

# 使用illustra GenomiPhi V2和HY DNA扩增试剂盒制备基因组DNA

G. Kumar, R. Rech, K. Kopolka, K. Lavrenov, E. Garnova, S. Lavasini, R. Deadman, and S. Hamilton  
Gene Analysis Department, GE Healthcare, 800 Centennial Avenue, Piscataway, NJ 08854

Illustra™ GenomiPhi™ V2和HY DNA扩增试剂盒是GE Healthcare的Phi 29 DNA聚合酶家族系列产品中的最新成员。GenomiPhi V2扩增试剂盒在1.5 h内从加入的1–10 ng的基因组DNA(gDNA)中扩增4–7 μg典型的gDNA, 在没有模板的阴性对照中没有任何扩增。GenomiPhi HY DNA扩增试剂盒在3–4 h内从加入的10 ng的基因组DNA(gDNA)中产生40–50 μg典型的gDNA。这篇文章最初发表在Nature Methods Application Notes Volume 2, pp. 30–32 (2007); [www.nature.com/app\\_notes/nmeth](http://www.nature.com/app_notes/nmeth)。在这个译本中, 我们提出附加的数据显示新的试剂盒被递交并通过严格的质量检测。

## 方法

在GenomiPhi V2步骤中, DNA被短暂的热变性, 然后在含有随机六聚体的样品缓冲液中冷却, 退火处理配对到DNA上。添加主要含有Phi 29 DNA聚合酶、附加的随机六聚体、核苷酸、盐和缓冲液的混合物。在30°C进行等温扩增, 然后在65°C热失活聚合酶(图1)。GenomiPhi HY步骤类似, 但是体积比V2试剂盒大2.5倍。建议反应时间为3–4 h。

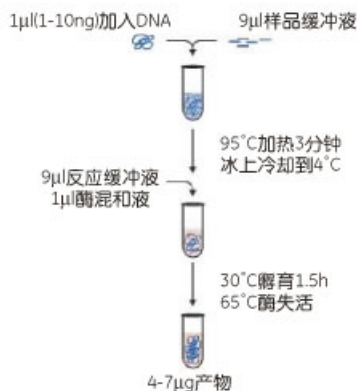


图1. GenomiPhi V2 DNA扩增试剂盒步骤

## 结果: 扩增的DNA的一致性分析

为了证实新的扩增试剂盒产生的DNA维持了原始基因组DNA的一致性和成功率, 单个人类gDNA(从Coriell研究所获得)的扩增产物被递交并使用Affymetrix 10000人类基因组SNP芯片进行SNP一致性分析。如图2所示, 扩增的DNA的成功率和一致性和那些gDNA非常类似。

## GenomiPhi V2和HY试剂盒生产质量控制

为了为新的GenomiPhi产品的生产批次建立标准, 每个产品的前三批产品都进行了广泛的检测。对于GenomiPhi V2, 每批由两个操作人员重复检测三次。每次的测试是用10 ng人类基因组DNA或没有模板的对照在1.5 h测定产量(图3)。

对于GenomiPhi HY, 每批产品又由两名操作人员在多个时间点进行测试。图4和5分别显示2 h和4 h的产量。而产量规格以4 h的时间点为准, 必须注意含有模板的反应动力学比没有模板的对照组更快。这如2 h的时间点图所示(图4)。而2 h时间点显示了含有模板和无模板反应之间的显著差异, 产量也明显不一致。4小时反应(图5)的具体产量都在38.5到58.8 μg。

用QPCR中的特异性扩增功能测试两种试剂盒的扩增产物。检测了下列标准:

- A) 扩增产物产生的循环阈值(CT)在使用基因组DNA的反映的两个CT值之间。
- B) 在两次扩增产物上进行的QPCR的CT值在两次中的一次循环内。这监测了扩增反应的再现性。
- C) 在10倍稀释的扩增产物上进行的QPCR产生了预期的3+0.5循环的CT漂移。
- D) 扩增曲线形状必须令人满意。
- E) 用扩增的模板产生的PCR产物的熔解曲线必须与用基因组DNA获得的熔解曲线匹配。

## 结论

使用GenomiPhi V2 DNA扩增试剂盒, DNA扩增、定量和下游的基因分析(如SNP分析)现在能够在一天内完成。和原先的试剂盒不同, GenomiPhi V2可以把从好的模板进行的扩增与差的或没有DNA模板的扩增反应区分开来—仅基于被扩增材料的量。这允许用户在下游的基因分析之前筛选并去除失败的反应。避免对质量差的样品进行昂贵的下游操作将大大节约成本, 特别是那些有关的大规模和高通量的基因分析。

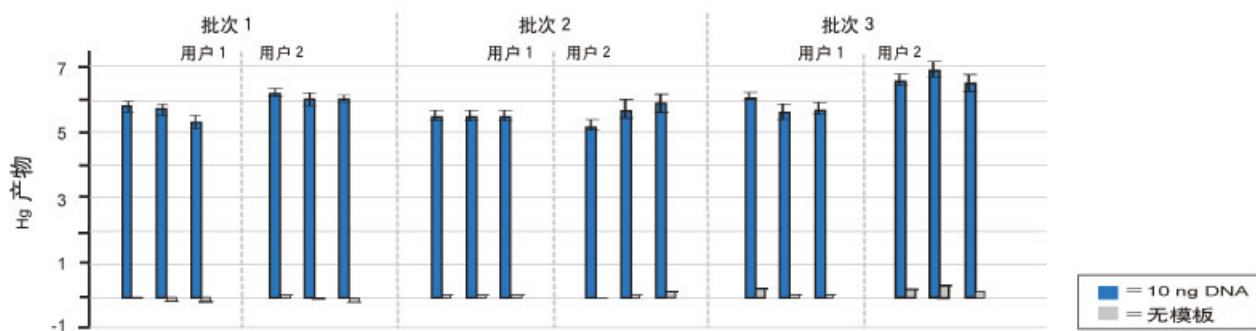


图3. illustra GenomiPhi V2扩增试剂盒3个生产批号的质量控制检测。每个条代表一次测试的结果且是10次反应的平均值。

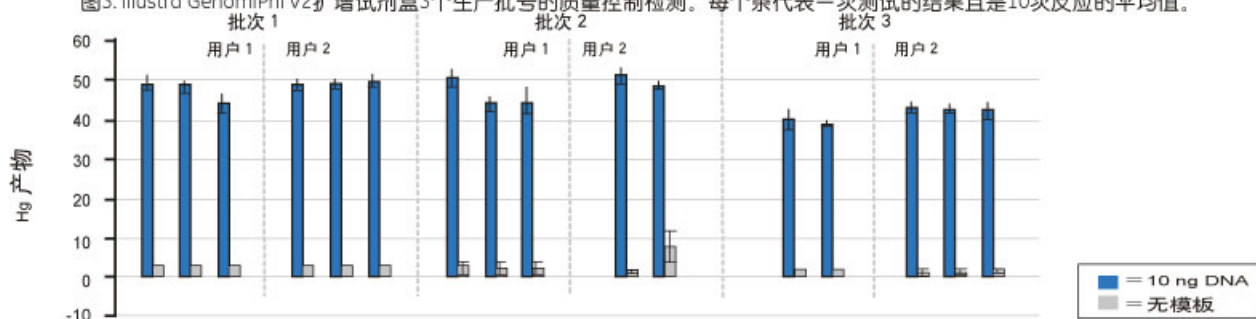


图4. illustra GenomiPhi HY扩增试剂盒的3个生产批号在2h时间点的质量控制检测。

每个条代表一次测试的结果且是10次反应的平均值。

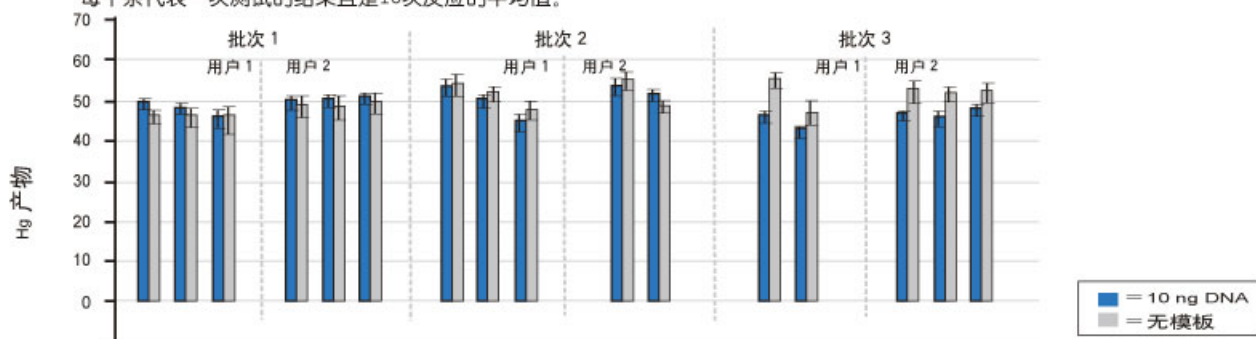


图5. illustra GenomiPhi HY扩增试剂盒的3个生产批号在4h时间点的质量控制检测。

每个条代表一次测试的结果且是10次反应的平均值。

## 参考文献

1. Blanco, L. et al. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. J. Biol. Chem. 264, 8935-8940 (1989).
2. Dean, F. B. et al. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. Genome Res. 11, 1095-1099 (2001).
3. Dean, F. B. et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 5261-5266 (2002).
4. Hasnani, S. et al. Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples. Genome Res. 13, 954-964 (2003).
5. Bergen, A. W. et al. Comparison of yield and genotyping performance of multiple displacement amplification and OmniPlex whole genome amplified DNA generated from multiple DNA sources. Human Mut. 26, 262-270 (2005).
6. Park, J. W. et al. Comparing whole-genome amplification methods and sources of biological samples for single-nucleotide polymorphism genotyping. J. Clin. Chem. 51, 1520-1523 (2005).