

• 基础实验研究论著 •

多重荧光错配引物 PCR 进行单核苷酸多态性检测分析

孙岳枫[△], 李顺天

(天津市传染病医院检验科 300192)

摘要:目的 发展一种快速、检测位点数适中(5~20)、既适用于中小规模科研也适用于临床检测的单核苷酸多态性(SNPs)分型方法。**方法** 通过改进等位基因特异性聚合酶链反应(PCR),加入公用荧光引物,发展一种利用毛细管电泳的多重荧光错配引物 PCR 方法,对已知基因型的 8 份健康者样本的 5 个线粒体 SNPs 位点进行分型。**结果** 一条公用荧光引物即可同时完成 5 个 SNPs 位点的分型,其结果与已知基因型完全一致。**结论** 多重荧光错配引物 PCR 在中小规模科研及临床检测中具有经济、快速的优势,该方法尤其适用于微量 DNA 样本的检测。

关键词:聚合酶链反应; 等位基因; 多态性,单核苷酸; 分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.09.003 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)09-1030-03

Single nucleotide polymorphisms analysis using multiplex fluorescence mismatching PCR

Sun Yuefeng[△], Li Shuntian

(Clinical Laboratory, Tianjin Infectious Disease Hospital, Tianjin 300192, China)

Abstract: **Objective** To develop a new method for multiple typing of single nucleotide polymorphisms(SNPs) suitable for clinical detection. **Methods** This method was developed from allele-specific polymerase chain reaction(ASPCR) by introducing universal fluorescent primers to construct a new multiplex fluorescence mismatching PCR utilizing capillary electrophoresis. Samples from eight healthy subjects were detected for five mitochondria SNPs types by newly constructed method. **Results** Five SNPs could be typed simultaneously by using one universal fluorescent primer, and the detected results was fully consistent with known genotypes. **Conclusion** Multiplex fluorescence mismatching PCR could be economic and rapid for small and medium-sized scientific research and clinical detection, which might be especially suitable for detecting minor DNA samples.

Key words: polymerase chain reaction; alleles; polymorphism, single nucleotide; genotyping

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)检测方法从单位点低通量错配聚合酶链反应(PCR-RFLP)到多位点高通量芯片杂交、TaqMan、illumina 等,准确性不断提高,成本不断下降^[1-2]。但是针对科研中上百样本量几个或十几个位点的分型、临床检验中少位点小样本量 SNPs 的检测往往大通量分型方法在这类研究中并不经济、有效,而 PCR-RFLP 方法具有实验速度慢、准确性不高等缺点^[3]。等位基因特异性 PCR(allele specific PCR, ASPCR)根据引物 3'端和等位基因多态位点的特异性结合,依据特异引物 PCR 产物的有、无区分不同的多态^[4]。该方法成本低、快速,但引物特异性较差,准确性低,假阳性率高,且只能进行单位点分型^[5]。因此,本研究根据 ASPCR 基本原理,从多方面进行改进,首先将原来的 1 轮 PCR 变成 1 轮指数扩增的 PCR 和 1 轮线性扩增的 PCR,对位点特异性引物 3'端进行修改,提高分辨率;其次在第 1 轮 PCR 下游引物 5'端加上公用接头,并且第 2 轮 PCR 根据

公用接头设计公用荧光引物,降低摸索条件更换荧光引物成本;第 2 轮 PCR 产物利用 ABI3100 基因分析仪毛细管电泳技术提高检测灵敏度,实现了同时对线粒体 5 个多态位点进行分型,得到可靠和满意的结果。

1 材料与方法

1.1 材料 引物和公用荧光引物为本室设计,由上海生工生物公司合成,公用荧光引物采用 6-FAM 荧光标记;PCR 反应试剂和酶来自于上海生工生物公司 Taq DNA polymerase 和配套试剂(dNTP, Mg²⁺, buffer)。相对分子质量内标为 ABI 的 ROX500;基因分析仪器为 ABI 3100 genetic analyzer,采用 hidi 变性和 pop4 凝胶进行毛细管电泳。

1.2 方法 针对常用人类线粒体 5 个 SNPs 分型位点设计多重荧光错配 PCR 引物^[6],对已知基因型的 8 份健康者样本进行第 1 轮指数扩增 PCR 和第 2 轮线性扩增多重 PCR。线粒体多态位点信息及两轮 PCR 引物序列见表 1。

表 1 线粒体多态位点及两轮 PCR 引物序列

线粒体多态位点		引物序列	PCR 片断大小(bp)
C5178A	mit-5178-f	TCCTAACTACTACCGCATTCC	
	mit-5178-r	CGAGTTCTGCTTGCGACGTGATGGTGGCTATGATGG	
	mit-5178-f	CTCGCACCTGAAACAAGC*	246
	mit-5178-f	GACTCGCACCTGAAACAAGA	184

[△] 通讯作者, Tel:13752322654; E-mail: sanpi1020@sina. com。

续表 1 线粒体多态位点及两轮 PCR 引物序列

线粒体多态位点		引物序列	PCR 片断大小(bp)
T9824C	mit-5178-r	CGAGTTCTGCTTGCGAC	186
	mit-9824-f	ACATCCGTATTACTCGCATC	
	mit-9824-r	CGAGTTCTGCTTGCGACGTAAGGCTAGGAGGGTGTTG	
	mit-9824-f	ACAGGCTTCCACGGA G TT*	516
	mit-9824-f	GTACAGGCTTCCACGGA G TC	315
G10310A	mit-9824-r	CGAGTTCTGCTTGCGAC	317
	mit-10310-f	CTTACGAGTGCGGCTTC	
	mit-10310-r	CGAGTTCTGCTTGCGACTATGTGTTGGAGATTGAGACT	
	mit-10310-f	CCCTACAAACAAC TAAC G TG	576
	mit-10310-f	TACCCTACAAACAAC TAAC G TA	451
C10400T	mit-10310-r	CGAGTTCTGCTTGCGAC	453
	mit-10400-f	与 10310-f 相同	
	mit-10400-r	与 10310-r 相同	
	mit-10400-f	AAAAAGGATTAGACTGAGCC	360
	mit-10400-f	TGAAAAAGGATTAGACTGAGCT	362
C12705T	mit-10400-r	CGAGTTCTGCTTGCGAC	
	mit-12705-f	ATCCATTGTCGCATCCACC	
	mit-12705-r	CGAGTTCTGCTTGCGACTCCTACGCCCTCTCAGCC	351
	mit-12705-f	GTTCTTCAAATATCTACTC G TC	111
	mit-12705-f	TGGTTCTTCAAATATCTACTC G TT	113
	mit-12705-r	CGAGTTCTGCTTGCGAC	

* :黑体为 3'端错配碱基,加边框为 3'端倒数第 3 个位点设计的错配。

1.2.1 第 1 轮五重 PCR 体系(20 μL)和条件 10 mM Primer (0.5+0.5)μL×4, Taq 酶 0.2 μL, 2 mM each dNTP 2 μL, 2.0 mM Mg²⁺ 2.0 μL, ddH₂O 8.8 μL, 10×buffer 2 μL, 20 ng/μL 模板 1 μL。95 ℃预变性 5 min, 95 ℃变性 30 s, 54 ℃退火 35 s, 72 ℃延伸 35 s, 共 35 个循环, 最后 72 ℃总延伸 6 min。根据第 1 轮 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图上条带亮度对第 1 轮产物进行稀释, 保证第 2 轮 PCR 模板浓度适中, 残留第 1 轮引物浓度减少。

1.2.2 第 2 轮荧光多重错配 PCR 体系(10 μL)和条件 10 mM Primer 0.05×10, 荧光引物 0.3 μL, Taq 酶 0.1 μL, 2 mM each dNTP 1 μL, 2.0 mM Mg²⁺ 0.8 μL, ddH₂O 5.8 μL, 10×buffer 1 μL, 第 1 轮产物稀释模板 0.5 μL。95 ℃预变性 5 min, 95 ℃变性 30 s, 50 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 共 10 个循环, 最后 72 ℃总延伸 5 min。

1.2.3 变性和上样 9 μL hidi, 0.2 μL ROX500 与第 2 轮产物 0.8 μL 混匀, 95 ℃变性 5 min, 然后迅速放入冰水中冷却 4 min, 利用 ABI3100 基因分析仪进行毛细管电泳。

1.2.4 结果分析 采用 genescan 和 genotyper2.0 软件进行分析, 得到不同片断大小的产物, 再转化为分型位点及其基因型(具体转化方法见表 1)。

2 结 果

2.1 线粒体 5 位点引物修改前五重分型结果 如表 1 所示,

线粒体 5 个多态位点中 C12705T、G10310A、C10400T 3 个位点成功分型, C5178A 位点分型图中出现 A 多态位点双峰; T9824C 位点分型图中 T 多态位点无信号, C 多态位点出现双峰。

2.2 线粒体 C5178A、T9824C 位点引物修改后分型结果 对 5178A 多态位点引物倒数第 3 个碱基引入错配, 引物序列修改为 mit-5178A-f: GACTCGCACCTGAAACATGA。9824T 多态位点引物倒数第 3 个碱基去除错配, 引物序列修改为 mit-9824T-f: ACAGGCTTCCACGGACTT。引物经过修改后分型结果得到改善, 5178A 多态双峰消失, 9824T 多态成功出峰。

3 讨 论

线粒体 5 个 SNPs 位点分型实验研究证明了多重荧光错配引物 PCR 方法对 SNPs 分型的可行性及优越性, 具有成功率高、特异性强的特点。作者在实验过程中发现, 分型成功的关键主要取决于以下几点: 引物设计方法、PCR 产物片断大小差异、引物浓度配比、Taq 酶的选择、Mg²⁺ 浓度等。

5 位点分型第 2 轮 PCR 的引物设计研究结果表明, 引物 3'端倒数第 3 个碱基的错配设计有利于提高错配 PCR 的特异性^[7]。除了 9824T 在引物 3'端倒数第 3 个碱基错配后无法延伸外, 其余位点引物设计证明了这一点。在少数引物 3'端倒数第 3 个碱基错配后仍有非特异性延伸的位点, 可以通过调整 Mg²⁺ 浓度、第 2 轮 PCR 引物的比例或将错配位点改在引物 3'

端倒数第 2 个碱基来提高特异性。为减少第 1 轮残留引物对第 2 轮荧光 PCR 的影响,减少第 1 轮 PCR 产物的电泳峰,采用虾碱酶和外切酶对第 1 轮 PCR 产物进行纯化。本研究尝试纯化后发现,第 1 轮 PCR 产物峰的高度降低,第 2 轮 PCR 效率提高。

本研究结果显示,由于 5178 位点的第 1 轮和第 2 轮产物都很短,其扩增效率特别高,在引物量非常少的时候仍能检测到,所以影响其他位点两轮 PCR 的效率。因为在多重 PCR 中小片断产物对大片断产物的竞争是很强的^[8]。因此,本研究尝试将片断大小类似的位点同时实验,最后一起跑胶,发现大大提高了原来多重 PCR 中低效率位点的信号。所以建议在多重荧光错配引物 PCR 分型的引物设计中第 1 轮 PCR 的产物长度尽量相近,而第 2 轮产物也不要相差太大,长度以 120~300 bp 较好。

在第 1 轮多重 PCR 中尝试了普通 Taq 酶和热启动的 Taq 酶(PCR 程序使用 touchdown),发现使用热启动酶和 touchdown 程序大大提高了第 1 轮多重 PCR 成功率。第 2 轮荧光 PCR 尝试采用普通 Taq 酶、koddash 酶和热启动酶分别进行 5 位点的分型,热启动酶很难成功分型所有位点,koddash 酶虽然扩增效率高,但非特异性太强,表明对于一般的多重荧光引物 PCR 分型,使用扩增效率和特异性都居中的普通 Taq 酶效果更好。在 5 位点分型方法中采用了 2.0、1.6、1.2 mM 3 种 Mg²⁺ 浓度,其中 1.2 mM 浓度时很多位点无信号,2.0 mM 与 1.6 mM 比较,在峰形和特异性上比 1.6 mM 略显优势。

多重荧光错配引物 PCR 进行 SNPs 检测适合小样本位数适中的科研和临床项目。实验中多位点分型仅用一条荧光引物,降低了摸索条件时更换错配引物提高特异性的成本,同时使用其他荧光标记公用荧光引物,可以使每次电泳的位点数成倍增长,降低成本。但通过实验摸索发现,要得到高特异性的多重分型结果,需要进行比较细致的条件摸索。另外由于该方法采用两轮 PCR,有很高的灵敏度,非常适合对微量 DNA 样本进行分型分析如利用该方法可以实现对临床中多种病原微生物的同时检测^[9]、微生物耐药性监测^[10]、微生物的分型等。这些潜在的应用前景为多重荧光引物错配 PCR 提供了进

一步研究和优化的必要性。

参考文献:

[1] Taylor G. Laboratory methods for the dmetection of mutations and polymorphisms in DNA[M]. Boca Raton: CRC Press, 1997: 45-51.

[2] Martino A, Mancuso T, Rossi AM. Application of high-resolution melting to large-scale, high-throughput SNP genotyping: A comparison with the TaqMan method[J]. J Biomol Screen, 2010, 15 (6): 623-629.

[3] Sibley LD, LeBlane AJ, Pfefferkom ER, et al. Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for toxoplasma gondii[J]. Genetics, 1992, 132(4): 1003-1015.

[4] Billadeau D, Blackstadt M, Greipp P, et al. Analysis of B-lymphoid malignancies using allele-specific polymerase chain reaction: a technique for sequential quantitation of residual disease[J]. Blood, 1991, 78: 302-3029.

[5] 黄代新, 杨庆恩, 赵贵森. 片段长度差异等位基因特异性 PCR——一种改良的 SNP 分型新方法[J]. 法医学杂志, 2005, 21(1): 11-14.

[6] Wen B, Li H, Gao S, et al. Genetic structure of Hmong-Mien speaking populations in East Asia as revealed by mtDNA lineages [J]. Mol Biol Evol, 2005, 22(3): 725-734.

[7] 王瑞恒, 刘利民, 赵金玲, 等. 基于等位基因特异性 PCR 原理建立的 SNP 分型新方法[J]. 法医学杂志, 2008, 24(3): 189-193.

[8] 曾凡胜, 陆学东. 多重 PCR 技术在呼吸系统感染疾病诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(2): 147-148.

[9] Fan W, Hamilton T, Webster-Sesay S, et al. Multiplex real-time SYBR Green I PCR assay for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria[J]. Mol Cell Probes, 2007, 21(4): 245-256.

[10] 姚杰, 吕晴, 贾建安, 等. 运用多重 PCR 技术检测 CTX-M 型耐药基因的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 806-808.

(收稿日期: 2012-01-08)

(上接第 1029 页)

disease virus represses the activation of human hepatic stellate cells and reverses the development of hepatic fbrosis in mice[J]. Liver inter, 2009, 29(4): 593-602.

[4] 王豫萍, 程明亮, 吴亚云, 等. 蓝莓对大鼠肝星状细胞增殖、活化的影响及机制探讨[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(35): 2504-2508.

[5] 俞富祥, 苏龙丰, 季世强, 等. 改良小鼠肝星状细胞的分离、培养及性质鉴定[J]. 肝胆胰外科杂志, 2010, 22(6): 457-459.

[6] 许小兵, 李敏利, 郭婧云, 等. Percoll 密度梯度离心分离大鼠肝星状细胞[J]. 医学研究生学报, 2009, 22(6): 668-669, 672.

[7] 吕晓霞, 许伟华, 孙向阳. 一种简便经济的肝星状细胞分离方法[J]. 山西医科大学学报, 2002, 33(5): 464-465.

[8] Liu W, Hou Y, Chen H, et al. Sample preparation method for isolation of single-cell types from mouse liver for proteomic studies [J]. Proteomics, 2011, 11(17): 3556-3564.

[9] Geerts A. History, Heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells[J]. Sem Liv Dis, 2001, 21: 311-335.

[10] Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver[J]. Physiol Rev, 2008, 88: 125-172.

[11] 徐玉兵, 高春芳, 张蜀豫, 等. 肝细胞性肝癌合并不同模式乙型肝炎血清标志物的临床分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 552-553, 556.

[12] Xu L, Hui AY, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis[J]. Gut, 2005, 54: 142-151.

[13] 吴正林, 吴意, 叶军, 等. 血清中肝纤维化指标测定在肝病中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(1): 31-32.

(收稿日期: 2011-11-01)