

·技术交流·

随机引物 PCR 检测人 DNA 指纹条件的优化

童大跃¹, 徐平¹, 区敬华², 郭语彬¹, 李芳¹, 林达¹, 伍新尧²

(中山大学 1. 生物化学教研室, 2. 法医学系, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】探讨随机引物 PCR 检测人 DNA 指纹技术的最优化条件。【方法】应用随机引物 PCR 技术, 用一对经筛选的短引物, 对扩增人 DNA 指纹的条件进行了优化。【结果】实验结果显示: DNA 模板应新鲜, 质量浓度在 50~550 mg/L 均有扩增产物。dNTP 的浓度 0.2 mmol/L 最宜。Mg²⁺ 浓度 5.0 mmol/L 效果最佳。循环参数以两个三步 PCR 变性温度分别用 94℃、90℃, 时间各为 30 s 退火温度用 43℃、48℃, 时间分别为 40 s、50 s 延伸温度用 72℃, 时间分别为 1 min、1 min 20 s。【结论】按照优化的实验条件, 得出的 DNA 指纹图重复性好, 个体特异性高, 为 APHDF 的推广提供了实验基础。

关键词: AP-PCR; DNA 指纹法

中图分类号: Q-33 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)03-0231-04

Study on Optimal Conditions in Arbitrarily Primed PCR Human DNA Fingerprinting

TONG Da-yue¹, XU Ping¹, OU Jing-hua², GUO Yu-bin¹, LI Fang¹, LIN Da¹, WU Xin-yao²

(1. Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, 2. Faculty of Forensic Medicine
Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】To explore the optimal conditions in fingerprinting (APHDF). 【Methods】The human DNA fingerprints were detected by APHDF. A pair of short primers was used for amplification. The experimental conditions including template, Mg²⁺, deoxyribonucleotides, and parameters of cycle, were optimized. 【Results】The template DNA should be abstracted freshly and the concentration should be ranged from 50~550 mg/L. The best concentration of Mg²⁺ was 5.0 mmol/L. The deoxyribonucleotides concentration was optimal at 0.2 mmol/L. The PCR cycling parameters were as follows: The denaturing temperatures, annealing temperatures and extension temperatures were 94℃ and 90℃ for 30 s, 43℃ and 48℃ for 40 s or 50 s, and 72℃ for 1 min or 80 s, respectively. 【Conclusion】The optimal conditions of the experiment are obtained, with good reproducibility and high specificity. Therefore, this method can be widely applied in practice.

Key words: AP-PCR; DNA fingerprinting

自 1990 年 Welsh^[1] 发明 AP-PCR (arbitrarily primed-PCR) 技术以来, 随机引物 PCR 技术发展十分迅速, 应用范围不断扩大。目前已经有利用随机引物 DNA 指纹图进行群体遗传学研究, 如对细菌、真菌、寄生虫、昆虫、植物、灵长类的研究, 可以作为

种内、种间的个体鉴定, 分类, 种系发生学的研究^[2~6]。然而, 这一技术应用在人类只是近几年, 如肿瘤相关基因的分析^[7,8]。由于本方法技术要求高, 条件严格, 导致重复性较差, 其巨大的应用潜能未能得到充分开发及应用。本实验对随机引物

收稿日期: 2000-10-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39370755); 广东省重点科技攻关项目(1997); 广州市科委资助项目(JB02-97-Z-44-02)

作者简介: 童大跃(1961-), 男, 湖北新洲人, 硕士, 讲师。

PCR 检测人 DNA 指纹(arbitrarily primed PCR human DNA fingerprinting, APHDF)这一技术重复性和稳定性条件进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

寡核苷酸引物是由本课题组自行设计,共 10 对,经筛选出一对较好的引物进行 AP-PCR,本技术已申请专利^[9],由加拿大 Genda 公司合成,其中 G+C 含量占 60%以上^[10]。DNA 样品的提取用酚-氯仿方法,标本是新鲜血液、血凝块和血痕(由中山医科大学附属第一医院血库、广州市肿瘤医院提供)。PCR 仪为 Biometra UNO-II (德国)产。

1.2 反应条件及循环参数

dNTP 浓度 0.2 mmol/L, KCl 50 mmol/L, 引物 0.32 μ mol/L, Mg^{2+} 4.0 mmol/L。首先, 94 $^{\circ}C$, 3~5 min, 接着两个三步 PCR: 94 $^{\circ}C$, 30 s, 40 $^{\circ}C$, 50 s, 68 $^{\circ}C$, 1 min, 10 个循环。再 90 $^{\circ}C$, 30 s, 48 $^{\circ}C$, 40 s, 72 $^{\circ}C$, 70 s, 30 个循环。

1.3 其他

在研究某一因素对 AP-PCR 的影响时,只改变被研究因素,其他因素固定不变。模板质量浓度选定 50~550 mg/L 进行实验,模板保存期用新鲜提取的和保存半年以上的进行对比实验。dNTP 从 0.1~0.4 mmol/L, Mg^{2+} 从 1.0~6.0 mmol/L 作实验。选定不同的变性、退火、延伸温度及时间,循环次数,酶的用量等进行实验。

2 结果

2.1 模板的优化

2.1.1 模板质量浓度 模板经过紫外分光光度法定性、定量,再将其稀释成 50、150、250、350、450、550 mg/L 6 个不同的质量浓度,分别扩增。在此浓度范围内,模板均有扩增产物,而在 350 mg/L 时的产物量较多。

2.1.2 模板的保存期 我们将不同保存期(1 周左右、1 个月左右、3 个月左右、大于 6 个月)的模板进行同时扩增。结果是模板越新鲜扩增效果越好,1 周和 1 个月模板扩增产物多,经琼脂糖电泳,EB 染色条带明亮清晰。本技术所用模板的放置时间最好不要超过 1 个月。

2.2 Mg^{2+} 浓度及 KCl 浓度

在 PCR 过程中, Mg^{2+} 浓度对 Taq DNA 聚合酶活性影响很大,本实验对 Mg^{2+} 浓度进行了优化。 Mg^{2+} 浓度分别为 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mmol/L,在这几个浓度下均有扩增产物,扩增结果见图 1。由聚丙烯酰胺凝胶电泳结果看,扩增产量效果最佳的 Mg^{2+} 浓度为 5.0 mmol/L,扩增条带在小分子量处(图 1 箭头处)比 Mg^{2+} 浓度为 4.0 mmol/L 时多,与 Benter^[11] 所报道的不一致,所需 Mg^{2+} 浓度较高^[11]。对这一现象经分析,我们再用双蒸水溶解的模板与用 TE 溶解的模板进行对照实验,结果显示用双蒸水溶解的模板在 Mg^{2+} 浓度为 4.0 mmol/L,扩增效果与用 TE 溶解的模板在 Mg^{2+} 浓度为 5.0 mmol/L 相同,这也许是因为 EDTA 络合部分 Mg^{2+} 引起的。KCl 浓度的实验结果是最佳浓度为 50 mmol/L。

2.3 dNTP 浓度

本实验分别用 0.1、0.2、0.3、0.4 mmol/L 4 个不同浓度的 dNTP 进行扩增,结果只是 0.1、0.2 mmol/L 两个 dNTP 浓度有扩增产物,且浓度为 0.2 mmol/L 时扩增效果最佳,0.3、0.4 mmol/L 两个 dNTP 浓度几乎没有扩增产物。

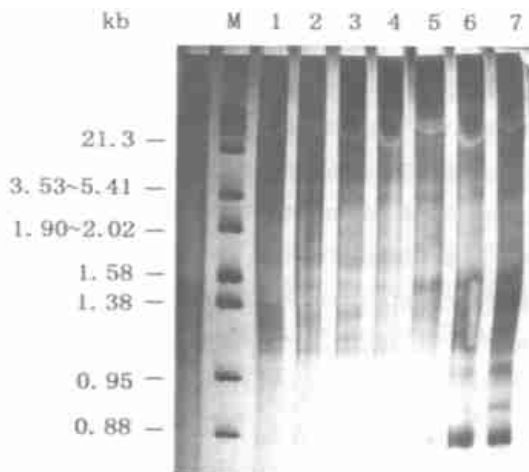


图 1 不同 Mg^{2+} 浓度的扩增效果

Fig 1 The amplified results with different Mg^{2+} concentration

Lanes 1~7 corresponded to 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mmol/L respectively (PAGE)

2.4 引物

实验所用 10 对引物是由加拿大 Genda 公司合成。从中筛选出扩增效果最好的一对作 APHDF 图。为了证实该对引物确实是扩增效果最佳的,本次实验又随机地从 10 对引物中选取 1 对引物序列,由上海生工公司合成,进行了对比实验。即将

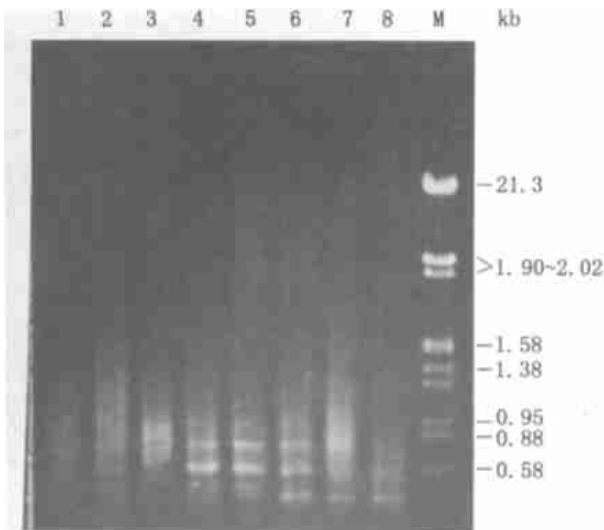


图2 不同退火温度及时间的扩增效果

Fig. 2 The amplification results with varied annealing temperature and time

Lanes 1, 3, 5, 7, correspond to annealing temperature 37 °C, 43 °C, 48 °C, 55 °C and time 40 s; Lanes 2, 4, 6, 8 corresponded to annealing temperature 37 °C, 43 °C, 48 °C, 55 °C and time 70 s (AGE)

新旧引物同时用同一模板进行扩增。结果是经筛选出的一对引物单独(P1、P2)扩增均有产物,且多态性高,而新合成的对比引物用同样条件扩增,没有产物,说明的确是经过筛选的一对引物效果较好。

2.5 热循环参数

2.5.1 变性温度及时间 本实验选用 96 °C、94 °C、92 °C、90 °C 4 个温度,每个温度分别用 30 s、50 s 进行扩增,经琼脂糖电泳染色,差别不是十分明显。考虑到节约时间和有利酶活性的原则,在作 APHDF 时,我们选用了 94 °C、90 °C 两个温度及 30 s 的时间。

2.5.2 延伸温度及时间 我们在参考文献[5~7]后,选出了 68 °C、70 °C、72 °C 3 个温度和每一个温度下的 3 个时间 60 s、90 s、120 s 进行扩增,结果差别都不明显。在确定最佳温度及时间时,我们根据有关文献报道选择了 68 °C、60 s 和 72 °C、70 s 为延伸温度及时间。

2.5.3 退火温度及时间 选用了 37 °C、43 °C、48 °C、55 °C 4 个温度及每一个温度下的 2 个时间 40 s、70 s 进行扩增,结果显示 43 °C 和 48 °C、时间 40 s 扩增的结果条带清晰,产物产量多,故在作 APHDF 时,我们选用了 43 °C、48 °C 和 40 s、50 s。

2.5.4 循环次数 分别用 20、30、40、50 4 个不同的循环次数进行实验,发现 30~50 个循环的结果

差别不明显,考虑到时间和效果两因素,我们最终选用 40 个循环。

2.5.5 升降温速度 同一实验条件下,用 Biometra 和黑马公司的 PCR 仪同时扩增,结果是黑马仪扩增条带更多。比较发现黑马仪升降温速度慢些,我们调整 Biometra 仪的升降温速度,由 4 °C/s 改为 1 °C/s,结果十分理想。我们还进行梯度 PCR 比较,分别对退火温度及时间用梯度实验,温度从 38 °C 起,每一循环升温 0.2 °C (dT 0.2 °C/cycle),时间从 50 s 开始,每一循环减少时间 0.1 s (dT 0.1 s/cycle)。其扩增效果不比优化条件的效果好。

2.6 Taq DNA 聚合酶的种类和用量

用 2、4、6、8、10 U 几个不同浓度的酶进行扩增,多次结果是 4 U 以上的酶量扩增结果均较多,且相互间差别不明显。用普通的 Taq 酶和高保真 DNA Taq 酶 (Vent DNA polymerase NET) 进行比较,发现 APHDF 用高保真酶的效果不如普通 Taq 酶。实验分别用宝灵曼、基因公司、真达公司等厂家生产的酶进行比较,考虑到既有理想的扩增结果又比较节约试剂的原则,实验中选用基因公司生产的酶,4 U 作为 APHDF 的常规用量。

2.7 APHDF 的制作

用以上筛选出的最佳条件进行 AP-PCR,所制作的 APHDF 结果见图 3。无关个体扩增结果的特异性强。

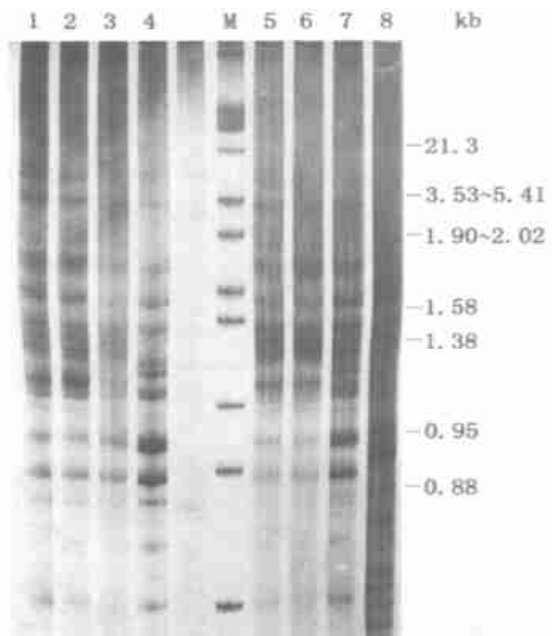


图3 无关个体 APHDF 图

Fig. 3 Photograph of APHDF of unrelated individuals

Lanes 1~8 correspond to 8 different individuals; M: DNA marker

3 讨论

APHDF 技术简便、快速、经济,容易学习掌握,故易于推广,经济价值可观。由于随机引物具有随机性,因此方法的重复性相对较差。本实验优化的这些条件,对克服这一弊端十分重要,批内及批间重复性实验结果十分好。实验所用模板均为酚-氯仿提取,未用其他方法提取的模板进行比较。模板浓度范围要求不严,50~550 mg/L 均有扩增产物。模板的放置时间不宜过久,1 个月以内为佳,新鲜模板与放置过久的模板扩增结果不同,放置越久的扩增后多态性越差。dNTP 的浓度在 0.2 mmol/L 最好,浓度过高无扩增产物,过低扩增效果差。Mg²⁺ 浓度从 0.5~6.0 mmol/L 均有扩增产物,但条带清楚、产物量多的是在其浓度为 5 mmol/L,与 Benter.T 所报道 4 mmol/L 稍有不同。热循环参数应严格,随条件的改变产物条带会改变。本实验所用条件是经过相当多的实验,选定了从变性、退火、延伸温度、时间及循环次数进行优化。当然,此优化条件不一定是真正的最优,不排除会有更佳方案。每一个实验室在应用本技术时有必要根据自己实验室的情况可结合本方案进行摸索,确定自己实验室的可重复条件。此外操作人员素质也十分重要。我室正将此技术应用于个体认定和肿瘤相关基因的研究。相信今后这一技术将会得到广泛的应用。

参考文献:

[1] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes PCR with arbitrary Primers [J]. Nucleic Acids Res. 1990, 18

(24): 7213.

- [2] Jeffreys A J, Morton D B. DNA fingerprints of dogs and cats [J]. Anim Genet, 1987, 18(1): 1.
- [3] Bhallacharyya R, Singh R, Hazra T K. Application of polymerase chain reaction with specific and arbitrary primers to identification of Leshmania parasites [J]. FEMS Microbiol Lett, 1993, 114(1): 99.
- [4] Wilk M, Tabaqchalis. Typing of clostridium difficile by polymerase chain reaction with an arbitrary primer [J]. J Hosp Infect, 1994, 28(3): 231.
- [5] Bassam B J, Bentley S. DNA fingerprinting using arbitrary primer technology (APT): a tool or a torment [J]. Australas Biotech, 1994, 4(4): 232.
- [6] Welsh J, McClelland M. Genomic fingerprinting using arbitrarily primer PCR and matrix of pairwise combinations of primers [J]. Nucleic Acids Res. 1991, 19(19): 5275.
- [7] Peinado M A, Malkhosyan S, Velazquez A, et al. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal by arbitrarily primed polymerase chain reaction [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(17): 10065.
- [8] Kawakami K, Yasuda J, Shiraishi M, et al. Detection of DNA Abnormalities by Arbitrarily Primed PCR Fingerprinting: allelic losses in chromosome 10q lung cancers [J]. Biochem Bioph Res Comm, 1998, 251(3): 153.
- [9] 伍新尧. 随机引物聚合酶链反应脱氧核糖核酸指纹检测法 [P]. 中国专利: 96119068. X, 1997.
- [10] 杨建厂, 伍新尧, 罗超权. 人类 DNA 指纹的检测及初步应用 [J]. 生物化学杂志, 1997, 10(专刊): 141.
- [11] Benter T, Papadopoulos S, Pape M, et al. Optimization and Reproducibility of Amplified Polymorphic DNA in Human [J]. Anal Biochem, 1995, 230(2): 92.

(编辑 张敏瑞)

本刊被广东省人事厅列为国家级期刊

根据广东省人事厅“粤人职[1999]23号文”《关于印发广东省卫生技术人员高中级专业技术资格条件的通知》,本刊与《北京医科大学学报》、《上海医科大学学报》及《华西医科大学学报》4家高校学报、中华医学系列及卫生部主办的实用医学系列为国家级期刊,自2000年1月1日起贯彻执行,特此告知广大读者和作者。