

用Agilent 2100生物分析仪和DNA 500 LabChip分析PCR扩增的线粒体DNA

应用

国土安全/法医

作者

Mark Jensen
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

PCR扩增线粒体DNA(mtDNA)的序列分析正迅速成为法医测试中公认的手段。法医mtDNA应用关键性的第一步，是确定这些扩增产物片段大小、纯度和浓度是否适合序列分析。Agilent 2100生物分析仪和DNA 500 LabChip能够准确而精密地测定DNA片段的大小和浓度。在这篇应用报告中，用生物分析仪在序列测定前快速而有效地分析了PCR扩增的DNA片段。

前言

近年来mtDNA序列分析的应用正在迅猛增长。1995年美国国防部认定mtDNA分析可以作为一种可靠的法医工具[1]。从那时起，美国战争伤亡人员的鉴定开始使用mtDNA序列分析。911世贸大厦遇难者的遗体也正在用mtDNA序列测定的方法进行分析。除了这些法医应用以外，mtDNA还被用于历史和人类学样品的研究。

这些研究包括这样一些样品，路易17的心脏[2]、沙皇尼古拉二世的遗骸[3]、7000年前的脑组织，以及穴居人的遗骨等。

线粒体是所有真核细胞胞质中存在的亚细胞结构。其结构是由原始真核细胞结合了细菌细胞派生而来的。细菌细胞经过一段时间后与其宿主形成了一种共生关系，最终成为其宿主基本生化结构的一部分。这就是为什么线粒体包含了自己独特的DNA，编码了这些结构中的一些蛋白质。

1981年Fredrick Sanger的实验室首次测定了线粒体DNA的序列。人类mtDNA是一个含有16569个碱基对(bp)的小型环状基因组。目前人类mtDNA的参考序列是安德森或剑桥参考序列(CRS)(Genbank accession: M63933)。这一基因组编码了无数参与氧化磷酸化的多肽(蛋白质的亚单位)。这一基因组中还发现了2个核糖体RNA和22个反转录RNA的核苷序列。除了这些编码序列以外，线粒体基因组还包含了一个1100 bp的非编码区域，称为D-loop或控制区。D-loop包含了对人类鉴定有用的序列变异。不相关个体之间这一区域的序列变异为1%-3%。大多数序列变异都发生在控制区的两个部分，超变异区1(HV1)和超变异区2(HV2)。



线粒体DNA序列直接从母体遗传。除非发生突变，否则兄弟姐妹和所有母系亲属都拥有相同的mtDNA。由于mtDNA不会经过重组，所以母系亲属上溯几代都能提供有用的基因样品。这些序列信息在人员失踪案件中常常相当有用。在法医案例中，mtDNA序列更常用的是排除而不是确定犯罪嫌疑人，因为同一家族中的许多人都拥有相同的mtDNA序列。

细胞核只有一个拷贝的基因组DNA，而细胞质中可能有1000多拷贝的mtDNA。由于每个细胞都含有多个mtDNA拷贝，所以只需要几个细胞就能进行序列分析。要进行mtDNA样品的序列分析，通常需要提取DNA，并用聚合酶链反应(PCR)扩增变异区域。因为扩增能把目标DNA的几个拷贝转变成几亿个拷贝，所以有限的或腐败很严重的样品也能进行序列分析，例如骨头、牙齿或头发。

PCR扩增mtDNA的分析

扩增mtDNA HV区的PCR次数取决于样品的年代和条件。如果mtDNA降解极少，每个HV区只需要进行一次PCR。反应产物大约450 bp长。长期暴露在潮湿、高温和细菌条件下，DNA将发生明显降解，因此断裂成较小的碎片。降解样品中mtDNA的平均片段长度可能比450 bp小得多。由于扩增产物的大小不能超过初始的目标DNA，所以对严重降解样品的扩增需要进行一系列较短的PCR步骤，通常在100-200 bp片段长度。

PCR产物的分析一般使用琼脂糖或丙烯酰胺凝胶电泳。用户需要在未知PCR样品的旁边加一组已知浓度的预定标准。用户可将PCR样品条带的强度与其中的

一个标准进行比对。标准的浓度范围通常至少要覆盖三个数量级，因为也有必要对未预料到的任何第二种PCR产物进行定量。这类分析的准确度很低，因为浓度的估算误差经常会超过100%。由于这一原因，目标与非目标PCR产物比例的计算也存在相当的问题。

Agilent 2100生物分析仪是第一台可用于核酸分离的芯片类商品系统，它可以克服凝胶电泳的局限性。Agilent 2100生物分析仪在微型通道中对核酸片段进行分离，并进行自动检测，以及在线数据处理。Agilent 2100生物分析仪连接在一台PC机上，以进行运行控制和自动数据分析。

用Agilent 2100生物分析仪分析PCR产物，与经典的凝胶电泳相比，有几个重要的优点。由于使用了短分离通道和高电场，与凝胶电泳相比，显著提高了分析速度。仪器装配了荧光检测系统，因而带来了卓越的检测灵敏度。预包装的试剂和工具包，与标准化的操作方案，使数据的重复性更好。这些工具包还有助于提高不同运行批次、不同芯片和仪器之间的重复性。与凝胶扫描系统的数据处理方式相比，手工定量的成分明显减少，数据分析都是以自动方式进行的。样品和试剂消耗降低到1至几微升，最大限度地减少了与有害物质的接触，降低了废弃物的量。

有几种试剂盒可用于各种核酸样品的分析。DNA 500 LabChip®的片段范围是25-500 bp，正好适合mtDNA序列分析所需的扩增浓度和质量的快速测定。DNA 500分析方法对25到100 bp的片段分辨率是5-bp，对100到500 bp片段分辨率为5%。在整个片段长度范围内，长度准确度误差低于10%。以前的研究表明，生物分析仪能够检测琼脂糖凝胶电泳无法鉴定的DNA片段。

与凝胶电泳用SYBR gold或溴化乙锭染色相比，生物分析仪的检测灵敏度比SYBR gold染色高5倍，比溴化乙锭染色高25倍。生物分析仪能检测到20 pg水平的DNA[4]。

生物分析仪的定量能力见表1。用含有100、200、400 bp三个片段的DNA质量阶梯对定量准确度进行验证。阶梯各组分的浓度由供给商提供(Low DNA Mass™ ladder, Life Technologies, USA)。所有三个片

表1. Agilent 2100生物分析仪的定量准确度和精密度

	100 bp	200 bp	400 bp
平均[ng/μL]	0.73	1.53	3.02
目标值[ng/μL]	0.80	1.60	3.20
误差百分比	-8.28	-4.56	-5.62
STDV	0.08	0.11	0.20
CV	10.73	7.46	6.73

段浓度的测定误差均小于10%，变异系数小于15%[5]。

PCR扩增mtDNA的要求

高质量的序列数据需要浓度范围在10-100 ng/mL的均一PCR产物。FBI地方实验室的实验室规程规定，扩增的目标mtDNA必须比其它未知PCR产物的浓度高10倍。不符合纯度要求将导致第二种PCR产物的序列干扰目标序列测定，甚至出现核苷碱基的误识别。基于以上原因，对所有PCR产物浓度的准确测定是评定PCR样品质量的关键。

图1显示了HVI区mtDNA序列扩增的实例。引物二聚体小峰旁边相邻的是低分子量标记物峰，PCR产物只有均一的273 bp PCR产物，浓度为44.1 ng/μL。这样的产物完全适合进行mtDNA序列分析。

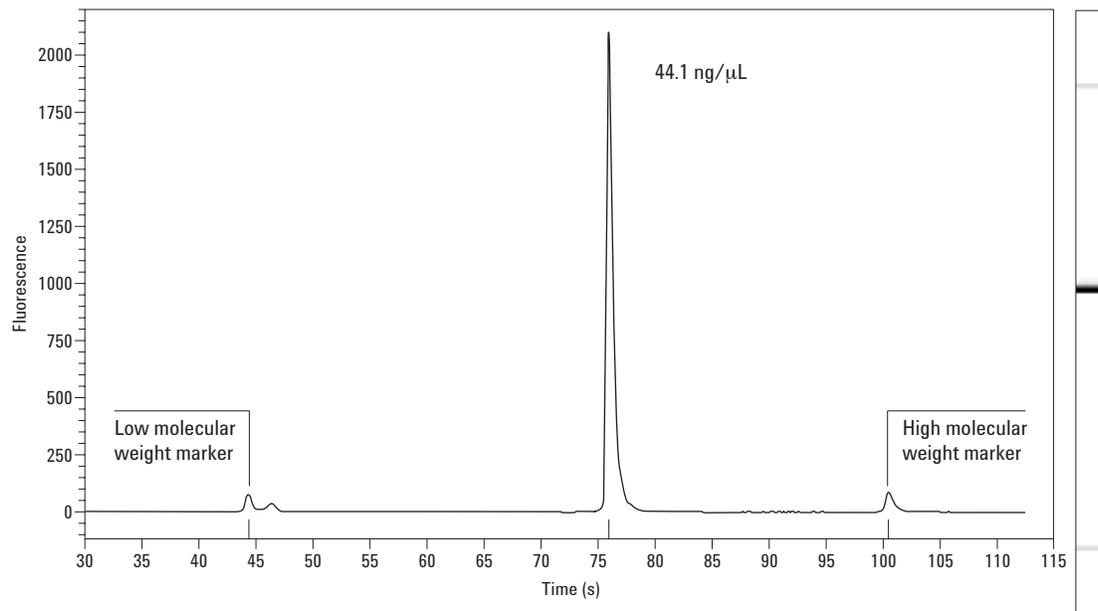


图1. Agilent 2100生物分析仪上得到的HVI区PCR扩增mtDNA的电泳图

图2显示的mtDNA扩增产物包含第二种PCR扩增污染物。目标PCR产物为222 bp的片段，浓度为48.8 ng/ μ L。未知的第二种产物是浓度为10.2 ng/ μ L的69 bp片段。由于第二种产物的浓度比目标片段高出10%，所以根据目前FBI 10:1的规定，这次PCR扩增不适合进行mtDNA测序。

MtDNA序列扩增的另一个常见问题，发生在腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)含量丰富，又接着是一长串鸟嘌呤的区域。扩增这种序列时，DNA可能部分解链，然后退火。含有许多G的长链退火后有时可能会丢失自己的参照系，多结合一个G。如果这种情况在扩增过程中多次发生，就可能出现一定浓度含n+1或n+2个G的扩增产物。这种现象称为G-stutter。当出现这种G-stutter现象的PCR产物用于测序反应时，来自G的下游数据通常无法解释。

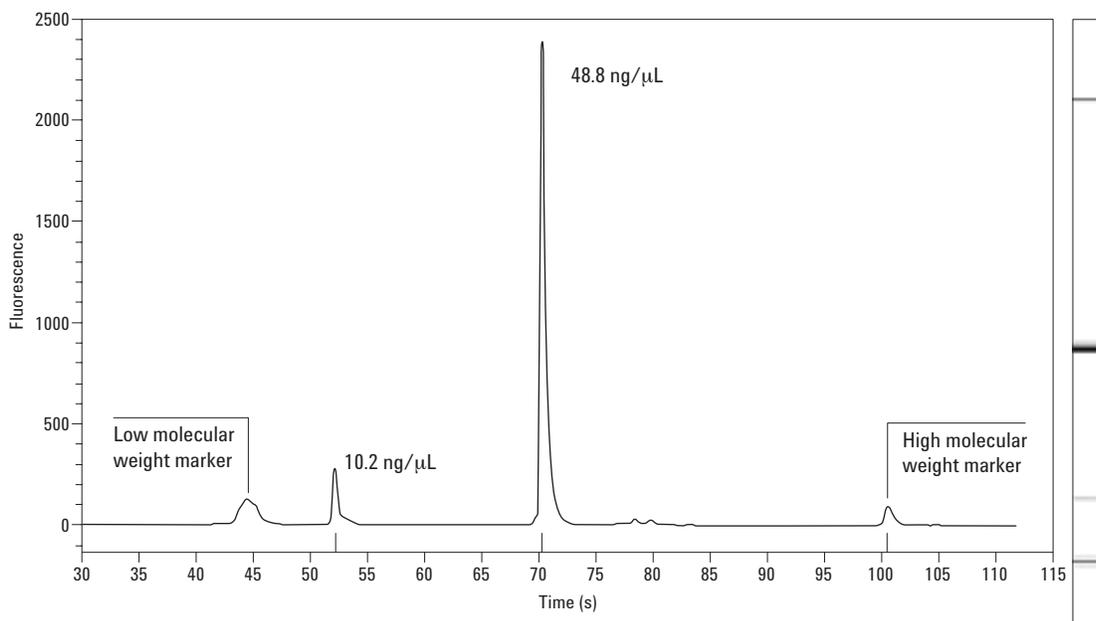


图2. 用Agilent 2100生物分析仪分析HV1区PCR扩增的mtDNA电泳图显示，存在第二种未知的PCR产物。

图3A显示了出现G-stutter的PCR扩增HV1电泳图。对这个PCR产物序列进行荧光标记，存在混合序列，其中有包含n、n+1、n+2 G的各种片段。这种G区混合序列的下游数据实际上根本无法解析。图3B显示了序列数据混乱的一个例子。核苷碱基N表明没有得到序列信息。

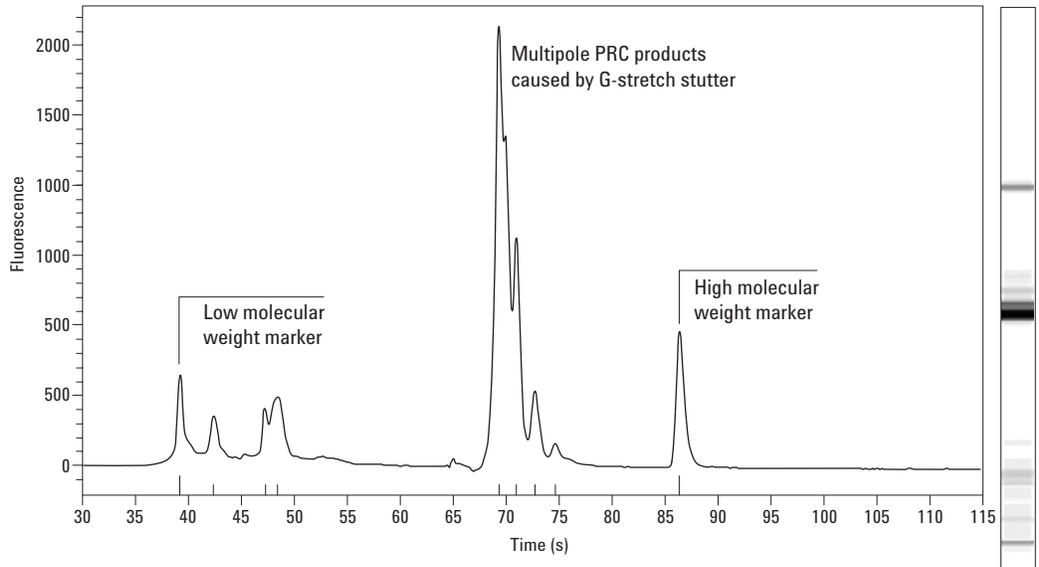


图3A. 用Agilent 2100生物分析仪分析HV1区mtDNA PCR扩增电泳图显示，存在多个G-stutter产物。

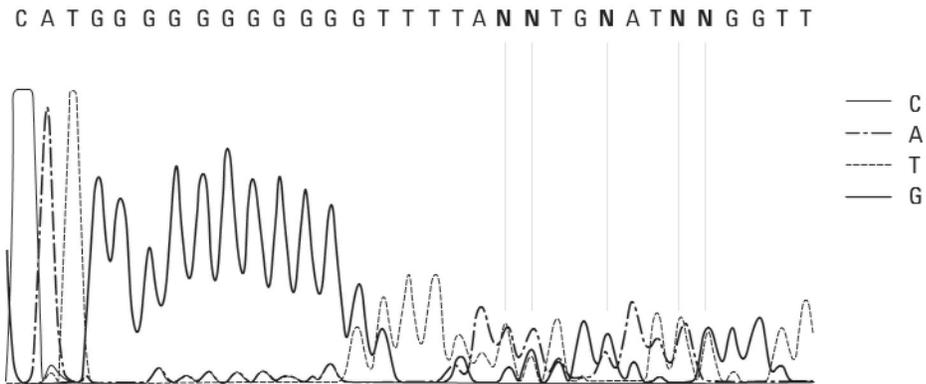


图3B. 有G-stutter的mtDNA PCR扩增产物得到的典型测序数据。注意，在几个G之后，序列不可读。

图4A显示的是不含干扰物的同一HVI序列的PCR扩增电泳图。这次PCR扩增只有一种均一的产物，非常适合进行DNA序列分析。图4B显示了一部分从这种PCR产物得到的序列数据。请注意，和图3B中序列不同，来自一连串G的序列清晰、明确。

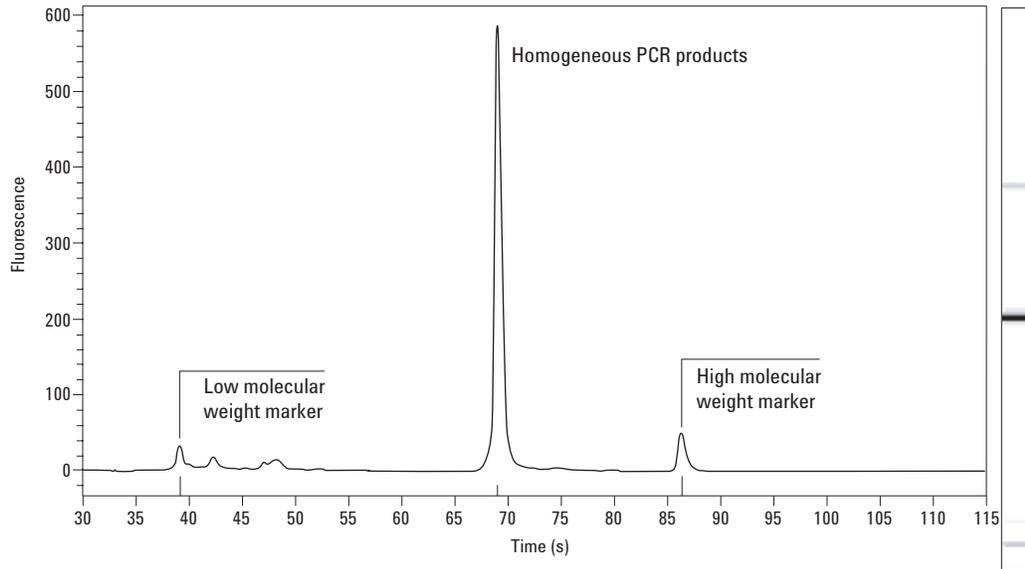


图4A. HVI区PCR扩增的mtDNA Agilent 2100生物分析仪电泳图显示，只有一种均一的PCR产物。

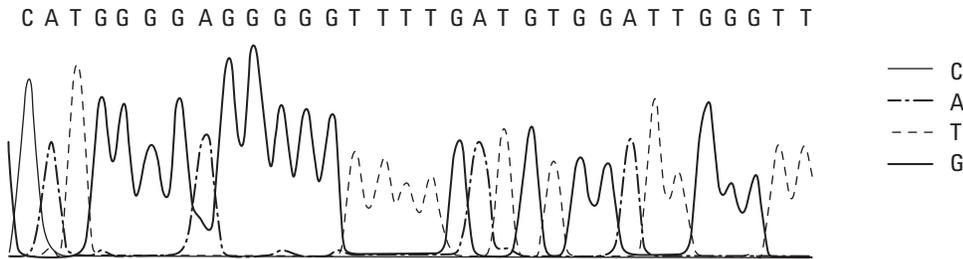


图4B. 均一的mtDNA PCR产物所得到的典型序列数据。注意，序列数据显示一连串G之后序列依然可读。

结论

线粒体DNA分析正在法医界迅速普及以作为证据。Agilent 2100生物分析仪，由于能够快速提供mtDNA扩增产物的片段大小和浓度，而对这一分析技术起到了推动作用。通过使用外标和内标DNA标记物，Agilent 2100生物分析仪实现了PCR产物的准确定量分析和片段大小测定。应用这一技术能够鉴定出扩增mtDNA片段的质量，并对这些片段进行定量测定，以确保接下来的序列分析能有可靠的结果。DNA 500试剂盒能对25到500碱基对的DNA进行分离。因为生物分析仪具有卓越的灵敏度和分辨率，它能够对第二种PCR产物进行分离和准确定量。在用户需要证明其目标mtDNA扩增产物超出其它未知第二种PCR产物10倍以上时，这种功能尤为重要。

参考文献

1. B. Budowle, M. Allard, M. Wilson and R. Chakraborty, "Forensics and Mitochondrial DNA: Applications, Debates and Foundations" (2003) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **4**, 119–141.
2. B. Jehaes, K. Toprak, N. Vanderheyden, H. Pfeiffer, J. Cassiman, B. Brinkmann and R. Decorte, "Pitfalls in the analysis of mitochondrial DNA from ancient specimens and the consequences for forensic analysis: the historical case of the putative heart of Louis XVII" (2001) *Int. J. Legal Med.*, **115**, 135–141.
3. N. Rudin, and K. Inman, "An Introduction to Forensic DNA Analysis", CRC Press LLC, New York, 2002, pp. 59–60.
4. D. Vitale, "Comparing the Agilent 2100 Bioanalyzer performance to traditional DNA analysis techniques", Agilent Technologies publication 5980-0549E www.agilent.com/chem
5. O. Mueller, "High resolution DNA analysis with the DNA 500 and DNA 1000 LabChip® kits", Agilent Technologies publication 5988-3041E www.agilent.com/chem

更多信息

如果需要了解有关我们产品和服务的更多信息，请访问我们的网站www.agilent.com/chem。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的有关损失不承担责任。

本资料中所涉及的信息、说明，如有更改，恕不另行通告。

Low DNA Mass™是生命科技公司的商标。
LabChip®是Caliper科技公司的美国注册商标。

© 安捷伦科技公司，2004

中国印刷
2004年4月14日
5989-0985CHCN