

# 高保真酶特异性检测大鼠 SNP 基因型新方法

王淑菁, 岳秉飞

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

**【摘要】** 目的 应用高保真酶(Pfu)和3'末端修饰引物在单管双向等位基因特异性扩增(SB-ASA)中区分SNP基因型,建立高保真酶特异性检测SNP基因型的新方法。方法 选取近交系大鼠SNP位点,以RS8149053为例,设计两个外部引物和两个等位基因特异性引物,引物3'末端进行硫代磷酸化修饰,应用高保真聚合酶(Pfu)进行特异性扩增,扩增结果测序验证其可靠性。结果 在RS8149053 SNP位点(C/T)上,等位基因型CC扩增出179 bp目的片段,基因型TT扩增出597 bp目的片段,基因型不同则扩增出分子量不同的片段,目的条带测序结果与Rat Genome Database数据库基因型结果一致,高保真酶扩增结果稳定且特异性强。结论 高保真酶等位基因特异性扩增技术能有效降低假阳性率,是一种快速、特异的SNP基因分型新方法。

**【关键词】** 高保真酶; SNP基因分型; 硫代磷酸化修饰引物。

**【中图分类号】** R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)08-0069-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2011.08.018

## Establishment of a New SNP Genotyping Method with Pfu DNA Polymerase Assay in the Rat

WANG Shu-jing, YUE Bing-fei

(National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**【Abstract】 Objective** To establish a new SNP genotyping method using Pfu DNA polymerase extend phosphorothioate-modified primers in a single tube bi-directional allele specific amplification (SB-ASA). **Methods** For rat dbSNP loci rs8149053, we designed two outer and two inner allele-specific primers that were 3'-terminal phosphorothioate modified. Pfu DNA polymerase was used to specifically amplify the genome template and the SNP genotype was determined by different target segment DNA electrophoresis. **Results** Different length segments represented different genotypes that were validated by sequencing. **Conclusions** Pfu polymerase genotyping assay is a rapid and specific method for detecting the genotype of the known SNP in a single PCR reaction.

**【Key words】** Pfu DNA polymerase; SNP genotype; Phosphorothioate-modified primers

随着人类、小鼠及大鼠全基因组序列测定的完成,研究重心开始转向种群间及种群内遗传差异的比较。在诸多变异中,SNP是研究基因组变异的一种高效的遗传标记。对SNP的分析,在疾病预防,新药筛选与研发,药物个体差异等诸多个体化医药领域具有十分关键的作用<sup>[1,2]</sup>,是当前相关学科研

究的热点。

目前已建立的SNP分型方法很多,包括PCR-RFLP、PCR-SSCP、等位基因特异性PCR(AS-PCR)、直接测序、高效液相色谱(DHPLC)、基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)和DNA芯片等技术。PCR-RFLP是分析已知点突变时应用最多

[作者简介]王淑菁(1985-),女,硕士生,研究方向:免疫遗传检测。E-mail: wsj2008gogo@163.com。

[通讯作者]岳秉飞(1960-),男,研究员,博士。研究方向:动物遗传学。E-mail: yue-bingfei@nicpp.org.cn。

的方法,但人类或其它生物体基因组中只有不到 1/3 的多态性影响限制性内切酶的识别序列,使其应用受到一定的限制;PCR-SSCP 技术操作繁琐且重复性差;DHPLC、MALDI-TOF MS 和 DNA 芯片等方法具有高通量,易于自动化等优点,但成本高、仪器设备昂贵<sup>[3]</sup>。

Liu 等<sup>[4]</sup>于 1997 年建立等位基因特异性 PCR (Bi-PASA) 即设计两个外部引物和包含 SNP 位点的正反内部引物,在一次 PCR 反应中,正向引物扩增一个等位基因,反向引物扩增另一个等位基因,根据电泳图谱中目的片段的大小和有无检测 SNP 位点的基因型。胡培丽等<sup>[5]</sup>对 Bi-PASA 技术进行改良,突变两内部引物 3' 末端倒数第三位的碱基,以提高 SNP 检测的特异性。高红等<sup>[6]</sup>设计两内部引物时,使其包含一个相对较短的完全匹配区域和一个富含 GC 的 10 核苷酸 5 尾,以达到低效扩增到高效扩增的转变。在 Bi-PASA 中,由于内部引物优化的局限性和使用无校正作用 Taq 酶,往往出现非特异性结果,不能对 SNP 基因型进行有效判读。

为使 SNP 检测方法能够进行方便可靠的基因辨认,本研究针对等位基因特异性 PCR 技术假阳性高的缺陷,设计硫代磷酸化修饰的引物,应用高保真酶特异性扩增进行 SNP 基因分型检测,以期能够建立一种特异性强,重复性好,操作简便的新型 SNP 检测方法。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

BN、F344、WKY、LEW、SHR 等 5 种大鼠近交系,其中 BN、F344、SHR 引自北京国家啮齿类实验动物种子中心,合格证号 SCXK(京)2005-0004, WKY 引自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号 SCXK(京)2009-0007, LEW 引自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2006-0009。

### 1.2 主要试剂和设备

1.2.1 主要试剂:饱和酚,氯仿,异戊醇,蛋白酶 K, Takara Taq 酶等均购于北京全新拓达,高保真酶 Pfu (Fermantas),胶回收纯化试剂盒(Axygen),质粒小量快速提取试剂盒(Axygen),Clone JET™ PCR Cloning Kit(Fermantas)等购于北京经科宏达。

1.2.2 主要设备:PCR 仪型号为 Bio-Rad MY CLCLER,核酸琼脂糖凝胶电泳仪型号为 Bio-Rad

Powerpar Basic,紫外图像分析系统型号为上海复日 FR-200 紫外与可见分析装置 UV/White analysis,紫外分光光度计型号为日本 Biospec-mini,台式冷冻离心机型号为 Hettich Mikro 22R。

## 2 方法

### 2.1 DNA 提取

在无菌条件下,剪取大鼠鼠尾 1~2 cm,采取蛋白酶 K 消化和酚-氯仿粗提的方法提取鼠尾基因组 DNA。紫外分光光度计测  $A_{260}/A_{280} = 1.8 - 2.0$  的 DNA 为实验样品,稀释样品使样品浓度调整为 10 ng/ $\mu$ L。

### 2.2 SNP 位点选择和引物设计

从 Rat Genome Database 网站上和 GenBank 数据库里选择大鼠基因组 SNP 位点 RS8149053,并查询 5 种大鼠品系在该 SNP 位点上的等位基因型,显示 BN、WKY、LEW 和 SHR 此位点的等位基因型为 CC, F344 此位点的等位基因型为 TT。根据上下游序列设计两对引物( $P_1/P_2$  为外部引物,  $SP_1/SP_2$  为内部引物),并将引物 3' 端最后两个碱基做硫代磷酸化修饰。引物序列和其相应  $T_m$  值如下:

$P_1$ : 5' -CACAGAACTATGCCTGCTAACG-3' (  $T_m$ : 59.8 $^{\circ}$ C )

$P_2$ : 5' -GCCCTACACTGGACAATGAACTC-3' (  $T_m$ : 60.3 $^{\circ}$ C )

$SP_1$ : 5' -ACACAAAACCTGGATCCCGCCT-3' (  $T_m$ : 63.1 $^{\circ}$ C )

$SP_2$ : 5' -AGACTGGGGGAAGAAGGAACG-3' (  $T_m$ : 62.1 $^{\circ}$ C )

根据 Bi-PASA 扩增原理,不同的等位基因扩增片段大小不同。在 RS8149053 位点上,纯合子等位基因 CC 的预期扩增片段大小为 179 bp,等位基因 TT 的预期扩增片段大小为 597 bp,杂合子等位基因 CT 则 179 bp 和 597 bp 扩增片段均存在。

### 2.3 PCR 扩增及电泳结果

使用 Pfu 聚合酶和无校正作用的 Taq 聚合酶进行扩增比较。反应体系: 10  $\times$  PCR buffer (  $Mg^{2+}$  ) 2.5  $\mu$ L, dNTP Mix ( 2 mmol/L ) 2.0  $\mu$ L,  $P_1/P_2$  ( 10 pmol/ $\mu$ L ) 各 0.5  $\mu$ L,  $SP_1/SP_2$  ( 10 pmol/ $\mu$ L ) 各 0.75  $\mu$ L, DNA 模板(约 10 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, Pfu/Taq 聚合酶 ( 2.5 U/ $\mu$ L ) 0.2  $\mu$ L。

在每个体系中均设立阳性对照和空白对照,阳性对照即只加  $P_1/P_2$  引物各 0.5  $\mu$ L,不加  $SP_1/SP_2$ ;

空白对照中加四引物,不加模板,用灭菌超纯水补齐体系。

设立浓度梯度实验和性别差异实验,以 F344 大鼠 DNA 为模板,模板浓度依次为 80 ng/μL、40 ng/μL、20 ng/μL、10 ng/μL、5 ng/μL;同时取雌性雄性 F344 大鼠 DNA 为模板,使其浓度均为 20 ng/μL 进行 PCR 反应。

反应条件:94℃ 预变性 3min,94℃ 1min,退火温度 1 min,72℃ 1 min,35 个循环,72℃ 延伸 8 min。

取 PCR 产物 5 μL 在 1.5% 琼脂糖凝胶(含 EB)上电泳时间 35 min,紫外图像分析系统上分析结果并拍照。

### 2.4 测序验证

用琼脂糖 DNA 回收纯化试剂盒回收纯化 PFU 扩增目的片段,然后采用 Clone JET™ PCR cloning kit 试剂盒使目的片段连接于平末端载体,转化入 DH5α 感受态细胞,涂布于氨苄抗性的固体培养基培养过夜,挑取单克隆菌落摇菌培养过夜,提取质粒并经 Bgl II 酶切验证后送上海生工生物工程有限公司测序。

## 3 结果

### 3.1 高保真酶(Pfu)与 Taq 酶扩增结果对比

比较两种聚合酶的扩增结果,如图 1(A、B)所

示。图 A 用高保真酶(Pfu)扩增结果,特异性目的条带十分清晰,BN、WKY、LEW、SHR 四个品系大鼠 DNA 扩增的条带约为 179 bp,即等位基因为 CC;F344 扩增的条带约为 597 bp,即等位基因为 TT;阳性对照扩增的条带约为 756 bp,所有品系阳性对照扩增的条带(756 bp)不明显或不可见。高保真酶扩增条带清晰,无假阳性条带或非特异性条带出现。

图 B 示无校正功能 Taq 酶扩增结果,所有品系均扩出阳性对照条带(756 bp),但非特异性条带的扩增也影响实验结果的判读。BN、LEW、SHR 三个品系大鼠 DNA 扩增的片段约为 179 bp,即等位基因为 CC;F344、WKY 大鼠同时扩增出 179 bp、597 bp 的片段,等位基因疑似为 CT,与 Rat Genome Database 上提供的等位基因信息不符。

### 3.2 浓度梯度实验和性别差异实验结果

用 F344 大鼠 DNA 模板,进行浓度梯度实验,其结果如图 2 所示,F344 模板浓度在 5~40 ng/μL,扩增片段大小相同,约 597 bp,目的片段的亮度无明显差异,当浓度提高到 80 ng/μL 时,目的片段虽仍能扩出但其亮度略减弱。

选取同一品系不同性别的大鼠样本作模板,考察性别不同对实验结果的影响。如图 2 所示,雄性 F344 大鼠与雌性 F344 大鼠相同模板浓度下扩增片段大小相同,约 597 bp,目的片段亮度无明显差异。

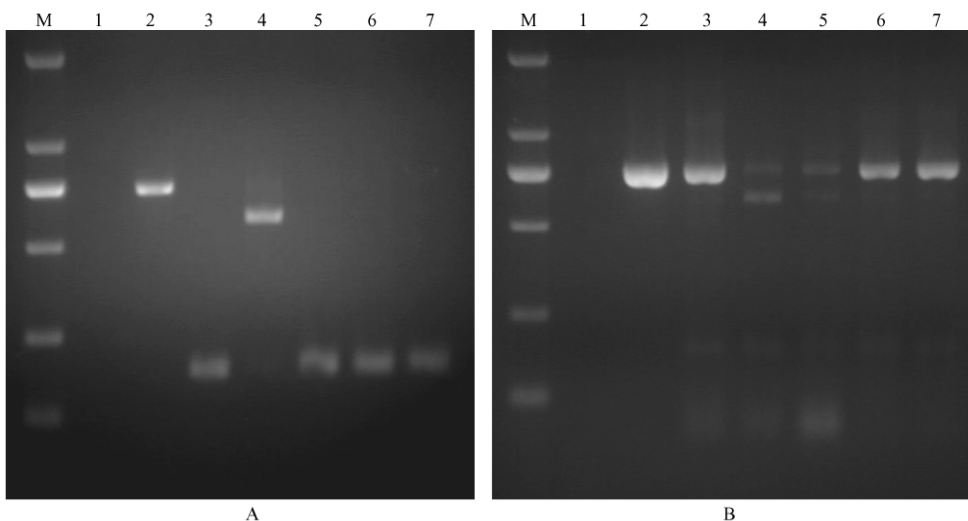


图 1 高保真酶(Pfu)与 Taq 酶扩增结果对比

A 为高保真酶(Pfu)扩增结果;B 为 Taq 酶扩增结果

M: DL2000,条带由小到大依次为:100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1000 bp、2000 bp

1: 空白对照;2: 阳性对照;3: BN;4: F344;5: WKY;6: LEW;7: SHR

Fig. 1 Results of Pfu polymerase DNA and Taq DNA amplification

A: Results of Pfu DNA polymerase amplification. B: Results of Taq DNA amplification.

M: DL2000; 1: Blank control fragment; 2: Positive control fragment; 3: BN; 4: F344; 5: WKY; 6: LEW; 7: SHR

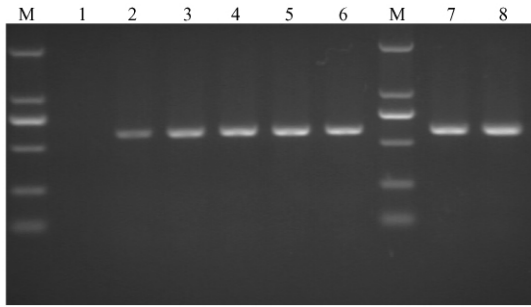


图 2 浓度梯度和性别差异实验结果

M: DL2000, 条带由小到大依次为: 100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1000 bp、2000 bp  
 1: 空白对照; 2: F344( 80 ng/μl) ; 3: F344( 40 ng/μl) ;  
 4: F344( 20 ng/μl) ; 5: F344( 10 ng/μl) ; 6: F344( 5 ng/μL) ;  
 7: F344-雄性( 20 ng/μL) ; 8: F344-雌性( 20 ng/μL) 。

Fig. 2 PCR results of concentration gradient and gender gap

M: DL2000; 1: Blank control; 2: F344( 80 ng/μL) ;  
 3: F344( 40 ng/μL) ; 4: F344( 20 ng/μL) ; 5: F344( 10 ng/μL) ;  
 6: F344( 5 ng/μL) ; 7: F344-male( 20 ng/μL) ;  
 8: F344-female( 20 ng/μL)

3.2 测序结果验证

使用 Vector NIT Suite 8 序列比对软件, 比对高保真酶( Pfu) 扩增的目的条带测序结果( 图 3) , 显示 BN、WKY、LEW、SHR 在 RS8149053 位点等位基因为 CC, F344 等位基因为 TT, 与 Rat Genome Database 网站提供的数据一致, 验证高保真酶( Pfu) 检测方法的可靠性, 同时说明 Taq 酶反应体系中, F344 扩出的 179 bp 和 WKY 扩出的 597 bp 均为假阳性目的条带, 为 Taq 酶非特异性延伸所致的假阳性结果。

4 讨论

随着 SNP 研究的深入, 高通量检测 SNP 的新技术成为发展趋势, 主要集中在纳米技术、基因芯片、多重 PCR 技术、各种荧光探针和荧光标记技术<sup>[7]</sup>。近来, 崔淑芳等<sup>[8]</sup>通过建立基因芯片对小鼠基因组 SNP 进行高通量大规模遗传检测, 设计寡核苷酸探针, 点样杂交后进行图像扫描、数据分析, 对 SNP 基因位点进行分型。Tabone T 等<sup>[9]</sup>借助荧光定量

PCR 对高分辨率溶解曲线进行分析鉴定 SNP 基因型, 建立温度转换 PCR ( temperature switch PCR, TSP) 新技术。Jia Z 等<sup>[10]</sup>建立 3'-荧光标记引物校正延伸检测 ( the 3' labeled exo<sup>+</sup> primer-extension assay, 3' LEPEA) 方法, 将引物 3' 端碱基标记荧光, 使用具有校正作用的高保真酶扩增, 荧光信号收集系统获取信号, 完全配对引物出现荧光信号, 错配引物无荧光信号, 以此辨认 SNP 基因型。

张佳等<sup>[11]</sup>发现高保真酶校正作用和硫代磷酸化修饰引物一同使用, 构成一种对 SNP 具有高度辨认能力的复合分子开关系统: 一定时程内位于高保真酶 3'→5' 外切酶中心的某引物 3' 错配碱基可能被及时切除而该引物被送回酶的聚合中心, 亦可能因错配碱基未及时切除, 而滞留于酶切中心造成聚合中心的空转。硫代磷酸化修饰具有抗外切酶作用, 与高保真酶一起参与反应能够提高终产物的保真度, 减少非特异性的扩增。

高保真聚合酶( Pfu) 与低保真聚合酶( Taq 酶) 相比, 高保真酶具有校正机制和严格模板依赖性, 而低保真聚合酶无 3'→5' 外切作用, 不能切除错配的碱基, 同时它具有引物依赖性, 扩增时对于模板的依赖不如高保真酶, 这些特性往往造成实验结果高假阳性, 低特异性。

本研究将高保真酶的原理与单管双向等位基因特异性扩增相结合, 利用高保真酶的校正机制和硫代磷酸化修饰的引物共同决定了只有完全匹配的引物才能延伸, 不匹配的引物因其抗外切酶作用不被延伸, 建立了 SNP 分型特异性检测新方法, 同时对该方法的特异性、可靠性和重复性进行了研究。通过高保真酶( Pfu) 和 Taq 酶扩增结果的对比, 高保真酶扩增目的条带专一且特异, 验证了该检测方法的特异性; 实验结果经测序后比对, 不同品系等位基因型与 Rat Genome Database 网站提供的数据一致, 验证了该检测方法的可靠性; 本实验中每个样本进行 3 次以上重复, 结果均一致, 验证该方法的重复性。通过模板浓度梯度实验和性别差异

9053-bn-p1-1	109	AACCACACAAAACCTGGATCCCGCCCGTTTCCTTCTTCCGCCAGTCTACCTCCTGGGT
9053-f344-p1-1	106	AACCACACAAAACCTGGATCCCGCCTGTTTCCTTCTTCCGCCAGTCTACCTCCTGGGT
9053-shr-p1-1	107	AACCACACAAAACCTGGATCCCGCCCGTTTCCTTCTTCCGCCAGTCTACCTCCTGGGT
9053-lew-p1-1	107	AACCACACAAAACCTGGATCCCGCCCGTTTCCTTCTTCCGCCAGTCTACCTCCTGGGT
9053-wky-p1-1	107	AACCACACAAAACCTGGATCCCGCCCGTTTCCTTCTTCCGCCAGTCTACCTCCTGGGT
3053-genotypeCC	134	AACCACACAAAACCTGGATCCCGCCCGTTTCCTTCTTCCGCCAGTCTACCTCCTGGGT
3053-genotypeTT	134	AACCACACAAAACCTGGATCCCGCCTGTTTCCTTCTTCCGCCAGTCTACCTCCTGGGT

图 3 目的片段测序结果比对

Fig. 3 Blast results of target fragment sequences

实验结果,考察不同浓度模板和不同性别样品的差异,为实验中反应体系的优化提供依据,并且验证了该方法重复性强。

本实验初步应用高保真聚合酶进行 SNP 基因分型检测,操作简便,样品需求小,分辨率高,成本低,只需要一次 PCR 扩增和一次电泳就可分辨 SNP 基因型。随着对于 SNP 研究的不断深入,该方法以其特异性高、可靠性强和重复性好的优势将会广泛应用到 SNP 基因检测中。

#### 参考文献:

- [1] Hermesniemi JA, Anttila K, Nieminen T, et al. IL-18 gene polymorphism, cardiovascular mortality and coronary artery disease [J]. *Eur J Clin Invest*, 2010, 40(11): 994-1001
- [2] Lin KM, Tsou HH, Tsai IJ, et al. CYP1A2 genetic polymorphisms are associated with treatment response to the antidepressant paroxetine [J]. *Pharmacogenomics*, 2010, 11(11): 1535-43
- [3] Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2007, 9: 280-320
- [4] Liu Q, Thodand EC, Heit JA, et al. Overlapping PCR for bi-directional PCR amplification of specific alleles: A rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes [J]. *Genome Res*, 1997, 7(4): 389-398.
- [5] 胡培丽,岳秉飞,范昌发,等. 单管双向等位基因专一性扩增方法在近交系小鼠遗传检测中的应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2006, 14(4): 246-250.
- [6] 高红,张志波,王维林,等. 双向等位基因特异性 PCR 快速区分纯合子和杂合子 SNP 分型的新方法 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2008, 5(6): 524-528.
- [7] 汪维鹏,倪坤仪,周国华. 单核苷酸多态性检测方法的研究进展 [J]. *遗传 Hereditas (Beijing)*, 2006, 28(1): 117-126.
- [8] 崔淑芳,瞿秀华,韩士忠,等. 双色荧光杂交芯片在近交系小鼠遗传监测中的应用 [J]. *动物学研究*, 2008, 29(1): 10-16
- [9] Tabone T, Mather DE, Hayden MJ. Temperature switch PCR (TSP): Robust assay design for reliable amplification and genotyping of SNPs [J]. *BMC genomics*, 2009, 10: 580.
- [10] Zhang J, Li K, Pardinas JR, et al. Proofreading genotyping assays mediated by high fidelity  $exo^+$  DNA polymerases [J]. *Trends Biotechnol*, 2005, 23: 92-96.
- [11] 张佳,廖瑞芳,张旭,等. 高保真 DNA 聚合酶在 SNP 检测中的应用 [J]. *南华大学学报医学版*, 2003, 31(2): 128-143.

(修回日期)2011-03-18