

· 技术研究 ·

应用 DHPLC 筛查人类 mtDNA 高变区 I 的异质性

蒋琼橙, 伍新尧, 区雪玲, 孙宏钰
(中山大学法医学物证教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】检测人类 mtDNA HVI 区的异质性, 建立有效的筛查低水平异质性 DNA 的技术。【方法】扩增人 mtDNA 的 HVI 区内 269 bp 的片段, 以不同比例混合相差一个碱基的 2 种 DNA 片段的 PCR 扩增产物, 配制异质性 DNA 模型, 用变性高效液相色谱技术 (DHPLC) 检测, 确定最佳检测条件。【结果】应用 DHPLC 检测 HVI 区的片段 (269 bp), 最低可检测出含量为 5% 的异质性样本。在 80 例无关个体的 mtDNA 样本中, 共检测到 15 例具有异质性。【结论】所建立的 PCR-DHPLC 方法可用于检测 mtDNA 的异质性。

关键词: 变性高效液相色谱技术; 线粒体 DNA; 异质性

中国分类号: Q755

文献标识码: A

文章编号: 1672-3584(2004)01-0093-04

Screening the Heteroplasmy of Hypervariable Region I of Human mtDNA by DHPLC

JIANG Qiong-chen, WU Xin-yao, OU Xue-ling, SUN Hong-yu
(Department of Forensic Biology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract 【Objective】To examine the heteroplasmy of hypervariable region I of human mtDNA, and to establish an effective technique to screen low-level heteroplasmic DNAs. 【Method】The 269 bp PCR products of the hypervariable region I of 2 kinds of mtDNAs differed from only one alkali base were mixed in different ratios as models. Heteroplasmic mtDNAs were examined by DHPLC. The optimal conditions for testing were determined. The PCR products of the Hypervariable Region I of mtDNAs from 80 individuals were examined. 【Result】The least distinguishable ratio of the heteroplasmic DNAs (269 bp fragments) was 5%. 15 cases of heteroplasmic mtDNAs were found by this method in the samples tested. 【Conclusion】The established method of PCR-DHPLC can be used for screening the heteroplasmy of mtDNA.

Key words: denaturing high performance liquid chromatography; mtDNA; heteroplasmy

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(1): 93 ~ 96]

人类线粒体 DNA (mtDNA) 的 16 024-16 365 nt, 73-340 nt 及 438-574 nt 3 个区域为多态性高发区^[1,2]。这 3 个区域的高度多态性使得个体间具有高度的差异性, 因而可以用来作个人识别。理论上同一个体应该只含有一种 mtDNA 序列, 但 20 世纪 80 年代发现一些人体内存在 2 种不同的 mtDNA, 从而提出异质性的问题。mtDNA 的异质性是指同一个体同时存在 2 种或 2 种以上类型的

mtDNA。正常人线粒体 DNA 的异质性高发于控制区, 而在编码区几乎没有^[3,4]。检测 DNA 的异质性可用 RFLP, 变性梯度凝胶电泳 (DGGE), 温度梯度凝胶电泳 (TGGE), 序列特异性寡核苷酸 (SSO) 探针杂交, 单链构象多态性 (SSCP), 测序, 质谱, 等方法^[5]。变性高效液相色谱技术 (denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC) 基于离子对逆向层析法的原理, 利用程序化的温度改变,

收稿日期: 2003-06-18

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (97-128); 中山大学“211 工程”重点学科建设课题基金资助项目 (4209008)

作者简介: 蒋琼橙 (1976-), 女, 河南南阳人, 博士生; 伍新尧, 教授, 博士生导师, 通讯作者, E-mail: xyaow@gzsums.edu.cn

进行异源双链分析,能大量、快速、自动化、高灵敏度地筛选异质性 DNA。该技术尚未在检测人类线粒体异质性方面应用。

1 材料与方 法

1.1 样 本

50 例广州地区汉族无关个体的血液及肌肉组织样本 100 份,取自广州市公安局检案解剖的尸体,年龄、性别不限,生前无遗传性疾病;本实验室保存的 2 例已测序的目的片段相差 1 个碱基的 2 份血痕 B1、B2,10 例已知有异质性的血痕样本及 20 例已知无异质性的血痕样本。将这些样本交给他人编号。

1.2 主要试剂及仪器

三乙胺醋酸盐 (triethylamine acetate, TEAA), 乙腈,变性高效液相色谱仪 (WAVE DNA fragment analysis system, 3500-HT 型,温控精度为 0.1 °C) (以上试剂及仪器均由 Transgenomic 公司提供: Tansgenomic, Omaha, Nebraska, USA)。

1.3 样本 DNA 的抽提

0.1 ~ 0.5 cm² 血痕用 Chelex-100 法抽提,肌肉组织样本用常规酚-氯仿法抽提。

1.4 DNA 的扩增

1.4.1 引物设计 在目的片段选取上,根据先前关于异质性的研究,选取 HVI 区内异质性位点高发的一段,同时这个区域也是 mtDNA 测序的常用区域。根据 Anderson 报道的线粒体 DNA 序列及 WAVEMAKER software,利用 Primer3 软件设计引物,并在引物上添加 40 个碱基的 GC 夹 (cgccccgcgcgccccgcgcgccccgcgcgccccgcgcg) (以 GC 表示),以提高该结构域的解链温度。引物 F16079: 5'-GC caa ccg cta tgt att tcg tac -3', T_m 值:57.2 °C; R16307:5'-tgt act gtt aag ggt ggg tag-3', T_m 值:57.0 °C。目的片段长度 269 bp。

1.4.2 PCR 扩增体系 30 μL 反应体系中含模板 50 ng, Pfu DNA 聚合酶 1.5 U,引物各 10 pmol, Mg²⁺ 1.5 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L。

1.4.3 PCR 循环条件 采用 Touchdown PCR,以提高扩增的特异性。95 °C 变性 2 min,再 95 °C 变性 30 s,67 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 45 s,这 3 步为 1 个循环,以后每次循环退火温度下降 0.5 °C,循

环 15 次后按 95 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 45 s, 循环 19 次, 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。

1.5 DHPLC 分析方法的建立

1.5.1 异质性 DNA 模型的制备 以不同浓度比例混合已测序的仅相差 1 个碱基的 PCR 产物 B1 和 B2,使 B1 的 PCR 产物占总量的 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%。

1.5.2 异源双链的形成 取 5 ~ 10 μL PCR 产物, 95 °C 变性 5 min, 然后以 0.5 °C/min 的速率逐渐降温到 55 °C, 保存 15 min。若 PCR 产物中含异质性 DNA, 则会形成同源及异源双链。

1.5.3 DHPLC 分析 经自动变性高效液相色谱仪的 DNASep 分离柱检测变性-复性的 PCR 产物, 区分不同的双链。先选取 B1: B2 为 1:1 的混合样本在仪器推荐的分离温度上下 1 ~ 2 °C 内选择该片段最优分离温度及洗脱参数, 再在该条件下, 选取这些混合物作为对照, 检测仪器的灵敏度。

1.6 盲 测

将已知有异质性的样本 10 份, 已知无异质性的样本 20 份和 50 个无关个体的 100 份样本交给他人编号, 再按所确立的最佳检测条件来检测。

1.7 测 序

将 DHPLC 检测出来的不同比例的 B1B2 测序, 以比较 DHPLC 与测序的灵敏度。

2 结 果

2.1 最佳条件的选择

2.1.1 软件计算的检测温度 在 59.3 °C 时, 大部分待测片段的 DNA 双螺旋含量在 75% ~ 90%。一般而言, 当 DNA 片段的解链比例达到 10% ~ 25% 时, 异源双链与同源双链较容易被分开 (图 1)。

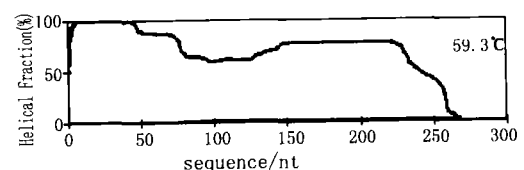


图 1 59.3 °C 时 DNA 双螺旋的百分比

Fig. 1 The helical fraction of the DNA fragment at 59.3 °C

2.1.2 温度梯度测试 从 58 °C 到 62 °C 做一系

列的梯度测试, 得到如图 2 的结果, 故选择 59.3 °C 为检测温度。

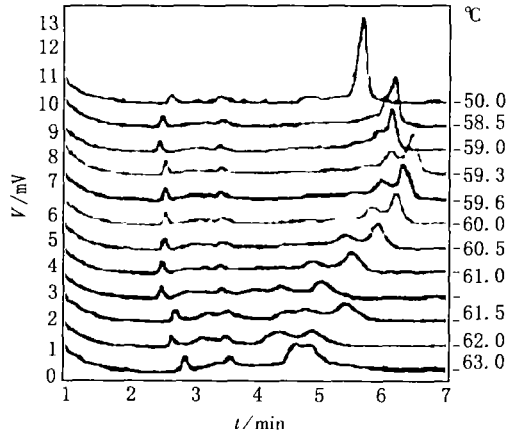


图 2 不同温度下的色谱图

Fig. 2 The chromatograms in different temperatures

2.2 检测不同比例的 B1/B2 异质性模型

在 59.3 °C 下, 从 0% ~ 50% 梯度递增 B1 在 B1 及 B2 的混合物中的含量, 应用 DHPLC 检测 (图 3)。由图 3 可见, 在该实验条件下, 仪器的检测灵敏度为 5%。即含量为 5% 的异源双链即可被检测出来。

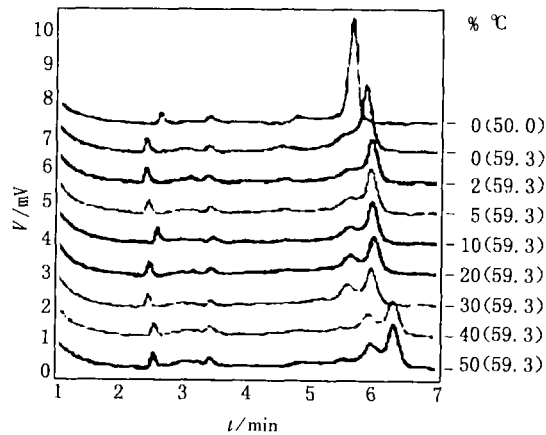


图 3 含不同比例的异质性 DNA 的模型样本的色谱图

Fig. 3 The chromatograms of model samples that contain different ratios of heteroplasmic DNAs

2.3 盲测样本

共检测出 15 份异质性阳性样本, 部分阳性结果见图 4。其中已知的 10 份异质性阳性样本全部为异质性阳性, 在 50 例无关个体的标本中检测出 5 例异质性阳性个体, 这些个体在肌肉及血液中均检出异质性。已知的 20 份无异质性的样本全部为异质性阴性。

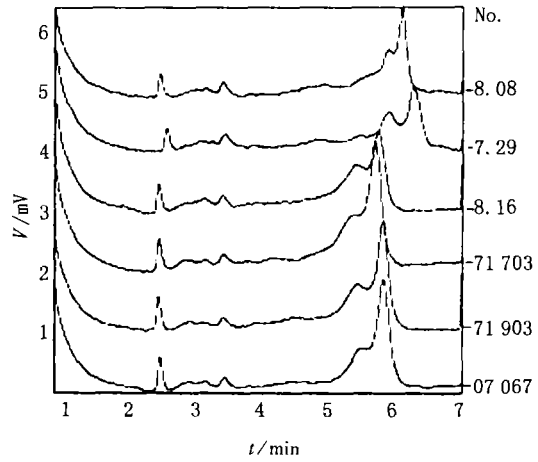


图 4 部分异质性阳性样本的色谱图

Fig. 4 The chromatograms of some heteroplasmic samples

No. represents the numbers of the positive samples

2.4 DHPLC 与测序的灵敏度比较

B1 含量低于 30% 的混合样本不能由测序检测出 B1 序列的存在 (图 5)。

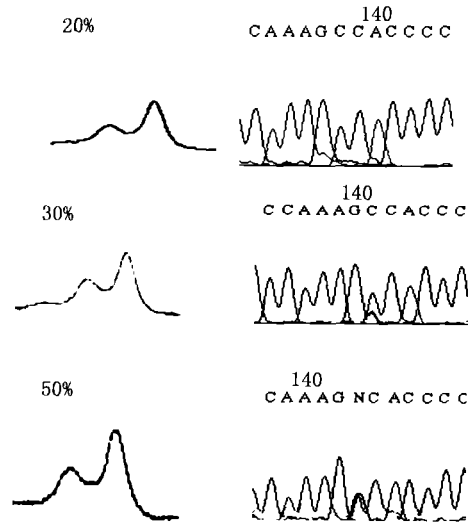


图 5 异质 DNA 含量占 20%, 30%, 50% 的样本的色谱图和测序图

Fig. 5 The chromatograms and the sequences of the samples containing 20%, 30%, 50% heteroplasmic DNAs

3 讨论

由于 mtDNA 异质性的存在, 在法医学上利用 mtDNA 做个人认定、亲子鉴定产生了不确定性。另外, 当比对两份检材的 mtDNA 序列时, 若

DNA 序列相同,则表明这两份检材有可能来自同一个人或来自同一个母系亲属,尤其是它们之间还具有相同的异质性时,这种概率更大。因而,mtDNA 的异质性可作为个体的特殊标记,增加个人认定或排除的确定性^[6]。

若待测样品内含有异质性 mtDNA,在变性和缓慢复性的过程中就会形成 4 种双链:2 种同源双链和 2 种异源双链。若待测样品内不含异质性 mtDNA,则只会形成同源双链而无异源双链。由于异源双链的碱基配对不严格,所以结构较不稳定,解链温度较低,在洗脱液作用下较早从层析柱中流出。根据异源双链与同源双链在层析图谱中的滞留时间不同,可进行异源双链分析。基于相同的原理,该方法同样适用于核酸突变分析。每个样品分析时间为 7 min,若使用加速器,可缩短为 3~3.5 min。

成功分离同源双链和异源双链的关键是分离柱的温度,利用仪器自带的 WAVE Maker 软件可计算分离片段的熔解曲线,从而预测半变性温度。实际操作中,可在该温度的上下 1~2 °C 范围内以 0.2~0.5 °C 为一个梯度,探索最优的分离温度。

根据作者的经验,在利用 DHPLC 进行异质性分析时,应注意检测片段的选取原则:尽可能使目的片段仅含有 1 个熔解区域,这样可以较为容易地选择合适的检测温度,避免高熔解区域的异质点或低熔解区域的异质点无法在某一温度下同时检出。其次,尽量减少 PCR 过程中非特异性产物产生。本试验采用 *Pfu* 酶及 Touchdown PCR 方法扩增,其目的也在于提高扩增的特异性。图 6 示 *Taq* DNA 聚合酶和 *Pfu* DNA 聚合酶扩增产物形成的不同峰型。前者导致的异常峰形会干扰结果分析。

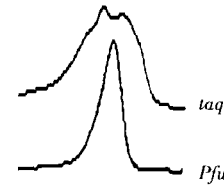


图 6 *Taq* DNA 聚合酶导致的 DHPLC 异常峰与 *Pfu* DNA 聚合酶扩增产生的正常峰

Fig. 6 The abnormal peak resulting from *Taq* Polymerase and the normal peak resulting from *Pfu* polymerase

PCR-DHPLC 方法具有自动化、快速、灵敏、操作简便等特点,其消耗品主要是乙腈和 DNA 分离柱,成本较低,不失于是一种筛查异质性及突变的好方法。然而该方法只能显示异质性 DNA 的存在,不能鉴别出异质点的位置及碱基,而且购买仪器的初期投入较大。

线粒体 DNA 的异质性在人群中的发生频率究竟有多高,个体内不同组织的异质性发生情况目前还未明了,有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Anderson S, Bankier A T, Barrel B C, *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome[J]. *Nature*, 1981, 290(5806):457-65.
- [2] Lutz S, Wittig H, Weisser H J, *et al.* Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions [J]? *Forens Sci Int*, 2000, 113(1-3): 97-101.
- [3] Gill P, Ivanov P L, Klimton C, *et al.* Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis[J]. *Nature Genet*, 1994, 6(2): 130-5.
- [4] Bendall K E, Macaulay V A, Sykes B C. Variable levels of a heteroplasmic point mutation in individual hair roots [J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 61(6):1303-8.
- [5] 蒋琼橙, 伍新尧. 人类线粒体 DNA 异质性及其与法医学的关系[J]. *中国法医学杂志*, 2002, 17(1): 54-6.
- [6] Elke H F, Muller-koch Y, Friedl W, *et al.* DHPLC mutation analysis of the hereditary nonpolyposis colon cancer(HNPCC) genes hMLH1 and Hmsh2[J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2001 (47):21-32.

(编辑 黄小延)