

· 简 报 ·

用一对错配引物进行的 PCR/酶解法检测 β -地中海贫血-28(A→G) 突变

李洪义 曾瑞萍 杜传书

(医学遗传学教研室)

关键词 点突变; 错配引物PCR; 基因诊断; β -地中海贫血**中图分类号** Q33; R394

1989年 Haliassos 等首先报道用误配碱基引物 PCR 检测点突变。其基本原理是, 一个引物 3' 末端紧邻突变点, 3' 末端或近 3' 末端引入一个错配碱基, 介导突变产物在此产生某内切酶酶切序列, 而正常模板的 PCR 产物无该酶切序列; 另一引物不含错配碱基。问题是当内切酶用量太少或失活时, 突变模板 PCR 产物不能彻底酶解或完全不被酶解, 易造成判断错误。为避免上述情况, 保证检测结果准确可靠, 作者研究设计了用一对错配引物检测点突变方案, 并

成功地用于 β -地贫-28(A→G) 突变的基因诊断。现简报如下。

材料和方法

1. DNA 标本 已知正常和-28突变杂合子系以前 PCR/ASO 点杂交证实的标本。产前诊断为有一重型 β -地贫患儿生育史, 现怀孕要求产前诊断的夫妇。胎儿羊水和双亲外周血按本室常规方法抽提 DNA。

2. 引物设计 一对错配引物序列见附表, 扩增包含-28在内的 97 bp β 珠蛋白基因片段。引物 28 A 3' 末

附表 引物序列与定位

引物	序 列(5'→3')								定 位
28A	GGC	AGG	AGC	CAG	GGC	TGG	GCT	T*	-51~-30
28B	TCT	GTC*	TGA	GGT	TGC	TAG	TGA	AGC	+23~+46

* T 和 C 示错配碱基

端邻近-28 突变点, 第 2 位碱基错配(T:T), 介导突变 PCR 产物在此产生 *Dde* I 酶切序列, 而正常产物不产生该酶切点。28 B 5' 端第 6 位有一错配碱基(C:A)介导产生 *Dde* I 切点(图1)。待测标本 PCR 产物经该酶酶解和电泳, 即获诊断结果。

3. PCR 反应、内切酶消化和电泳 PCR 循环过程: 92℃变性 30 sec, 62℃复性和延伸 1 min, 共 30 个循环。产物不需抽提直接用于 *Dde* I 酶解。酶解前和酶解后的产物直接进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

4. 异源双链分析和 PCR/ASO 点杂交 分别按作者以前方法和有关文献进行。

结 果

引物 28 A 和 28 B 在所用反应条件下扩增特异性很好。用已知正常和-28 杂合子进行的实验结果与预期

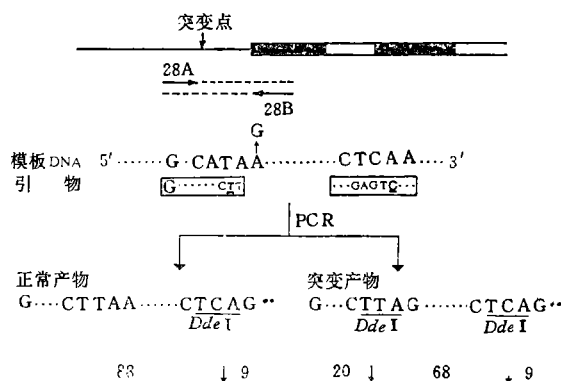


图1 一对错配引物 PCR/酶解法原理 说明见正文
完全相同(图2)。说明本设计方案成功, 技术方法可行。用此方法结合 PCR/异源双链分析法进行的 1 例
(下转封4)



E 44110 A

(上接封2)

产前基因诊断结果为: 母亲是841-42杂合子, 父亲是-28杂合子, 胎儿-28杂合子(结果未显示)。此结果后经 PCR /ASO 同位素标记点杂交证实(图3)。

M 1 2 3 4 bp

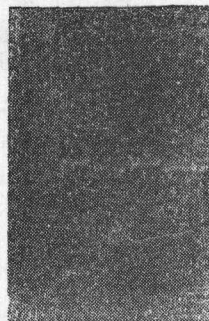


图2 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳

1. -28杂合子, 酶解前; 2. -28杂合子, 酶解后有88bp和68bp两条带; 3. 正常者, 酶解前; 4. 正常者, 酶解后仅有88bp一条带; M. 为 PBR322/Hae III Maker

讨论

本文建立的点突变检测方法, 不需分子杂交, PCR产物不必抽提可直接用于酶解, 因而简单快速。最大特点是在另一引物内也引入错配碱基, 介导产生特定酶切点(可谓“引物自身内对照”), 酶解电泳后观察扩增产物在此是否完全酶解即能反映整个酶解反应

-28 Probc
M N

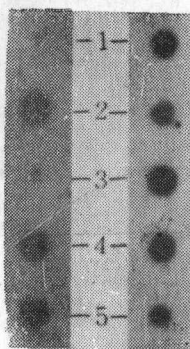


图3 PCR/ASO 点杂交结果

1. 正常对照; 2. -28杂合子对照; 3. 母亲; 4. 父亲; 5. 胎儿

的成功与否, 因而它能避免以前方法当酶切不完全时可能产生的诊断失误, 即将突变纯合子误为杂合子或将纯合子、杂合子误为无待测突变。例如酶解后电泳仍有97 bp 带或存在88 bp 和68 bp 以外其它带, 均提示酶解不彻底, 需寻找原因重新酶解和电泳。本方法的原理同样适用于其它已明突变性质的点突变和点突变遗传病分析、诊断。

(1993-06-24收稿 1993-07-10修回)

中山医科大学学报
(ZHONGSHAN YIKE DAXUE XUEBAO)

ACADEMIC JOURNAL OF SUN YAT-SEN UNIVERSITY
OF MEDICAL SCIENCES (Acad J SUMS)

季刊
1980年2月创刊
1993年12月第14卷第4期(总56期)
编辑出版 中山医科大学学报编辑委员会
(510089 广州市中山二路74号)

Quarterly
Founded in February 1980
December 1993 Volume 14 Number 4 (56 in total)
Edited & Published by Editorial Board of Acad J SUMS,
74 Zhongshan Road II, 510089, Guangzhou P. R. China
Editor in Chief Peng Wenwei
Printed by Hongqi Printing House, Guangzhou
Subscriptions: Editorial Department of Acad J SUMS,
74 Zhongshan Road II, 510089, Guangzhou, P. R. China

主编 彭文伟
印刷 广州红旗印刷厂
发行 中山医科大学学报编辑部(510089
广州中山二路74号)

中国标准刊号 ISSN 1000-257X
CN 44-1120/R

期刊登记号 058 国内外公开发行 定价 2.50元