

多重 PCR 在质粒拷贝数检测中的应用*

李 媛^{1,2**} 任长虹^{1**} 吴永红¹ 叶 巧¹ 石锦平¹

屈武斌¹ 郑晓飞¹ 刘虎岐^{2***} 张成岗^{1,2***}

(1 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 蛋白质组学国家重点实验室 北京 100850)

(2 西北农林科技大学生命科学院 杨凌 712100)

摘要 聚合酶链式反应(PCR)作为常规分子克隆技术已在分子生物学的各个领域得到广泛应用。然而,多重 PCR 技术应用于质粒拷贝数检测的研究尚未见报道。为深入探索多重 PCR 在质粒拷贝数测定中的应用,首先利用构建的多重 PCR 引物设计及评估体系分别针对细菌基因组 DNA 和质粒载体 DNA 序列设计多重 PCR 引物;然后以转化有不同质粒载体的大肠杆菌菌液为模板进行多重 PCR 反应;最后利用凝胶成像仪采集图像后进行积分光密度分析以获得质粒的相对拷贝数。结果显示通过多重 PCR 得到的质粒相对拷贝数与 Real-time PCR 和 Southern blot 的检测结果基本一致,说明多重 PCR 可用于质粒拷贝数的定性检测。利用多重 PCR 技术建立了一种便捷的质粒拷贝数检测方法,为在宿主细胞中快速确定克隆载体或表达载体的相对含量提供了参考。

关键词 质粒拷贝数 多重 PCR 菌液 实时定量 PCR Southern blot

中图分类号 Q52

在分子生物技术方面,大肠杆菌系统作为重要的宿主以其易于培养、遗传背景清楚、操纵简便等优点已被广泛应用于大量重要基因的克隆与表达,但由于不同质粒载体在宿主菌中存在松弛型和严紧型调控,使得不同宿主细胞中质粒拷贝数存在明显的差异,其中多拷贝质粒在每个细胞可以达几十乃至几百份质粒拷贝,少的则只有一到几份拷贝^[1-2]。由于不同质粒拷贝数将严重制约目的基因的表达调控进而影响基因产物的产率,因而发展一种经济合理、操作简便的质粒拷贝数鉴定方法不仅可以加速基于原核表达体系进行基因表达调控的研究,而且可以显著节约实验研究的成本和时间。虽然利用传统 Southern blot 或 Dot blot 方法以及借助于大型设备如高效液相色谱或毛细管电泳以及 Real-time PCR 等可以实现质粒拷贝数的测定,但由于存在操作复杂、耗时长、成本高以及对于仪器的要求高

等缺点^[3],使其在普通实验室中的应用受到了极大限制。本研究旨在利用多重 PCR 技术建立一种快速高效的质粒拷贝数鉴定方法。

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是目前广为使用的分子生物学技术,并进而衍生出包括差异显示 PCR、实时定量 PCR、巢式 PCR、多重 PCR 和不对称 PCR 等在内的多种不同类型的相关技术^[4]。其中多重 PCR(multiplex PCR)通过在同一 PCR 反应体系里针对多个 DNA 模板使用两对或两对以上引物进行反应,可实现多个核酸片段的同时扩增。自 1988 年 Chamberlain 等^[5]首次提出这一概念以来,多重 PCR 已被广泛应用于许多领域,包括基因敲除分析、突变和多态性分析^[6]、植物病虫害检测^[7]、食品病原微生物检测^[8]、基因表达的定性和半定量分析^[9]等。因此,如能通过在大肠杆菌基因组 DNA 和克隆载体或重组表达载体上设计引物、进行多重 PCR 反应,那么通过对电泳条带灰度值的分析就有可能更简单地计算得到质粒的相对拷贝数。因此,基于本实验室新近设计完成的多重 PCR 引物设计系统 MPprimer (<http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer/>)^[10]和多因素引物特异性评估系统 MFEprimer ([收稿日期:2011-01-05 修回日期:2011-03-29](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

* 国家“973”计划(2006CB504100)、国家科技重大专项课题(2009ZX09503-002, 2009ZX09301-002, 2009ZX09103-616)、国家自然科学基金(30900862, 30800196)资助项目

** 共同第一作者

*** 通讯作者,电子邮箱: liuhuqi@yahoo.com.cn; zhangcg@bmi.ac.cn

biocompute. bmi. ac. cn/MFEprimer/)^[11],以转化有克隆载体 L4440 或表达载体 pFX_EGFP 的 HT115 和 DH5 α 两种大肠杆菌中为对象进行比较研究,旨在为鉴定质粒拷贝数和选择合适的宿主细胞提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 HT115 和 DH5 α 菌株由本实验室保存;克隆载体 L4440 (Amp⁺) 和表达载体 pFX_EGFP (Amp⁺)均由东京女子医科大学 Mitani S 教授惠赠;质粒提取试剂盒购自美国 Promega 公司;琼脂糖购自 GeneTech 公司;ExTaq 酶、TaKaRa SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒、DL2000 DNA Marker、dNTP,限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;GoldViewTM 核酸染料购自北京赛百盛基因技术有限公司;LB 培养基相关试剂均购自 OXOID 公司;PCR 购自美国热电公司,Real-time PCR (MX 3000P)购自美国安捷伦公司;电泳仪购自北京六一仪器厂,凝胶成像仪购自 Sage Creation 公司。引物和生物素标记探针均由 Invitrogen 公司合成;碱变性液:1.5 mol/L NaCl,0.5 mol/L NaOH;中和液:1 mol/L Tris-HCl (pH7.4),1.5 mol/L NaCl;转移液:20 \times SSC。

1.2 方法

1.2.1 多重 PCR 引物设计 首先从 NCBI 数据库获得大肠杆菌 HT115 和 DH5 α 的基因组序列、克隆载体 L4440 序列和表达载体 pFX_EGFP 序列,并以 FASTA 格式保存到同一文本文件;然后提交到多重 PCR 引物设计软件 MPprimer ([http://biocompute. bmi. ac. cn/MPprimer/](http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer/))进行引物设计^[10]。根据实验需要设计两组多重引物,每组均以大肠杆菌基因组中的 GapA 为内参,根据各引物序列的 *T_m* 值、产物长度、各引物罚分值等参数选择多重引物对中 *T_m* 值较接近的一组扩增引物,并送 Invitrogen 公司进行化学合成,具体引物序列信息如表 1 所示。

表 1 多重 PCR 反应的引物序列对
Table 1 Primer sequences for amplifying target genes by multiplex PCR

靶序列	引物序列 (5'→3')	预期扩增长度 (bp)
GapA	上游: AGTTGCTGCTGCAGGAAGCGTT	138
	下游: AACACATCACCGTGCTGCGAA	
L4440 (pFX_EGFP)	上游: GACGCCGGGCAAGACAACT	481
	下游: TACCGCAGACCCACGCTCA	

1.2.2 菌液多重 PCR 模板的制备 根据 Promega 公司质粒提取说明书所述方法分别提取质粒 L4440 和 pFX_EGFP,然后采用热激法将其分别转化入两株不同大肠杆菌 HT115 和 DH5 α 感受态细胞,继而采用涂布棒涂布到含有 Amp⁺ (终浓度:100 μ g/ml)的 LB 固体培养基上,并置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 10 ~ 12 h 待长出克隆。次日,挑取阳性克隆并接种到含有 Amp⁺ (终浓度:100 μ g/ml)的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 200r/min 摇菌约 3 ~ 4 h,待 *OD*₆₀₀ 值达 0.8 并经测序验证后用作菌液 PCR 模板。

1.2.3 菌液多重 PCR 扩增及凝胶图像采集分析 按照 TaKaRa 公司 ExTaq 说明书提供方法进行多重 PCR 反应。其中,PCR 总反应体系为 25 μ l,模板量为 0.5 μ l 菌液,上下游引物分别为 0.2 μ l 的质粒引物对和 0.3 μ l 的基因组 DNA 引物对,具体 PCR 反应程序如下:95 $^{\circ}$ C 5.5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 45 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 60 s (26 个循环);72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 扩增产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离并结合凝胶成像仪采集凝胶图像,继而利用凝胶成像仪自带分析软件进行各基因片段的积分光密度值 (integral optical density, IOD) 分析,并获得质粒 IOD 相对于基因组 IOD 的相对比值,以此数值的大小表征质粒含量的相对高低程度。

1.2.4 Real-time PCR 体系及反应 按照 TaKaRa SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR 反应,所用引物与多重 PCR 的一致,以 GapA 为内参,通过荧光值变化相对定量两种质粒的拷贝数。PCR 体系:SYBR Premix Ex Taq Mix (2 \times) 10 μ l, ROX Reference Dye 0.4 μ l,上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ l,菌液模板上样量 0.4 μ l,ddH₂O 8.4 μ l。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 15 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 30 s,反应循环数 36。PCR 结束后对扩增产物进行熔解曲线分析,以确保特异性扩增。

1.2.5 使用 Southern blot 技术检测质粒拷贝数 针对相同体积 *OD*₆₀₀ 值相同的 4 种菌液按相同的实验流程提取质粒,用限制性内切酶 (质粒 pFX-EGFP 用 BamHI,质粒 L4440 用 *Xho* I) 各 40 μ l。37 $^{\circ}$ C 水浴消化 4h;酶切样品用于 0.7% 琼脂糖凝胶 (0.5% GoldViewTM) 电泳 2h,虹吸转移到硝酸纤维素膜,85 $^{\circ}$ C 将膜干燥 2h;65 $^{\circ}$ C 预杂交 2h 后,用生物素标记的探针 (TACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCT,1:5000) 65 $^{\circ}$ C 杂交过夜;经 2 \times SSC (0.1% SDS) 65 $^{\circ}$ C 10 min,1 \times SSC (0.1% SDS) 65 $^{\circ}$ C 10 min,0.5 \times SSC (0.1% SDS)

65 ℃ 10 min,0.2 × SSC(0.1% SDS) 65 ℃ 10 min,0.1 × SSC(0.1% SDS) 65 ℃ 10 min 梯度洗膜后,用辣根酶标记链亲和素(1:200)室温孵育 30 min;1 × TBST 洗膜 10 min × 3 后进行 ECL 显色,X 胶片曝光 10 min,显影、定影直至条带清晰。继而利用 IPP 软件对条带的积分光密度值 IOD 进行分析,以此数值的大小表征质粒含量的相对高低程度。

1.2.6 统计学分析 上述分析数据采用 SPSS 13.0 统计分析软件的 t-检验进行统计学分析。将 $P < 0.05$ 定义为显著性差异;将 $P < 0.01$ 定义为极显著差异。

2 结果

2.1 菌液多重 PCR 条件优化

DNA 扩增反应中进入平台期是基于 PCR 技术分析基因差异的重要影响因素。为探索循环数对多重

PCR 反应平台期的影响,我们采用梯度 PCR 分别系统排查了从 20 到 32 个循环中分别以质粒 L4440 和 pFX_EGFP 为模板进行 PCR 扩增到达平台期的时间,并采用琼脂糖凝胶电泳分离后进行积分光密度计算及柱状图分析,结果如图 1 所示,当循环数为 20 到 28 个时,质粒 L4440 和 pFX_EGFP 扩增片段的积分光密度值随着循环数的增加而增加,26 个循环时已达最大(图 1b);电泳条带的亮度直观上有明显的变化。当循环数达到 30 次以后,质粒 L4440 和 pFX_EGFP 扩增片段的积分光密度值基本没有变化,提示反应已进入平台期(图 1a)。由于大肠杆菌基因组的模板在数量上较载体要少,所以在质粒 PCR 扩增没有达到平台期前,基因组的扩增理论上不会进入平台期。因此,本实验选择 26 次作为最适合的 PCR 循环参数,在此条件下,每对引物的扩增都是有效扩增,不受平台期的影响。

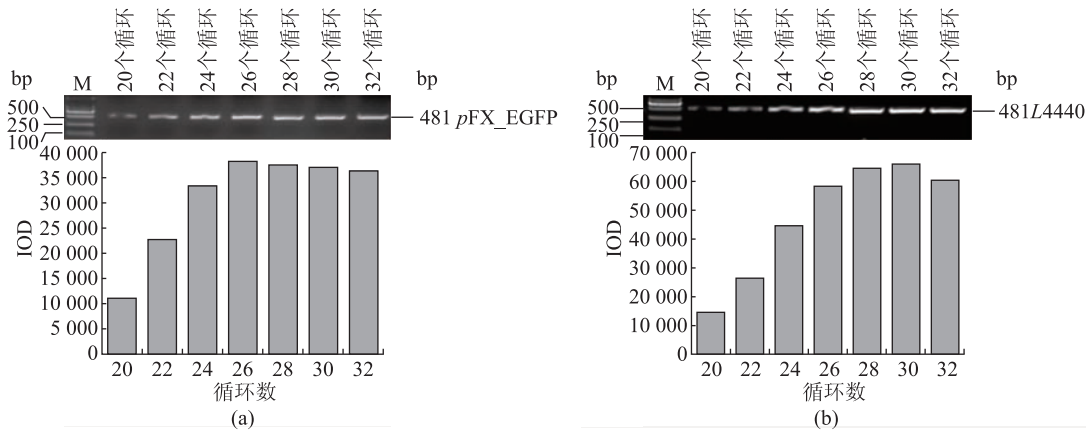


图 1 PCR 反应循环条件优化及柱状图分析
Fig. 1 Optimization of the cycling condition of PCR and the histogram analysis
(a) Amplification of plasmid pFX_EGFP (b) Amplification of plasmid L4440

2.2 利用多重 PCR 技术进行质粒相对拷贝数的测定

根据上述多重 PCR 条件优化结果,选择 26 次循环对大肠杆菌基因组和载体 DNA 进行菌液多重 PCR 扩增,结果如图 2a 所示,同一质粒在不同大肠杆菌中经 PCR 扩增后的琼脂糖凝胶电泳结果呈现明显差异,且条带亮度的强弱与所检测得到的质粒浓度(结果未显示)之间呈正相关关系,即质粒浓度高的菌液中 PCR 条带的亮度更高,质粒浓度较低的菌株中 PCR 条带的亮度相应较弱。

进一步通过 IPP 软件对上述琼脂糖凝胶图像进行积分光密度分析,得到各组质粒扩增条带的积分光密度与基因组扩增条带的积分光密度的相对比值,然

后在重复实验次数的基础上得到平均相对比值以及各自的标准差,用 Origin ver 8.0 软件进行柱状图分析及 t-检验分析,结果可见在宿主菌 DH5α 中 2 种质粒的相对比值与宿主菌 HT115 中两种质粒的相对比值存在极显著性差异, $P < 0.01$ (图 2b)。因此,通过菌液多重 PCR 扩增及积分光密度分析可以便捷地判定质粒拷贝数的相对数量,为在宿主细胞中快速确定克隆载体或表达载体的相对含量提供了技术参考。

2.3 通过 Real-time PCR 技术检测质粒的相对拷贝数

近年来基于灵敏度高、所需样品量少等优点,实时荧光定量 PCR 在动植物外源基因拷贝数检测中发挥重

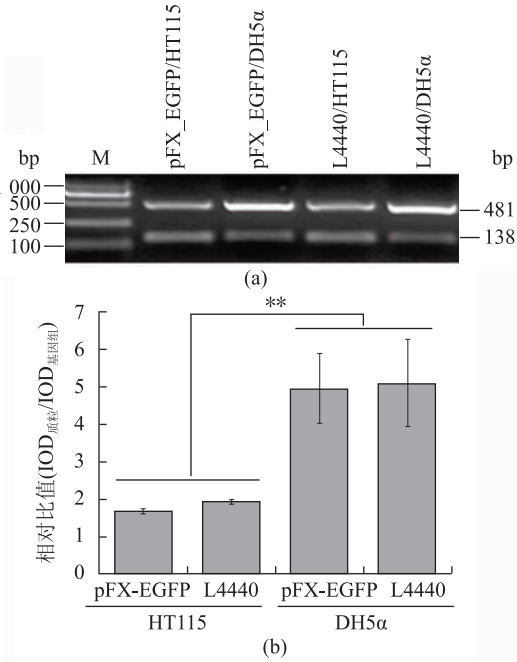


图2 质粒拷贝数测定及柱状图分析($\bar{x} \pm sd, n=4$)

Fig. 2 Determination of the plasmid copy number and histogram analysis

(a) Determination of plasmid copy number by multiplex PCR
(b) Histogram analysis of IOD

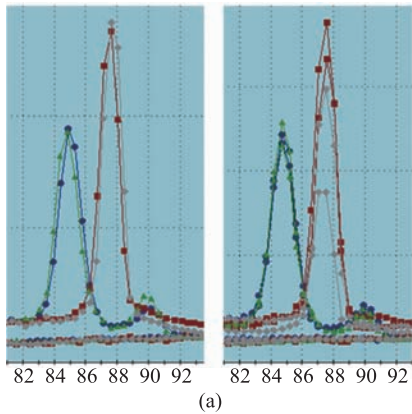


图3 Real-time PCR对质粒相对拷贝数的检测

Fig. 3 Determination of relative plasmid copy number by Real-time PCR

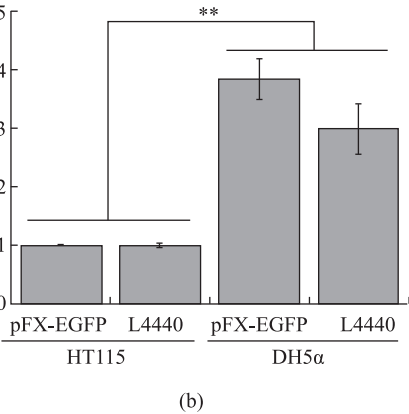
(a) Dissociation Curve of both internal reference and target gene (b) Relative quantity of the plasmid copy number

不同菌株中是一致的。根据本研究需求,仅针对两个质粒设计了生物素标记探针,而没有进行基因组水平的 Southern blot 分析。结果如图 4 a 所示,在基因水平上,2 种质粒在大肠杆菌菌株 DH5α 和 HT115 中拷贝数同样存在较显著的差异,通过对图像进行积分光密度分析可见 Southern blot 结果也与本文基于多重菌液 PCR 的结果是一致的。由此可见,本文提出的通过多

要作用^[12-15],因此,我们将 Real-time PCR 作为本文方法的对照实验。由于 SYBR Green 是一种非特异性的 DNA 双链结合染料,在实时荧光定量 PCR 中须进行熔解曲线的分析来判断是否存在非特异性扩增。本实验的熔解曲线如图 3a 所示,无论是针对内参 GapA 还是目的基因(外源质粒)的扩增,在 PCR 过程中都没有非特异性的条带出现,较好地避免了检测过程中假阳性结果的出现。本研究为半定量检测,通过将 GapA 的表达量作为均一化的标准,对目的质粒的表水平进行半定量分析,结果如图 3b 所示,可见同一质粒在不同大肠杆菌株系中的相对表达量存在明显的差异,其中两种质粒在菌株 DH5α 中的相对表达量为菌株 HT115 中的 3 倍左右,并且此结果与通过多重 PCR 技术的检测结果趋势基本一致。

2.4 通过 Southern blot 检测质粒的相对拷贝数

为了进一步明确克隆载体 L4440 和表达载体 pFX_EGFP 在两种大肠杆菌中的复制效率(即相对拷贝数),在 Real-time PCR 对照体系的基础上,我们通过 Southern blot 对其又进行了无放大的基因水平确认。当 OD₆₀₀ 值达到 0.8 时,吸取相同体积(10 ml)的菌液进行质粒提取,其原理在于基因组 DNA 的个数理论上在



重菌液 PCR 对质粒的拷贝数进行相对定量的技术是切实可行的,并能够在普通实验条件下推广。

3 讨论

与传统的 Southern blot 以及近年来新发展的 Real-time PCR 技术相比较,通过对多重 PCR 电泳结果的半定量分析,也可方便地计算出质粒的相对拷贝数。虽然

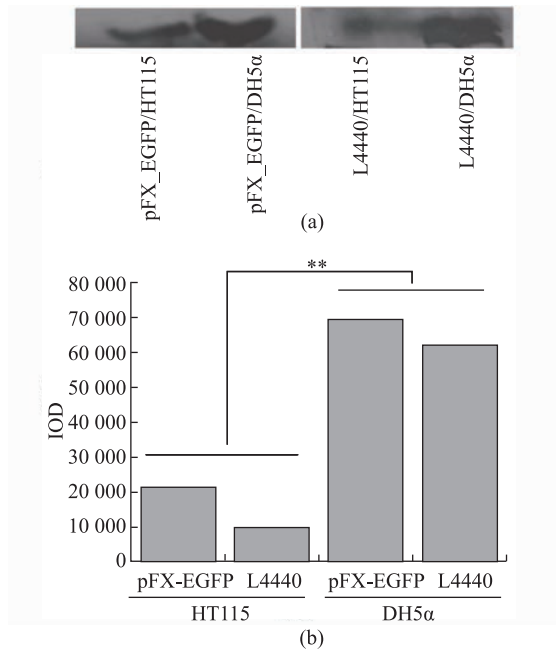


图4 Southern blot 对质粒相对拷贝数的检测和柱状图分析
Fig. 4 Determination of relative plasmid copy number by Southern blot and histogram analysis

该方法不能获得质粒拷贝数的精确含量,但是可以给实验人员提供一个可参考的数值范围,并能够清晰地反映出不同宿主细胞内对于同一质粒扩增效率的差异。更重要的是该技术操作简便而且更加经济可行,尤其适合于普通实验条件下比较和选择最适合的宿主细胞进行基因的克隆和蛋白的高效表达。

本文结果显示,由于多重 PCR 对质粒相对拷贝数的检测结果与 Real-time PCR、Southern blot 等结果基本一致,说明本文所述方法具有一定的可行性,并且基于本实验室自行研发的多重 PCR 引物设计软件 (<http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer/>)^[10] 可以很容易地实现高质量、高特异性多重引物设计^[16]。因此,通过多重 PCR 检测质粒相对拷贝数在技术方面不存在障碍。其次,与传统质粒拷贝数的检测方法^[3],如氯化铯-溴化乙锭 (CsCl-EB) 平衡梯度离心法,高效液相色谱 (high-pressure liquid chromatography, HPLC) 以及毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 和核酸杂交等方法比较而言,多重菌液 PCR 的方法可操作性强、重复性好,可显著节省检测的时间和成本。多重菌液 PCR 通过基因组 DNA 实现相对定量的方法更加简便和直观,甚至跳过了从质粒提取到浓度检测这些繁琐的步骤,可直接判断出哪种菌株更适合于目的基因的克隆或蛋白的表

达,而传统方法则相对比较耗时。与同属于聚合酶链式反应家族的 Real-time PCR 相比较,通过普通的琼脂糖凝胶电泳技术分析多重 PCR 的扩增产物不需要昂贵的 Real-time PCR 仪和荧光标记物,实验条件更简单,成本更低,更适合于普通实验室的推广。另一方面,研究表明在传统方法检测质粒拷贝数的过程中,提取 DNA 的步骤最为关键,如果提取效率不高,检测结果也会产生很大的偏差^[3, 17];而在本研究中无需 DNA 的提取,通过以反应体系中包括的宿主内部基因组中的特异基因做对照,可直接评价质粒模板的含量,从而推测质粒的相对拷贝数,这样可显著减少实验操作过程中误差累积对结果造成的干扰。

另外,需要说明的是,使用该技术进行质粒相对拷贝数的计算时,要特别注意 PCR 扩增循环参数的选择。如果循环数过大,PCR 扩增就会进入平台期而导致各样品间的条带差异不明显甚至消失,以至对结果的判断产生干扰。因此,通过循环梯度 PCR 进行循环数的选择很关键,以确保宿主基因组和质粒 DNA 的扩增均处于 PCR 扩增的对数期内。

总之,多重 PCR 技术以其高效快捷、高度特异敏感、能加速实验进程等优点已得到很多领域科研工作者的青睐^[10-13]。该技术在质粒相对拷贝数鉴定中的应用,与传统的检测手段相比具有显著的技术优势,并且还可推广到酵母中基因克隆和表达量的鉴定,以及真核细胞中转染外源基因的丰度鉴定等。因此,多重 PCR 技术的引入可以显著提高质粒等外源基因丰度的检测效率,从而使选择合适的宿主细胞进行基因克隆和蛋白的表达更加便利。

参考文献

- [1] 门大鹏. 质粒. 生物工程进展, 1993, 14(3): 49-50.
Men D P. Progress in Biotechnology, 1993, 14(3): 49-50.
- [2] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002. 2-6.
Sambrook J, Russell D W. Translated by Huang P T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd. Beijing: Science Press, 2002. 2-6.
- [3] 周涛. 质粒拷贝数的测定方法. 生物技术通讯, 1999, 10(1): 51-57.
Zhou T. Letters in Biotechnology, 1999, 10(1): 51-57.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002. 597-701.
Sambrook J, Russell D W. Translated by Huang P T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd. Beijing: Science Press,

- 2002, 597-701.
- [5] Chamberlain J S, Gibbs R A, Ranier J E, et al. Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16 (23): 11141-11156.
- [6] 刘正斌,高庆荣,王瑞霞. 多重 PCR 技术在植物生物学研究中的应用. *分子植物育种*, 2005, 3(2): 261-268.
Liu Z W, Gao Q R, Wang R X. *Molecular Plant Breeding*, 2005, 3(2): 261-268.
- [7] Olufemi J A, Kumar P L, Naidu R A. Multiplex PCR for the detection of African cassava mosaic virus and East African cassava mosaic Cameroon virus in cassava. *J Virol Methods*, 2008, 154 (1):111-120.
- [8] Del R B, Binetti A G, Martin M C, et al. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiol*, 2007, 24(1): 75-81.
- [9] 张平平,刘宪华. 多重 PCR 方法对大豆转基因食品的定性检测. *食品科学*, 2004, 25(1): 227-230.
Zhang P P, Liu X H. *Food Science*, 2004, 25(1): 227-230.
- [10] Shen Z Y, Qu W B, Wang W, et al. MP primer: a program for reliable multiplex PCR primer design. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11(1): 143.
- [11] Qu W B, Shen Z Y. MFEprimer: multiple factor evaluation of the specificity of PCR primers. *Bioinformatics*, 2009, 25 (2): 276-278.
- [12] Chang P W, Song W J, Wu K Y, et al. Use of a fluorescent-PCR reaction to detect genomic sequence copy number and transcriptional abundance. *Genome Res*, 1996, 6 (10): 1013-1026.
- [13] Gallaway A S, Abranches R, Scroggs J, et al. High-throughput transgene copy number estimation by competitive PCR. *Plant Mol Bio Rep*, 2002, 20(3):265-277.
- [14] Yang L T, Ding J Y, Zhang C M, et al. Estimating the copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR. *Plant Cell Rep*, 2005, 23(10-11):759-763.
- [15] 樊佳佳,白俊杰,马冬梅,等. 转红色荧光蛋白基因唐鱼外源基因拷贝数的测定. *生物技术通讯*, 2011, 22(1):61-65.
Fan J J, Bai J J, Ma D M, et al. *Letter in Biotechnology*, 2011, 22(1):61-65.
- [16] 王稳,屈武斌,申志勇,等. 利用 MPprimer 设计引物并优化扩增条件以提高多重 PCR 效率的实验研究. *生物化学与生物物理进展*, 2010, 37 (3):342-346.
Wang W, Qu W B, Shen Z Y, et al. *Prog Biochem Biophys*, 2010; 37 (3): 342-346.
- [17] 丁满生,马文峰,郭美锦,等. 温度诱导模式对重组大肠杆菌质粒拷贝数的影响. *华东理工大学学报*, 2006, 32(1): 33-37.
Ding M S, Ma W F, Guo M J, et al. *J East China Univ of Science and Technology*, 2006, 32(1): 33-37.

A New Method to Identify the Copy Number of Plasmid by Multiplex PCR

LI Yuan^{1,2} REN Chang-hong¹ WU Yong-hong¹ YE Qiao¹ SHI Jin-ping¹
QU Wu-bin¹ ZHENG Xiao-fei¹ LIU Hu-qi² ZHANG Cheng-gang^{1,2}

(1 Beijing Institute of Radiation Medicine, State Key Laboratory of Proteomics, Beijing 100850, China)

(2 The College of Life Science, Northwest Agriculture and Forest University, Yangling 712100, China)

Abstract The PCR technique has been widely used in various fields of molecular biological studies. However, multiplex PCR for determination of plasmid copy number has not been reported. To further explore the research in this field, based on the multiple PCR primer design and evaluation computer programs, Two-plex PCR primers were designed to amplify the bacterial genome and plasmid DNA; then using bacterial liquid of *E. coli* with different plasmid vectors as the template for multiple PCR reactions. Finally, the integrated optical density of the gel image was analyzed to determine relative copy number of the plasmids. The data showed that the result of relative copy number of the plasmids determined by multiplex PCR was consistent with which determined by Real-time PCR and Southern blot, indicating that multiplex PCR was an alternative and valuable method compared with traditional techniques in routine experiments. So a rapid and efficient method in identification of the plasmid copy number was established, which provides a suitable way to host cell selection by easily and rapidly determining the relative copy number of clone vector and expression vector.

Key words Copy number of plasmid Multiplex PCR Bacterial liquid Real-time quantitative PCR Southern blot