

·技术交流·

## 等位基因测序的简便快速方法

庾 蕾, 伍新尧

(中山医科大学法医系, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探索一种简便快速的等位基因测序方法。【方法】用银染方法对待检个体的血样本进行简短串联重复(short tandem repeat, STR)基因分型, 将需测序的等位基因条带从凝胶图上切下, PCR 扩增, 产物经纯化作为测序模板。采用循环测序法测序。【结果】对 D12S391、D11S554 STR 基因座的等位基因 Ladder 及 STR 基因座(FGA、D12S391、D11S554)等位基因发生突变的 19 个家系的等位基因进行了测序。STR 分型表现为杂合子或纯合子的等位基因用此方法测序都得到了清晰的信号。【结论】此方法不仅给等位基因测序提供了一种有效手段, 而且对于只要能利用电泳分离的混合的 DNA 片段, 就能用此方法将各 DNA 片段分别测序。

**关键词:** 等位基因; 序列分析; 串联重复序列

中图分类号: R34 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)06-0479-02

## One Simple and Rapid Method for Allele Sequencing

YU Lei, WU Xin-yao

(Department of Forensic Medicine, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To develop a simple and rapid method for allele sequencing. 【Methods】 The blood samples of individuals were genotyped by silver staining on short tandem repeats(STR). Alleles to be sequenced were excised from gels, reamplified by PCR, and purified. Sequencing was performed by cycle sequencing method. 【Results】 Good signals had been obtained, no matter the alleles showed homozygotes or heterozygotes on STR genotyping. 【Conclusion】 This method provides a good tool for allele sequencing and so long as the mixed DNA fragments can be separated by electrophoresis, the DNA fragments could be sequenced respectively by this method.

**Key words:** alleles; sequence analysis; tandem repeat sequences

目前, 用于法医学个体识别和亲子鉴定的遗传标志主要是简短串联重复(short tandem repeats, STR)。为确保 STR 基因分型的正确, 需对等位基因 Ladder 进行测序。在研究 STR 突变时 also 需对等位基因进行测序。由于一个个体每一 STR 基因座位有一对等位基因, 如果是杂合子就会得到嘈杂信号。作者在前述研究中摸索出一种简便、快速的等位基因测序方法, 现报道如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 待检个体的 STR 基因分型

取待检个体的静脉抗凝血, 用 Chelex100 快速抽提, 进行相应 STR 位点 PCR 扩增<sup>[1]</sup>, PCR 产物用 60 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染显示电泳谱带。以本室自制的等位基因分型标准物作为标准对照, 确定样本的基因型<sup>[2]</sup>, 以 STR 基

收稿日期: 2001-01-10

基金项目: 中山医科大学“211”工程科研基金资助项目(98022)

作者简介: 庾 蕾(1964—), 女, 安徽马鞍山人, 博士生, 讲师

因座的核心序列重复次数命名等位基因。

### 1.2 测序等位基因模板准备

将需测序的等位基因条带从凝胶上切下, PCR 扩增, 扩增条件同前, 产物经乙醇沉淀法纯化后作为测序模板。

### 1.3 测序

采用荧光标记 ddNTPs 的循环测序法 (ABI prism BigDye<sup>TM</sup> terminator cycle sequencing ready reaction kits, PE) 测序, 电泳、荧光信号收集及结果分析在 PE 公司 377 DNA 测序仪上进行。

## 2 结果

作者采用此方法对 D12S391、D11S554 STR 基因座的等位基因 Ladder (分别为 17 例和 20 例) 及 STR 基因座 (FGA、D12S391、D11S554) 等位基因发生突变的 19 个家系的等位基因进行了序列分析。STR 分型表现为杂合子的样本, 分别将两条等位基因条带切割、PCR 扩增、测序, 均得到了清晰的信号 (图 1)。STR 分型表现为纯合子的样本 (5 例), 切割的条带含有一对等位基因, 测序结果也得到了清晰的信号 (图 2)。通过正向及反向序列分析, 准确确定了所检测等位基因的碱基序列, 表 1 列出了 19 个突变家系 STR 基因分型及等位基因核心序列。

## 3 讨论

DNA 测序是分子生物学中最常用的技术之一。以往手工测序首先要制备单链 DNA 模板、同位素标记, 然后分 4 个反应管进行延伸反应<sup>[3]</sup>。操作复杂, 结果需人工判读。本实验所采用的循环测序法对 PCR 产物测序的原理是 Sanger 双脱氧链终止法, 4 种不同的荧光分别标记 4 种不同的 ddNTP, 在测序反应中加入用于 PCR 扩增的一对引物之一, 进行循环扩增。操作简单、安全且精确、快速。STR 分型表现为杂合子的个体, 如果不将两

个等位基因分离, 在测序反应时, 存在两个 DNA 模板而得到嘈杂信号。目前, 一般多采用低熔点琼脂糖凝胶电泳分离、回收 DNA 片段<sup>[4]</sup>, 但操作烦琐, 一次回收量有限。法医检案进行 STR 基因分型常用银染法, 直接从凝胶图上切下等位基因条带, 再进行 PCR 扩增, 操作简单、快速, 一次操作便可获得足够量的 DNA 模板, 产物经乙醇沉淀法纯化后测序, 图谱清晰, 本底极低。具体操作时应注意以下几点: ①作为测序模板的 PCR 产物, 琼脂糖凝胶电泳应显示一条带; ②PCR 产物应达一定浓度, 一般 2~3 μL 含 10~100 ng; ③PCR 产物需经纯化去除引物及 dNTP, 尤其是引物, 否则也会出现嘈杂信号。④有条件应对等位基因进行正、反测序, 以确保所测碱基序列的正确性。作者对 STR 基因分型表现为纯合子的样本, 采用该法也得到了清晰的信号, 说明所测的表现纯合子的一对等位基具有相同的碱基序列。此方法不仅给等位基因测序提供了一种有效手段, 而且对于混合的 DNA 片段, 只要能利用电泳分离, 就能用此方法将各 DNA 片段分别测序。但此方法对于混合的序列组成不同而碱基数相同的 DNA 片段就无法测序。

(本文图 1, 图 2 见插页 1, 表 1 见第 X 页)

### 参考文献:

- [1] 庾 蕾, 伍新尧, 李建金, 等. 短串联重复序列遗传突变的观察. 见: 中国法医学学会编. 中国法医学最新科研与实践: 全国第 6 次法医学学术交流会议论文精选[C]. 北京: 中国人民公安大学出版社, 2000. 161~162.
- [2] 孙宏玉, 郭景元. STR 基因座等位基因阶梯制备方法尝试[J]. 中国法医学杂志, 2000, 15 增刊: 33.
- [3] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 329~331.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆[M]. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1995. 318~325.

(编辑 黄小延)

### ·简讯·

## 《临床神经解剖学》出版

神经解剖学与临床的联系之紧密已为大家所公认。但脑的复杂性以及有关神经解剖学知识的纷繁与复杂, 往往令临床工作者和医学生愁眉和遗憾。为应临床之要求, 由中山医科大学姚志彬教授主编, 并由广州世界图书出版公司出版了《临床神经解剖学》一书, 可供临床、教学和科研工作的参考。全书约 64 万字, 彩图 300 余幅, 精装全铜版纸印刷, 定价 200.0 元; 欲购可汇款至广州市中山二路 74 号中山医科大学解剖教研室谢瑶老师。邮编: 510089, 电话: 020-87330658。

(学 讯)

表 1 19 个突变家系 STR 基因分型及等位基因核心序列 (正文见第 479 页)

Table 1 Genotyping and core sequence of 19 parent-child pairs with mutations on STR (Text in page 479)

Locus	Pedigree	Genotype <sup>1)</sup>	Sequenced allele	Core sequence
FGA	1	Fa(24) <sup>2)</sup> Mo(23)	Fa(24)	(TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)16CTCC(TTCC)2
		Chi(23/25)	Mo(23) Chi(23) Chi(25)	(TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)15CTCC(TTCC)2 (TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)15CTCC(TTCC)2 (TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)17CTCC(TTCC)2
	2	Fa(24/25) Mo(23)	Fa(25)	(TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)17CTCC(TTCC)2
		Chi(23/26)	Chi(26)	(TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)18CTCC(TTCC)2
	3	Fa(19/25) Mo(24/25)	Fa(19)	(TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)11CTCC(TTCC)2
			Fa(25)	(TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)17CTCC(TTCC)2
Chi(18/25)		Mo(24)	(TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)16CTCC(TTCC)2	
		Mo(25) Chi(18) Chi(25)	(TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)17CTCC(TTCC)2 (TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)10CTCC(TTCC)2 (TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)17CTCC(TTCC)2	
4	Fa(21/25) Mo(17/25)	Fa(21)	(TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)13CTCC(TTCC)2	
		Fa(25)	(TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)17CTCC(TTCC)2	
5	Fa(20/24) Mo(21/24)	Chi(24)	(TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)16CTCC(TTCC)2	
		Chi(25)	(TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)17CTCC(TTCC)2	
6	Fa(20/24) Mo(21/24)	Mo(21)	(TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)13CTCC(TTCC)2	
		Mo(24) Chi(22)	(TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)16CTCC(TTCC)2 (TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)14CTCC(TTCC)2	
6	Fa(21/23) Mo(21/23)	Mo(21)	(TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)13CTCC(TTCC)2	
		Mo(23) Chi(22) Chi(23)	(TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)15CTCC(TTCC)2 (TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)14CTCC(TTCC)2 (TTTC)3TTTCTTCT(CTTT)15CTCC(TTCC)2	
D12S391	1	Fa(21) Mo(20/22)	Mo(20)	(AGAT)13(AGAC)6AGAT
		Chi(19/21)	Chi(19)	(AGAT)12(AGAC)6AGAT
	2	Fa(18/20) Mo(17/19)	Fa(18)	(AGAT)11(AGAC)6AGAT
			子(17)	Chi(17)
	3	Fa(19/25) Mo(19)	Fa(25)	(AGAT)16(AGAC)8AGAT
			Chi(19/23)	Chi(23)
4	Fa(16/18) Mo(18/19)	Fa(16)	(AGAT)9(AGAC)6AGAT	
		Fa(18)	(AGAT)11(AGAC)6AGAT	
5	Fa(20/21) Mo(18)	Chi(17/20)	Chi(17)	(AGAT)10(AGAC)6AGAT
		Chi(17/19)	Chi(17)	(AGAT)10(AGAC)6AGAT
6	Fa(18/23) Mo(18)	Fa(23)	(AGAT)13(AGAC)10	
		Chi(18/24)	Chi(24)	(AGAT)14(AGAC)10
D11S534	1	Fa(229/237) <sup>3)</sup> Mo(233/241)	Fa(229)	AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)16
			Fa(237)	AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)18
	Chi(233/241)	Chi(233)	AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)17	
		Chi(241)	AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)14(AAGG)(AAAG)4	
	2	Fa(219/233) Mo(219/229)	Fa(219)	AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)13AA
			Fa(223)	AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)17
	Chi(223/229)	Chi(223)	AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)14AA	
		Chi(225/237)	Chi(225)	(AAAG)14AAAA
3	Fa(204/229) Mo(212/237)	Fa(204)	(AAAG)17(AAAG)(AAAG)2AAAA	
		Fa(229)	(AAAG)16AAAA	
Chi(225/237)	Mo(212)	AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)18		
	Mo(237) Chi(225) Chi(237)	(AAAG)16(AAAG)(AAAG)2AAAA AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)18		
4	Fa(212/233) Mo(196/241)	Fa(212)	(AAAG)16AAAA	
		Fa(233)	AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)17	
Chi(237/241)	Mo(196)	(AAAG)12AAAA		
	Mo(241) Chi(237) Chi(241)	AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)14(AAGG)(AAAG)4 AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)18 AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)14(AAGG)(AAAG)4		
5	Fa(234) Mo(229/238)	Fa(234)	AAAGG(AAAG)4(AAAGG)3(AAAG)16	
		Chi(229/238)	Chi(229) Chi(238)	AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)16 AAAGG(AAAG)4(AAAGG)3(AAAG)17
6	Fa(193/229) Mo(225/229)	Fa(229)	AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)16	
		Mo(229)	AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)16	
7	Fa(201/237) Mo(229)	Chi(229/233)	AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)17	
		Chi(229/233)	Chi(233)	AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)18 AAAGG(AAAG)4(AAAGG)2(AAAG)17

1) Fa: father; Mo: mother; Chi: child. 2) Numbers in parenthesis represent the name of alleles, and numbers in boldface indicate mutational alleles. 3) Because of the complex structure, the alleles were named by the length of fragments.

## 中国人粘多糖贮积症 I 型 IDUA 基因突变的检测 (正文见第 439 页)

Mutations Analysis of IDUA Gene in Chinese Mucopolysacchridosis Type I Patients (Text in page 439)

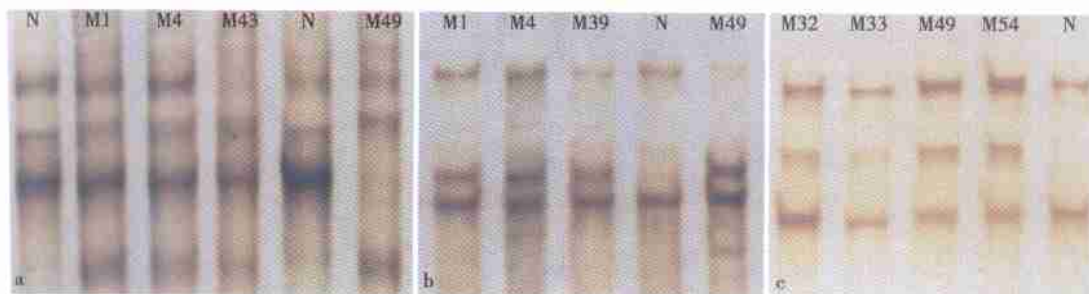


图 2 外显子 6、8、9 SSCP 的检测

Fig. 2 SSCP analysis of exons 6, 8 and 9

M: the number of abnormal patients; N: the normal control

a: exon 6→; b: exon 8→; c: exon 9→

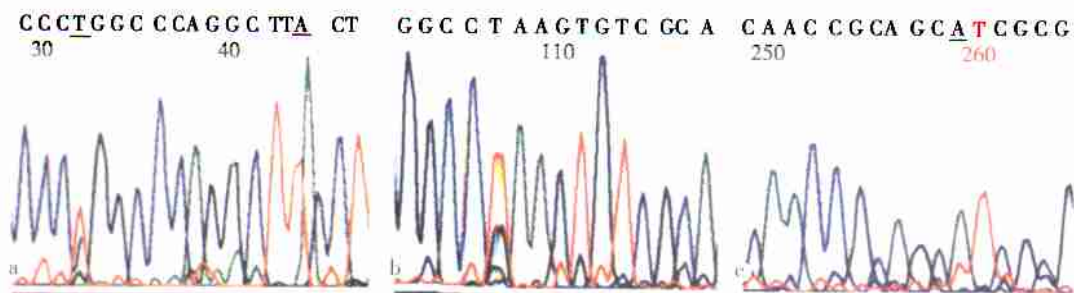


图 3 外显子 6、8、9 SSCP 异常者测序

Fig. 3 The sequences of abnormal specimen in exons 6, 8 and 9 of IDUA gene

a: shows two base substitutions in exon 6, base 32(C→T) and base 44 (C→A); b: shows a substitution at base 114 (G→A) in exon 8; c: shows a substitution at base 104(G→T) in exon 9; d: shows a substitution at base 259(G→A) in exon 9

## 等位基因测序的简便快速方法 (正文见第 479 页)

One Simple and Rapid Method for Allele Sequencing (Text in page 479)

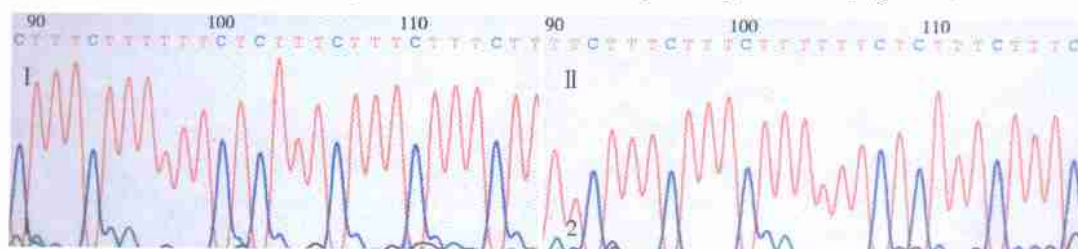


图 1 FGA 位点基因型为杂合子(19/25)的等位基因(19)测序部分结果

图 2 FGA 位点基因型为纯合子(23/23)的等位基因(23)测序部分结果

Fig. 1 The partial sequencing result of allele (19) showing heterozygote (19/25) on FGA locus

Fig. 2 The partial sequencing result of allele (23) showing homozygote (23/23) on FGA locus