

不对称 PCR-SSCP 在基因突变检测中的应用

张小辉^{1,2}, 许尚忠^{2,1}, 高 雪², 张路培², 任红艳², 陈金宝²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国农业科学院 畜牧研究所, 北京 100094)

[摘 要] 为了研究不对称 PCR-SSCP 在基因突变检测中的准确性, 以鲁西黄牛和荷斯坦奶牛为研究对象, 用不对称 PCR-SSCP 分析技术分析了牛 *SMAD4* 基因 3 端非翻译区的碱基突变情况, 比较了不对称 PCR-SSCP 和传统 PCR-SSCP 分析的优缺点。结果表明, 鲁西黄牛和荷斯坦奶牛 *SMAD4* 基因 3 端非翻译区有 1 个 T 碱基插入突变位点和 1 个 G → A 突变位点, 其中 G → A 突变产生了 1 个 *Hha* 酶切位点; 不对称 PCR-SSCP 和 *Hha* 酶切分析 116 头鲁西黄牛和 75 头荷斯坦奶牛群体 G → A 突变位点的频率完全一致, 说明不对称 PCR-SSCP 不仅可以用于基因突变的检测, 而且具有较高的准确性; 不对称 PCR-SSCP 较传统 PCR-SSCP 的条带少且带型清晰、稳定性较高。以上结果表明, 不对称 PCR-SSCP 可以用于基因突变的检测。

[关键词] 不对称 PCR-SSCP; 基因突变; *SMAD4*

[中图分类号] S813.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)06-0015-04

Application of asymmetric PCR-SSCP in gene mutation detecting

ZHANG Xiao-hui^{1,2}, XU Shang-zhong^{2,1}, GAO Xue², ZHANG Lu-pei²,
REN Hong-yan², CHEN Jin-bao²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institution of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100094, China)

Abstract: The advantage and disadvantage of asymmetric PCR-SSCP and traditional PCR-SSCP were compared to analyze the character and accurate rate in detecting mutation in this study. The mutations in 3' UTR region of *SMAD4* gene were analyzed by asymmetric PCR-SSCP in Luxi cattle and Holstein cow and one insert T mutation and one G → A mutation were found in this region. The G → A mutation created a *Hha* enzyme digestion position and the frequency was studied by asymmetric PCR-SSCP and enzyme digestion in 116 Luxi cattle and 75 Holstein cows and got the same results. The asymmetric PCR-SSCP had a few bands, which were clearer and stabler than traditional PCR-SSCP. This indicated the asymmetric PCR-SSCP was suitable for mutations detecting.

Key words: asymmetric PCR-SSCP; gene mutation; *SMAD4* asymmetric

突变检测技术是分子生物学研究的重要内容之一, 它在疾病诊断、分子育种等方面具有重要的价值。突变检测主要包括对已知突变位点的检测和对未知突变位点的检测两大类^[1]。随着分子生物学技术的飞速发展, 越来越多的新技术、新方法被用于突

变检测, 如 DNA 芯片技术 (DNA chip)^[2-4]、变性高效液相色谱技术 (dHPLC)^[5-6] 等。这些技术的应用大大提高了突变检测的自动化水平和效率, 降低了劳动强度, 但其缺点是需要购买专门的仪器设备和软件, 在实际工作中难以推广。单链构象多态性分

† 收稿日期: 2006-03-16

[基金项目] 国家“863”计划项目 (2002AA242011)

[作者简介] 张小辉 (1978 -), 男, 河南洛阳人, 在读博士, 主要从事生物技术与家畜育种研究。E-mail: zhangxiaohui78@126.com

[通讯作者] 许尚忠 (1952 -), 男, 河北张家口人, 研究员, 主要从事分子数量遗传与家畜育种研究。

E-mail: simmenta@vip.sina.com

析(Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP)具有快速、经济的优点,是目前对未知突变进行检测的主要方法之一。SSCP的原理是将PCR产物在加热的同时使用变性剂,使双链DNA(dsDNA)变为单链DNA(ssDNA),变性后的单链DNA在低温下急速冷却时根据其一级结构进行折叠,形成特定的构象,由于突变改变了单链DNA的一级结构,使其折叠成不同的构象,变性后的单链DNA在聚丙烯酰胺凝胶中电泳时,不同构象的单链由于迁移率的差异而彼此分开,形成不同的条带,从而区分野生型个体与突变型个体。

PCR-SSCP是根据单链DNA折叠的构象区分野生型和突变型个体的,而在常温下单链DNA的构象不稳定,很容易受到外界环境因素的干扰,因此,PCR-SSCP分析的稳定性较差,相同的样品在多次重复试验中可能有不同的结果。另外,有些DNA片断在进行PCR-SSCP分析时产生的条带较多,距离较近,给基因型判别带来很大困难,降低了检测的准确性。为了克服传统PCR-SSCP分析技术的不足,提高PCR-SSCP分析的稳定性,已开发了新的不对称PCR-SSCP分析技术。因此,本试验以鲁西黄牛和荷斯坦奶牛为研究对象,用不对称PCR-SSCP分析技术研究了牛SMAD4基因3'端非翻译区的碱基突变情况,比较分析了不对称PCR-SSCP和传统PCR-SSCP分析的优缺点,以期为该方法在基因突变检测中的应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 牛血样 鲁西黄牛血样采自山东菏泽鲁西黄牛原种场,共116份;荷斯坦奶牛血样采自西安草滩农场,共75份,颈静脉采血,ACD抗凝后低温带回实验室, - 80 °C保存备用。

1.1.2 主要试剂 Taq DNA聚合酶、dNTP混合物和DNA回收试剂盒,均购自北京天为时代公司;Hha I限制性内切酶,购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.3 引物 根据牛SMAD4(Mothers Against DPP4)基因序列,设计用于3'端非翻译区扩增的2对引物M1和M2,其中M1的上游引物:5'-ACCA-GACAAA GGA GTA TCGT-3',下游引物:5'-TTAGCT-TAGCATTGCCACCTGT-3',预期扩增的片段长度为259 bp;M2的上游引物:5'-TGTGCCA TGTGGGT-GAGTTA-3',下游引物:5'-AGGCTCCTTA GTA-

ACCAACC-3',预期扩增的片段长度为345 bp。引物由赛百盛生物工程公司合成。

1.2 牛基因组DNA的提取

用常规的酚-氯仿抽提法从血样中提取牛基因组DNA。

1.3 牛SMAD4基因的不对称PCR分析

1.3.1 牛SMAD4基因的不对称PCR扩增 采用二次PCR方法,即先用等浓度的引物进行第一次PCR扩增,扩增出目的片段的双链(dsDNA),再以此PCR产物为模板,利用其中的一条引物进行二次PCR扩增,扩增出目的片段的单链(ssDNA)。M1引物第一次PCR扩增总的反应体系为20 μL,其中10 × Buffer(含20 mmol/L Mg²⁺) 2.0 μL,10 mmol/L dNTPs 0.4 μL,10 mmol/L 上、下游引物各0.6 μL,牛模板DNA 50 ng,2 U/μL Taq DNA聚合酶0.2 μL,超纯水15.2 μL。PCR反应条件:95 °C预变性5 min;94 °C变性30 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,33个循环;最后72 °C延伸10 min。PCR扩增产物用15 g/L琼脂糖凝胶电泳检测。M1引物第二次PCR扩增总反应体系也为20 μL,其中10 × Buffer(含20 mmol/L Mg²⁺) 2.0 mL,10 mmol/L dNTPs 0.4 μL,10 mmol/L 上、下游引物各0.6 μL,M1引物第一次PCR扩增产物1 μL,2 U/μL Taq DNA聚合酶0.2 μL,超纯水15.8 μL。第二次PCR反应条件同第一次。M2引物反应体系与M1引物的反应体系相同;M2引物的退火温度为57 °C,其余反应条件同M1引物。

1.3.2 扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳 取3 μL扩增的单链DNA,加1 μL 6 × Loading buffer混匀,在120 g/L非变性聚丙烯酰胺凝胶(m(Acr) m(Bis) = 29 : 1)上电泳。电泳结束后进行银染显带,并记录结果。

1.3.3 扩增产物的酶切分析 酶切反应体系为10 μL,包括10 U/μL的Hha I酶0.3 μL,10 × Buffer 1.0 μL,PCR产物4.0 μL,水4.7 μL。混匀后在37 °C培养箱中酶切8~10 h,用1.5%琼脂糖凝胶检测酶切结果。

2 结果与分析

2.1 不对称PCR-SSCP与传统PCR-SSCP分析效果的比较

PCR-SSCP分析条带较多,且有些条带相距较近,带型模糊不清,尽管能分辨出个体间的差异,但不容易分清基因型,易造成误判。如图1中,第1泳

道和第 6 泳道有部分条带较弱,与第 3 泳道存在明显差异,但经不对称 PCR-SSCP 和酶切分析证明都为 AB 基因型个体。不对称 PCR-SSCP 分析得到的条带较少,只有 1 条带,如果检测到突变杂合子,会同时出现突变条带和野生条带,条带非常清晰,容易判型(图 2 和图 3)。

多次重复试验结果表明,不对称 PCR-SSCP 分析结果稳定,带型一直保持不变,而传统 PCR-SSCP 分析的带型已经发生了改变。

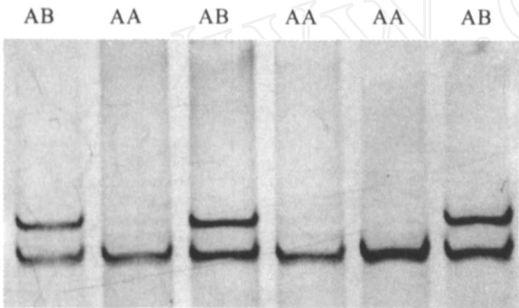


图 2 M1 引物扩增产物不对称 PCR-SSCP 图谱

Fig. 2 Asymmetric PCR-SSCP analysis of M1 primer PCR production

2.2 不对称 PCR-SSCP 分析在突变检测上的应用

用不对称 PCR-SSCP 在鲁西黄牛 *SMAD4* 基因 3 端非翻译区找到了 2 个突变位点,1 个位于 M2 引物扩增片段的 61 bp 处(插入了 1 个碱基 T);另 1 个位于 M1 引物扩增片段的 116 bp 处(发生了 G → A 的突变)。这 2 个突变都能用不对称 PCR-SSCP 分清基因型,其中 116 bp 处的 G → A 突变产生了 1 个 *Hha* I 酶切位点,可将 259 bp 的扩增产物酶切为 143 bp 和 116 bp 的片段(图 4)。

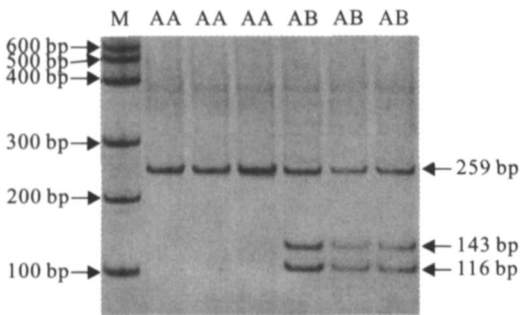


图 4 M1 引物扩增产物的 *Hha* I 酶切图

Fig. 4 *Hha* I enzyme digestion of M1 primer PCR production

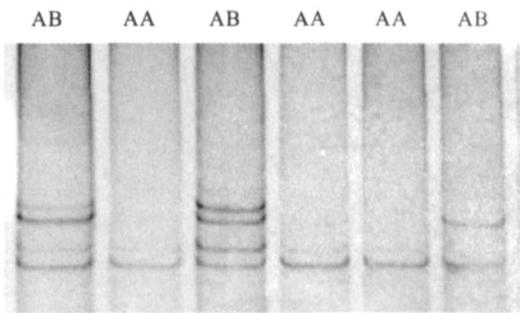


图 1 M1 引物扩增产物 PCR-SSCP 图谱

Fig. 1 PCR-SSCP analysis of M1 primer PCR production

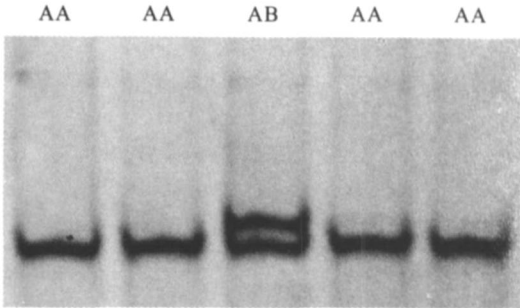


图 3 M2 引物扩增产物不对称 PCR-SSCP 图谱

Fig. 3 Asymmetric PCR-SSCP analysis of M2 primer PCR production

2.3 不对称 PCR-SSCP 分析与酶切比较

用不对称 PCR-SSCP 和 *Hha* I 酶切的方法对 116 头鲁西黄牛和 75 头荷斯坦奶牛 *SMAD4* 基因 3 端非翻译区的 G → A 突变进行了检测,结果见表 1。由表 1 可知,用不对称 PCR-SSCP 在 116 头鲁西黄牛中发现了 108 头 AA 型(野生型)个体和 8 头 AB 型(突变型)个体,没有发现 BB 型个体;在 75 头荷斯坦奶牛中发现了 71 头 AA 型个体和 4 头 AB 型个体,也没有发现 BB 型个体。随后的酶切分析结果表明,不对称 PCR-SSCP 所区分的基因型完全正确,从而说明不对称 PCR-SSCP 在个体基因型判别上具有很高的准确性和重复性。

表 1 不对称 PCR-SSCP 和 *Hha* I 酶切在鲁西黄牛和荷斯坦奶牛基因型判别上的比较

项目 Item	鲁西黄牛 Luxi cattle			荷斯坦奶牛 Holstein cows			总计 Total
	AA	AB	BB	AA	AB	BB	
不对称 PCR-SSCP Asymmetric PCR-SSCP	108	8	0	71	4	0	191
<i>Hha</i> I 酶切 Enzyme digestion	108	8	0	71	4	0	191

3 讨 论

3.1 不对称 PCR-SSCP 与传统 PCR-SSCP 的比较

稳定性差一直是 PCR-SSCP 分析中的一大缺点,许多因素如温度、电压、胶浓度等均影响 PCR-SSCP 的分析结果,导致同一样品多次重复试验结果不一致,尤其在条带较多时更容易发生。随着分子生物学技术的不断发展,PCR-SSCP 分析技术不断得到改善,其中将不对称 PCR 技术引入到 SSCP 分析中,建立的不对称 PCR-SSCP 分析技术是对传统 PCR-SSCP 分析技术的一次重大改进。Kiyama 等^[7]研究表明,在环境温度恒定的情况下,不对称 PCR-SSCP 的重复性很好,即使在电压较高的情况下带型也不发生改变,并且显著缩短电泳时间。这主要是由于不对称 PCR-SSCP 不需要变性,单链形成的效率较高,形成的单链空间构象稳定,对环境温度变化的抵抗力增强,因此,不对称 PCR-SSCP 较传统的 PCR-SSCP 稳定。电压对 PCR-SSCP 分析的影响主要是通过改变聚丙烯酰胺凝胶的温度实现的,随着电压的上升,产生的热量也逐渐上升,当这些热量不能及时排出时会导致聚丙烯酰胺凝胶的温度发生改变,使一些结构不太稳定的单链构象发生变化,从而对 PCR-SSCP 分析产生影响。

传统 PCR-SSCP 在目的片段浓度较高的情况下,双链 DNA 变性不完全或变性后的单链 DNA 在电泳过程中重新复性,从而对分析结果产生影响,而不对称 PCR-SSCP 直接扩增出单链 DNA,解决了传统 PCR-SSCP 在这方面的不足^[8]。另外,传统 PCR-SSCP 扩增产物中残留的引物能与单链结合,在电泳过程中干扰单链的迁移率,对分析也有一定的影响^[9],而不对称 PCR 能最大限度地消耗掉多余的引物,即使有少量的引物残留,引物与扩增的单链也不能结合,可以避免传统 PCR-SSCP 在这方面的不足。

3.2 不对称 PCR-SSCP 与基因突变检测

通过不对称 PCR-SSCP 分析发现,碱基突变有时只改变 DNA 双链中一条链的构象,如本试验中, M1 引物的扩增片段 116 bp 处的 G → A 突变只对正链的构象有影响, M2 引物扩增片段 61 bp 处插入 T 突变只对负链的构象有影响。不对称 PCR-SSCP 的这个特性在基因型判别上非常有用,可以只利用双链中的一条,如 M1 引物的正链或 M2 引物的负链就可以明确判断该个体的基因型。与传统的 PCR-SSCP 相比,不对称 PCR-SSCP 对个体基因型

的判定准确性有很大提高,本试验通过对 M1 引物扩增片段 116 bp 处 G → A 突变的酶切分析表明,不对称 PCR-SSCP 和酶切的准确性相当。在国外, Lazaro 等^[8]用不对称 PCR-SSCP 成功找到了 2 个与 I 型纤维神经瘤细胞生成有关的突变。Glavac 等^[10]用不对称 PCR-SSCP 检测了小鼠 β-珠蛋白基因,找到了 86 处碱基突变,并且发现突变碱基周围的序列能影响 PCR-SSCP 的灵敏度,高 GC 区域如果发生 A → G 的突变能明显增加条带的迁移率,相反, G → A 突变能降低条带的迁移率。Bhide 等^[11]用不对称 PCR-SSCP 对突变较复杂的绵羊 *OLA-DRB1* 基因的多态性进行了研究。这些研究表明,不对称 PCR-SSCP 在基因突变检测上有广泛的应用前景。

随着分子生物学技术的发展,将有更多新技术应用到 PCR-SSCP 中,如用荧光物质标记引物,提高 PCR-SSCP 分辨效率的荧光 SSCP^[12-13],将毛细管电泳技术与 SSCP 相结合的 SSCP-CE^[14-15]等,这些技术提高了 SSCP 分析的自动化水平和突变的检出效率,是未来突变检测的发展方向之一。

[参考文献]

- [1] Butler J M, Jiang B P, Belgrader P. Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms [J]. *Human Mutation*, 2001, 17: 475-492.
- [2] Choblet S, Colineau T, Abaibou H, et al. Detection of single nucleotide polymorphisms by minisequencing on a polypyrrole DNA chip designed for medical diagnosis [J]. *Lab Invest*, 2006, 86(3): 304-313.
- [3] Vernet G, Tran N. The DNA-Chip technology as a new molecular tool for the detection of HBV mutants [J]. *Clin Virol*, 2005, 34(1): 49-53.
- [4] Kim B C, Park J H, Gu M B. Development of a DNA microarray chip for the identification of sludge bacteria using an unsequenced random genomic DNA hybridization method [J]. *Environ Sci Technol*, 2004, 38(24): 6767-6774.
- [5] Lilleberg S L. In-depth mutation and SNP discovery using dHPLC gene scanning [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2003, 6(2): 237-252.
- [6] Ribas G, Neville M J, Campbell R D. Single-nucleotide polymorphism detection by denaturing high-performance liquid chromatography and direct sequencing in genes in the MHC class II region encoding novel cell surface molecules [J]. *Immunogenetics*, 2001, 53(5): 369-381.
- [7] Kiyama M, Fujita T. High-throughput asymmetric-PCR SSCP analysis using well-controlled temperature conditions [J]. *Biotechniques*, 1996, 21(4): 710-716.

(下转第 23 页)

[参考文献]

- [1] Jung B L, Jeoung E L, Jong H P, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72(1): 42-49.
- [2] Lakshmanan Y, Frimberger D, Gearhart J D, et al. Human embryoid body-derived stem cells in co-culture with bladder smooth muscle and urothelium [J]. *Urology*, 2005, 65(4): 821-826.
- [3] 王和平, 宋宇轩, 江红. 组织工程子宫构建的实验研究[J]. *解放军医学杂志*, 2006, 31(4): 342-345.
- [4] Osteen K G, Hill G A, Hargrove J T, et al. Development of a method to isolate and culture highly purified populations of stromal and epithelial cells from human endometrial biopsy specimens [J]. *Fertil Steril*, 1989, 52(6): 965-972.
- [5] 张芳婷, 宋天保, 王介东. 人子宫内膜基质细胞和腺体细胞的分离培养及鉴定[J]. *解剖学报*, 2001, 32(3): 238-240.
- [6] Fernandez-Shaw S, Shorter S C, Naish C E. Isolation and purification of human endometrial stromal and glandular cells using immunomagnetic microspheres[J]. *Hum Reprod*, 1992, 7(2): 156-161.
- [7] Akoum A, Doillon C J, Koutsilieris M, et al. Human endometrial cells cultured in a type collagen gel [J]. *J Reprod Med*, 1996, 41(8): 555-559.
- [8] 苑春莉, 韩丽英, 胡静, 等. 人总内膜间质细胞的体外培养[J]. *吉林大学学报:医学版*, 2004, 30(2): 267-269.
- [9] 宿爱琴, 糜若然, 涂持坤, 等. 高纯度子宫内膜分离和体外培养技术及其应用[J]. *医学研究生学报*, 2002, 15(2): 115-117.
- [10] Overton C E, Barolow D H, Fernandez, et al. *In vitro* culture of endometrial stromal and gland cells as a model for endometriosis: the effect of peritoneal fluid on proliferation [J]. *Fertil Steril*, 1997, 67(1): 51-56.
- [11] 张宏, 赵昀, 李亚里, 等. 人离体子宫内膜细胞培养方法的建立[J]. *军医进修学院学报*, 2002, 23(3): 192-194.
- [12] 戈一峰, 黄宇烽, 胡毓安, 等. 人子宫内膜细胞的纯化和培养[J]. *医学研究生学报*, 2005, 18(6): 496-498.
- [13] 王小青, 闫丽隽, 郭述真. 子宫内膜腺上皮及基质细胞的分离培养[J]. *山西医药杂志*, 2004, 33(8): 637-639.
- [14] 石书芳, 俞超芹, 刘玉环, 等. 人在位和异位子宫内膜腺上皮细胞和间质细胞的原代培养[J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25(11): 122-123.
- [15] Chan R W S, Caroline E G. Identification of label-retaining cells in mouse endometrium [J]. *Stem Cells*, 2006, 24: 1529-1538.
- [16] Schwab K E, Chan R W S, Caroline E G. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle [J]. *Fertil Steril*, 2005, 84 (Sup2): 1124-1130.
- [17] Caroline E G. Identification and characterization of human endometrial stem/progenitor cells [J]. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2006, 46: 250-253.

(上接第18页)

- [8] Lazaro C, Estivill X. Mutation analysis of genetic diseases by asymmetric PCR-SSCP and ethidium bromide staining: application to neurofibromatosis and cystic fibrosis [J]. *Mol Cell Probes*, 1992, 6(5): 357-359.
- [9] Isabelle T. Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency [J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(16): 3909-3910.
- [10] Glavac D, Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations [J]. *Hum Mutat*, 1993, 2(5): 404-414.
- [11] Bhide M R, Mikula I. Asymmetric PCR-SSCP: a useful tool for detection of OLA-DRB1 (MHC class II) gene polymorphism in slovak improved valachian sheep [J]. *Acta Vet Brno*, 2005, 74: 275-278.
- [12] Makino R, Kaneko K, Kurahashi T, et al. Detection of mutation of the p53 gene with high sensitivity by fluorescence-based PCR-SSCP analysis using low-pH buffer and an automated DNA sequencer in a large number of DNA samples [J]. *Mutation Research*, 2000, 452(1): 83-90.
- [13] Boutin P, Hani E H, Vasseur F, et al. Automated fluorescence-based screening for mutation by SSCP: use of universal M13 dye primers for labeling and detection [J]. *Biotechniques*, 1997, 23(3): 358-362.
- [14] Kozłowski P, Krzyżosiak W J. Optimum sample medium for single-nucleotide polymorphism and mutation detection by capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(8): 990-998.
- [15] Nishimura A, Tshako M. Single strand conformation polymorphism analysis of ras oncogene by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detector [J]. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48(6): 774-778.