Acid Stain (Invitrogen)

DNA ladder: Φ ×174 DNA/Bsu RI (Hae III) ladder (Fermentas)

MultiNA microchip: 4 块 (Shimadzu Inc)

结果讨论

2.1 样品凝胶成像

图 1 可见, 12 个样品中, G3, G4, G5, G6, G10, G11, G12 条带清晰可见, 可能含有所需要的外显子; G1, G2, G8, G9 条带宽并模糊, 可能为弥散性片段; G7 条带无法识别, 可能因为片段浓度太低或根本没有片段。

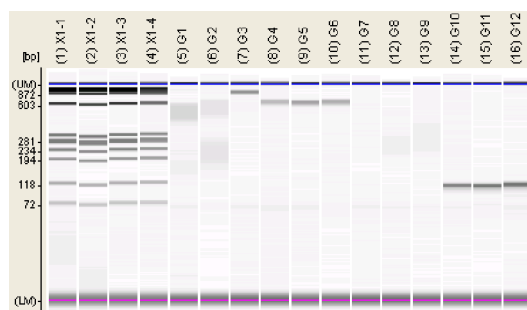


图1 样品凝胶成像

(X1-1, 2, 3, 4均为 Φ ×174 DNA/Bsu RI (Hae III) ladder;G1-12分别为第1-12个样品)

2.2 样品色谱图

从图 2 和图 3 可见 DNA 片段的迁移指数, 迁移指数越小, 片段尺寸越小, 越趋向于 lower marker(LM); 反之, 迁移指数越大, 片段尺寸越大, 越趋向于 upper marker(UM)。

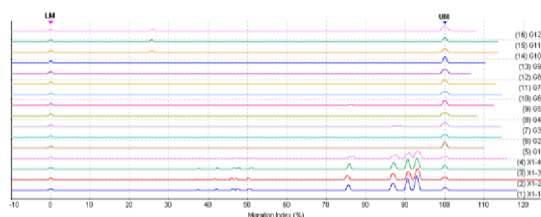


图2 样品Single模式色谱图

(X1-1, 2, 3, 4均为 Φ ×174 DNA/Bsu RI (Hae III) ladder;G1-12分别为第1-12个样品)

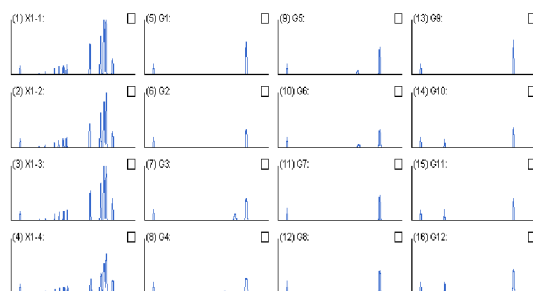


图3 样品Multi模式色谱图
 (X1-1, 2, 3, 4均为 Φ 174 DNA/Bsu RI (Hae III) ladder; G1-12分别为第1-12个样品)

2.3 样品片段尺寸与对应浓度

表1 样品片段尺寸与对应浓度
 (G1-12分别为第1-12个样品)

样品号	尺寸(bp)	浓度(ng/ μ L)
G1	460	0.52
G1	151	0.08
G2	504	0.29
G2	217	0.41
G3	955	0.77
G4	570	0.44
G5	578	0.69
G6	596	0.66
G7	51	0.03
G8	242	0.07
G9	280	0.1
G10	104	1.73
G11	101	2.16
G12	102	1.37

MultiNA Viewer 软件可对片段自动积峰进行定性与定量，而对于浓度小的片段或弥散性片段可手动积峰进行定性与定量。G1 在 460 bp 处有一个浓度较低的弥散性片段，151 bp 片段浓度很低可能为背景；G2 在 217 bp 和 504 bp 两处各有 1 个浓度较低的弥散性片段；G3, G4, G5, G6 各在 955 bp, 570 bp, 578 bp, 596 bp 处有 1 个片段，但浓度都小于 1 ng/ μ L；G7 的 51 bp 片段浓度很低，可能为背景；G8 和 G9 各在 242 bp 和 280 bp 处有 1 个浓度较低的弥散性片段；G10, G11 和 G12 在 104 bp, 101 bp 和 102 bp 处各有 1 个浓度较高（均大于 1 ng/ μ L）的片段，推断应该为同一片段，并且是目标外显子，尺寸约为 102 bp (AVERAGE(104 bp, 101 bp, 102 bp))，后经 BGI 证实推断正确。

结论

G1, G2, G8 和 G9 的弥散性 DNA 片段出现的原因可能为 PCR 反应错误或 PCR 前处理过程受干扰；G3, G4, G5, 和 G6 的大尺寸 DNA 片段出现的原因可能为限制性内切酶酶切反应错误或 PCR 反应错误；G7 无片段可能是由 PCR 反应未启动造成的。