

利用安捷伦 2200 TapeStation 及基因组 DNA ScreenTape 分析高分子量的基因组 DNA

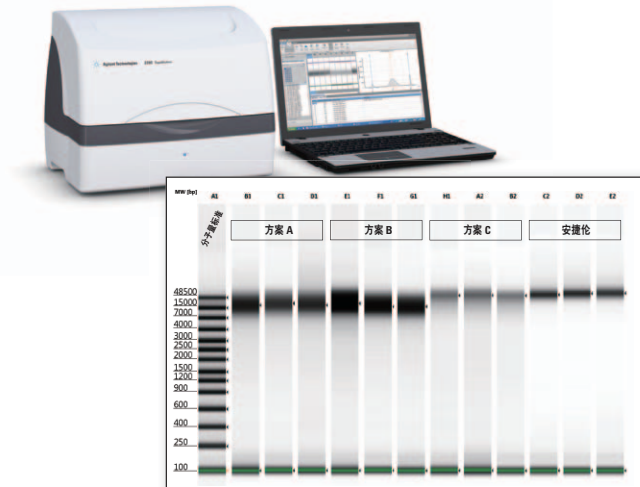
应用简报

核酸分析

作者

Arunkumar Padmanaban
安捷伦科技有限公司
印度班加罗尔

Donna McDade Walker
安捷伦科技有限公司
英国爱丁堡



前言

本应用简报展示了应用安捷伦基因组 DNA ScreenTape 分析法配合安捷伦 2200 TapeStation 系统可简便地对基因组 DNA 样品进行分子量测定、定量分析及质量评估。完整、高质量的基因组 DNA 及精准的样品定量对很多应用而言都必不可少，特别是微阵列比较基因组杂交及新一代测序技术。



Agilent Technologies

实验部分

细胞培养

采购 HEK293 细胞系 (CRL1573, ATCC) 后, 采用含有 10% FBS 及 1% 青链霉素的 MEM 培养基 (印度西格玛奥德里奇公司) 进行培养。在 37 °C 及 5% CO₂ 培养箱中培养四天后, 收获 80% 融合度的细胞。每个细胞团块包含约 1 百万个细胞, 冻存于 -80 °C 备用。

基因组 DNA 提取

采用四种提取试剂盒提取 HEK293 细胞团块中的基因组 DNA (gDNA): 安捷伦 DNA 提取试剂盒 (200600) 来自安捷伦科技。其余的提取试剂盒包括 DNeasy 血液与组织试剂盒 (69504, 凯杰公司), PureLink 基因组 DNA 小量提取试剂盒 (K1820-00, 英杰公司) 及 Wizard SV 基因组 DNA 试剂盒 (A2360, 普洛麦格公司)。这些试剂盒均购自其各自的供应商, 并按照生产商指南操作。利用凯杰及英杰试剂盒的提取重复了三次, 而利用普洛麦格及安捷伦试剂盒的提取重复了两次。

基因组 DNA 分析: 定量

提取所得的基因组 DNA 采用 Qubit 1.0 荧光计, 并应用 Qubit dsDNA BR 分析试剂盒 (Q32850) 按照生产商指南进行定量。此外, 还应用 NanoDrop 1000 分光光度计对基因组 DNA 进行了定量。

采用安捷伦基因组 DNA ScreenTape 分析法进行定量, 分子量测定及完整性分析

2200 TapeStation 系统 (G2964AA), 基因组 DNA ScreenTape (5067-5365) 及基因组 DNA 试剂 (5067-5366) 均来自安捷伦科技。提取所得的 gDNA 采用基因组 DNA ScreenTape 分析法进行分析。将 1 μL gDNA 样品与 10 μL 基因组 DNA 样品缓冲液混合, 以制备样品。将 3 μL 基因组 DNA 分子量标准置于 8 通道胶条的第一个管中, 然后在其他管中加入样品。所得胶条高速涡旋 5 秒后, 离心, 并放入 2200 TapeStation 仪器。每个单独提取的样品均重复分析三次。

结果与讨论

利用安捷伦基因组 DNA ScreenTape 分析法配合 2200 TapeStation 系统对四种来自不同供应商的基因组 DNA 提取试剂盒的效率进行评价。将其命名为方案 A、B、

C 及安捷伦。每种情形下都测定了基因组 DNA 浓度、分子量、样品完整性, 进而确定了总产率及质量。

基因组 DNA 定量

基因组 DNA ScreenTape 分析法使用较低的分子量标记进行样品定量。样品重复分析三次, 并对每种提取试剂盒收集定量数据。此外, 样品还采用 Qubit dsDNA 宽范围分析及 NanoDrop 分光光度计进行定量以比较结果。将 Qubit、NanoDrop 及基因组 DNA ScreenTape 分析法各自所得的均值作图, 并进行比较, 如图 1 所示。

NanoDrop 测得浓度大于 2200 TapeStation 及 Qubit 测得浓度, 这是由于该系统不能区分双链 DNA 与单链 DNA 或 RNA。此外, 基于 UV 的测量还会受到其它因素的影响, 例如盐, 会影响吸光度读值。相比之下, Qubit 及基因组 DNA ScreenTape 分析法采用一种可特异性结合双链 DNA 的荧光染料。这意味着 2200 TapeStation 只会给出基因组 DNA 的浓度。数据表明

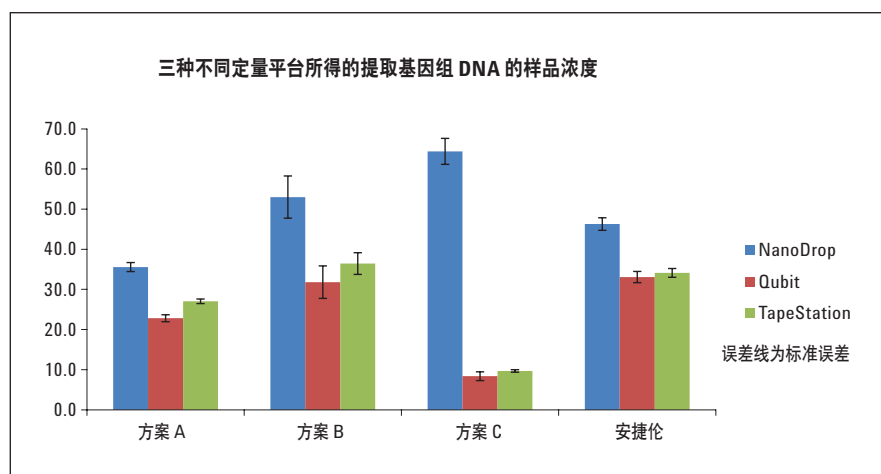


图 1
每种提取试剂盒所得的定量均值 (以 ng/μL 表示), 数据分别由安捷伦 2200 TapeStation、NanoDrop 及 Qubit 仪器所得

ScreenTape 及 Qubit 测得的结果十分相似, 最小平均差为 1%, 最大平均差为 5%。针对每一种试剂盒, 由三个平台得出的 CV 百分率都很相似, 说明误差来自于每个三次重复提取样品间的差异而非不同平台的性能差异。

基因组 DNA 分子量分布分析

利用基因组 DNA ScreenTape 分析法进行样品定量还可提供重要的附加信息, 包括样品分子量分布及所提取的基因组 DNA 的质量。而这些信息在采用光度测定或荧光测量技术时无法获得。从 2200 TapeStation 软件中可简便地导出如图 2 所示的胶图, 可说明四种不同提取方法所得的基因组 DNA 的质量并不相同。

图 2 展示了每种提取试剂盒对每个样本的三次重复提取, 并提供了各自的分子量分布信息。从中可很直观的看出基因组 DNA 样品完整性的差别; 在 ScreenTape 泳道中, 高度完整的基因组 DNA 表现为一条尖锐、致密的条带, 而降解的基因组 DNA 则表现为弥散拖尾, 延伸至更小的分子量范围。对每个样品而言, 这些结果可在不到 2 分钟内呈现, 可用于快速评价基因组 DNA 样品的完整性。

图 3 盒须图中的数据采用了 2200 TapeStation 软件所得的分子量信息, 并导出为 CSV 文件。利用这些数据图可方便地查看由提取方法所致的 DNA 剪切。该图展示了每种试剂盒提取所得的基因组 DNA 的分子量分布, 结果由基因组 DNA ScreenTape 分析所得。须 (whisker) 图

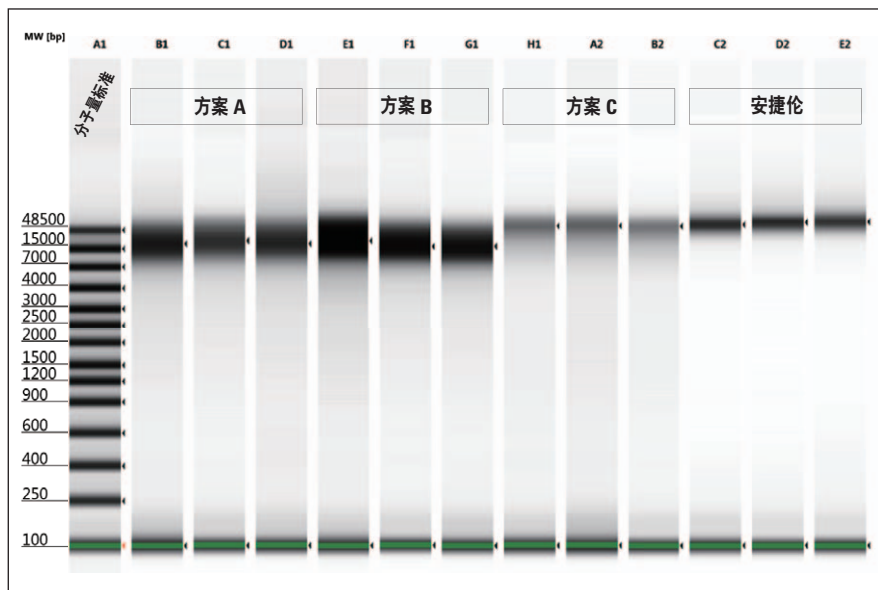


图 2 四种提取试剂盒所得的 gDNA 样品进行三次重复分析的胶图。

示四种提取方法所得的 gDNA 的分子量分布范围。方案 B 重复提取中的一次产生了基因组 DNA 剪切, 如图 3 中的离群值所示。这可由基因组 DNA ScreenTape 检

测到, 但如果只用 Qubit 或 NanoDrop 则无法鉴定。图中指出当使用安捷伦 DNA 提取试剂盒时, 可获得更高的平均分子量, 即更为完整的基因组 DNA 样品。

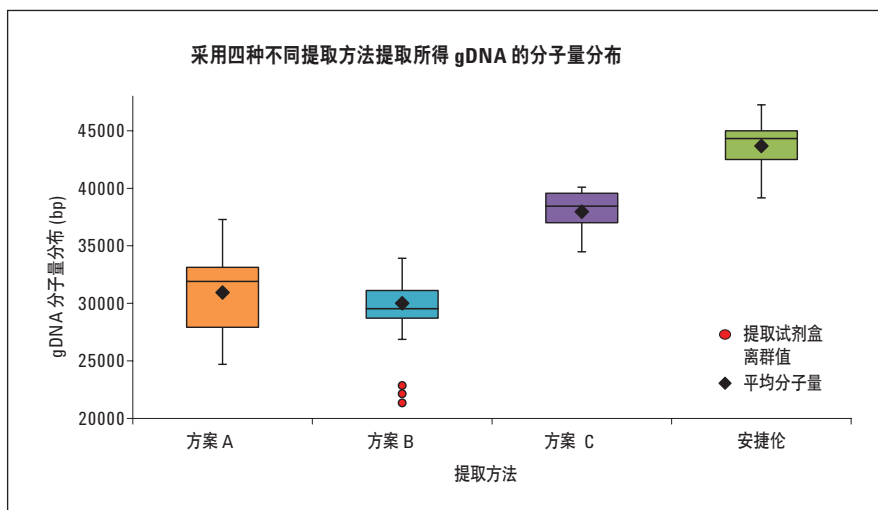


图 3 四种试剂盒提取所得基因组 DNA 的分子量分布

图 4 中的气泡图表明了整体样品的平均分子量与峰值分子量之间的关系，其中气泡大小表示四种提取试剂盒各自所得样品的浓度。该信息指示了每个试剂盒的总提取效率，位于图中右上角部分的大气泡代表最佳结果。结果来自 2200 TapeStation 软件中导出的 CSV 文件。图中指出方案 A 和 B 提取得到分子量较小的双链基因组 DNA 片段，平均分子量小于 25000 bp。由方案 C 所得的基因组 DNA 为具有高分子量的完整 DNA，但是样品浓度较低，因此总产率较低。安捷伦 DNA 提取试剂盒所得样品产率最高，含有约 30 ng/μL 双链且完整的高分子量基因组 DNA，大小约 45000 bp。

基因组 DNA 完整性分析

基因组 DNA ScreenTape 分析法可进行多样品比较，检查样品分子量、分布及峰形的差别。当对之前和现有的样品与所选标准品进行比较时，该功能特别重要。图 5 中的叠加谱图说明了不同提取方法各自的这些参数。

结论

安捷伦 2200 TapeStation 系统结合安捷伦基因组 DNA ScreenTape 分析法是通过一次运行来评价基因组 DNA 起始材料数量、完整性及整体质量的理想解决方案，每个样品不到 2 分钟即可返回结果，且只需 1 μL 基因组 DNA。2200 TapeStation 软件可为任意给定提取方法提供效率信息，可用

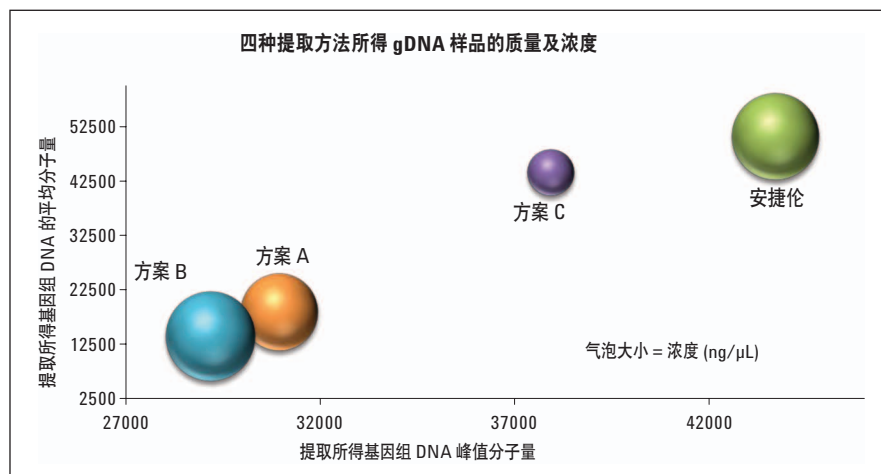


图 4
四种提取试剂盒提取所得基因组 DNA 的分子量分布及浓度

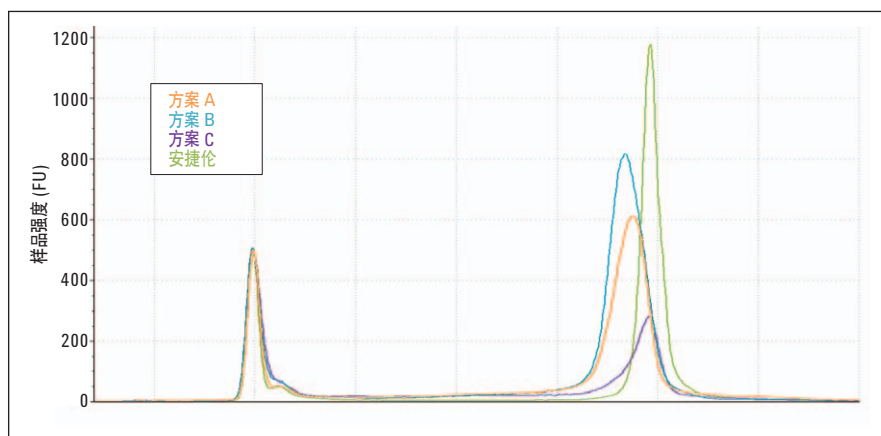


图 5
四种提取试剂盒所得 gDNA 的电泳图谱叠加图

于实验起始材料的简单快速评价。基因组 DNA ScreenTape 分析法的定量结果与基于荧光的 Qubit 仪器具有高度一致性。而与基于 UV 的检测的差别是由于基于荧光的平台与分光光度法 NanoDrop 间测量方法的差别造成的。

联系我们：

www.genomics.agilent.com/contactUs.jsp

免费专线：800-820-3278

customer-cn@agilent.com

www.agilent.com/genomics/tapestation

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
2013 年 4 月 1 日，中国印刷
出版号 5990-1797CHCN