维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)05-0658-04

双向等位特异 PCR 技术及其在单核苷酸多态性研究中的应用

周晨慧,彭惠民

(重庆医科大学基础医学院细胞生物学及遗传学教研室 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立双向等位特异 PCR 体系,并将其应用于单核苷酸多态性(SNP)研究工作。方法:通过美国国家生物信息中心(NCBI)的 Genbank 获取基因序列及其相应位点的 SNP 信息。利用 Primer 5.0 软件设计引物,并经 NCBI 的 Blast2.0 软件检验其特异性。双向等位基因特异性引物 PCR(Bi-PASA PCR),将该技术应用于与张力蛋白在 10 号染色体上同源缺失的磷酸酶(PTEN)基因 SNP 的研究。结果:证实该技术具有较高的可靠性和优越性。结论:双向等位特异 PCR 技术是一种简便、特异性较高、费用低廉和便于推广的 SNP 检测方法,特别是在群体基因 SNP 研究中更有优势。

【关键词】单核苷酸多态性;双向等位特异 PCR;PTEN

【中国图书分类法分类号】R394 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-01-12

Application of a bidirectional amplification of specific alleles polymerase chain reaction technique in study of SNPs

Zhou Chenhui, et al

(*Department of Cell Biology and Genetic, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective:* To establish a bidirectional amplification of specific alleles polymerase chain reaction (Bi-PASA PCR) technique system and to apply this technique to study of single nucleotide polymorphism (SNP) of genes. *Methods:* The information of nucleotide sequences and their corresponding SNPs of gene were obtained from genBank of National Central of Biotechnology Information. The primers were designed by Primer 5.0 software and their specificity was tested by NCBI Blast 2.0 software. *Results:* They successfully designed and established the technique system of Bidirectional amplification of specific alleles Bi-PASA. The method were applied to study SNPs of PTEN (phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN). The superiority and stability of Bi-PASA PCR technique on determining SNPs of genes have been tested. *Conclusions:* The Bi-PASA PCR technique is a new method for determination of SNP with more convenience, more specificity, less cost and easy availably and has much more advantage especially in the study of population gene polymorphism.

【Key words】Sinlgle nucleotide polymorphism; Allelic specific bidirectional amplification of specific alleles polymerase chain reaction; PTEN

单核苷酸多态性(SNP)作为第 3 代遗传学标记,是最常见的一种遗传变异,在动植物性状遗传学分析和疾病相关基因的研究中已得到广泛应用。目前对 SNP 的检测方法大多以 PCR 技术为基础[1,2]。但各项方法存在费用高昂或操作繁琐等缺点,急需一种稳定可靠、操作简便且费用低廉的方法。本研究利用双向等位特异 PCR(Bidirectional amplification of specific alleles polymerase chain reaction, Bi-PASA PCR)技术,用于 2 型糖尿病(T2DM)与张力蛋白在 10 号染色体上同源缺失的磷酸酶(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN)基因第 9 外显子 rs9651492 错义突变和 5' 端非翻译区 rs2673835 位点的研究,取得很好效果。Bi-PASA PCR 法以其操作简单、特异性高、经济实惠等优点,为疾病基因研究提供了切实可行的 SNP 检测方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

分别抽取 T2DM 患者 118 例和正常对照 102 例的外周血 2ml,患者样本均来源于重庆医科大学附属医院门诊,

作者介绍:周晨慧(1974-),女,硕士研究生,主要研究方向:糖尿病分子遗传学。

基金项目:重庆医科大学创新基金资助项目(CX200302)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

T2DM诊断遵循世界卫生组织诊断标准。提取白细胞染色体基因组 DNA，于 -20℃保存。所用 Taq 酶、dNTP、琼脂糖和溴化乙锭（EB）等由中国大连宝生物有限公司提供。外周血白细胞 DNA 提取试剂盒由上海华舜生物工程有限公司提供。硫酸铵、0- 巯基乙醇、EDTA 等试剂由重庆医药股份有限公司提供。所需引物用 Primer 5.0 软件设计，由上海生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 应用 Bi-PASA PCR 技术研究 PTEN 基因第 9 外显子 rs9651492 位点 SNP。

①通过美国 NCBI(美国国家生物信息中心)的 GenBank 获得要研究的 PTEN 基因序列（genBank NO.NM 000314 .Homo sapiens adre… [gi:73765543]）。在 dbSNP (http:www. ncbi. nlm. nih. gov / SNP) 中选第 9 外显子 rs9651492 (contig-pos=8441489C/G His-Asp153)的信息。

②根据研究需要，选定包括 PTEN 基因在内的核苷酸序列片段作为 Bi-PASA PCR 技术的扩增区。

③引物及 PCR 反应条件

应用 Primer5.0 软件设计符合研究需要的 4 条引物并对其进行评估。根据研究需要，设计等位基因特异性的 2 条内侧引物，使其 3' 端碱基与 SNP 位点碱基互补。以 2 条内侧引物作为约束条件，分别设计两条外侧引物（各引物如下表所示）。

1.2.2 应用 Bi-PASA PCR 技术研究 PTEN 基因 rs2673835 位点 SNP

①主要通过美国 NCBI(美国国家生物信息中心)的 Genbank 获得我们所要研究的 PTEN 基因 SNPrs2673835 (contin-pos8474209A/G)的信息。

②根据研究需要，选定包括 PTEN 基因 rs2673835 在内的核苷酸序列片段作为 Bi-PASA 法 PCR 技术的扩增区。

②应用 Primer5.0 软件设计符合研究需要的 4 条引物并对其进行评估。根据研究需要，设计等位基因特异性的 2 条内侧引物，使其 3' 端碱基与 SNP 位点碱基互补。以 2 条内侧引物作为约束条件，分别设计两条外侧引物（各条引物如下表所示）。

1.2.3 PCR 反应体系及反应条件

PCR 扩增反应体系总体积为 25μl，含有基因组 DNA

表 1 PTEN 基因 rs965192 和 rs2673835 位点引物

rs9651492 引物名	（引物序列:5' 端 -3 ' 端）		rs2673835引物名称
P1	AGACCATAACCCACCACAGC	P2	GATGGCACTTTCCCGTTTTA
Q1	AACTTGTCTTCCCGTCGTGT	Q2	ATGAAGCATCCACAGCAGGT
A1	**GGGGGGGGGC**AAGGCACAAGAGGCCCTA**G**	A2	**GGGGGGGGGC**AAGAGAGGTTTCCGAA**C**
B1	**GGGGGGGGGC**GGTCCTTACTTACCCATAGAAAT**G**	B2	**CGGGGGGGGC**TTAGAATGCAAAACC**T**

注：A、B 引物序列中加框字母表示为等位基因特异性引物(3' 端)设计的 SNP(A/G)识别位点。大写粗线字母表示 A、B 引物 5' 端 GC 尾。

50ng，12.5μmol/L 引物 P，Q 各 0.5μl，12.5μmol/L 引物 A，B 各 1μl，62.5μmol/L dNTPs 2.5μL 1.5mmol/L $MgCl_2$ 2.5μl，10 × PCR buffer 2.5μl 和 0.4U Taq 聚合酶。rs9651492 位点的 PCR 条件：预变性 96℃5min、变性 94℃30s、复性 54 ℃30s、延伸 72 ℃30s、循环 32 。rs2673835 位点的 PCR 条件：预变性 96℃5min、变性 94℃30sec、复性 50℃30s、延伸 72℃30s、循环 33。

1.3 PCR 反应产物分析方法

制备 2% 琼脂糖凝胶，取 PCR 产物 10μl 上样，在电压为 100V，功率 5W 条件下电泳 1h，电泳结束后，凝胶置于 0.5μg/L 溴化乙锭溶液中染色 15min，将已染色凝胶置于凝胶成像系统仪中观察并照像。

2 结果

PTEN 基因第 9 外显子 rs9651492 位点错义突变的 PCR 反应产物结果分析：基因型 GG 者其产物条带为 217bp 和 495 bp 条带两条带；基因型 CC 者则为 282bp 和 495 bp 两条带；基因型 G/C 的杂合子产物则有 217bp、282bp、495bp3 条条带（图 1）。

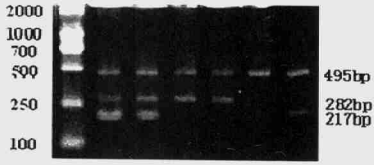


图 1 PTEN 基因第 9 外显子 rs9651492 错义突变电泳图（A、B 为基因型 G/C 的杂合子，C、D 为基因型 CC 纯合子，E、F 为基因型 GG 纯合子）

PTEN 基因 rs2673835 位点的 PCR 反应产物结果分析：基因型 AA 者其产物为 224bp 和 765bp 两条带。基因型 GG 者则为 224bp 和 765bp 两条带。基因型 A/G 的杂合子产物则有 224bp、596bp、765bp3 条条带（图 2）。

3 讨论

3.1 Bi-PASA PCR 原理

Bi-PASA PCR 技术是在等位特异 PCR 法（al-

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 2 PTEN 基因 rs2673835 位点电泳图

（A、B 为基因型 AA 纯合子，C、D 为基因型 GG 纯合子，E、F 为基因型 A/G 的杂合子）

lele-specific amplification，PASA）[3-5]的基础上发展而来。PASA 法原理是在 PCR 反应体系中，引物 A 的 3' 端碱基与待测等位突变型位点碱基互补，该引物 3' 端碱基与野生型等位位点碱基不互补。因此在 PCR 扩增时，将优先扩增出含有突变型等位基因的序列。同理引物 B 的 3' 端碱基与等位野生型位点碱基互补，在 PCR 扩增时，将优先扩增出包含野生型等位基因的序列基因。随后分别将扩增产物进行电泳。该方法虽然可检测出 SNP，但每检测一份样本要求两次反应，步骤繁琐。

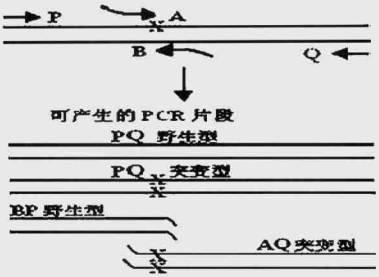
Bi-PASA[6,7]法同 PASA 法原理相同，不同之处在于：

①Bi-PASA 法可分解为两个阶段，第一阶段，以基因组 DNA 为模板，分别扩增出 PQ、PB 和 AQ 片段。第二阶段，反应以自扩增为主，即以 PQ、PB 和 AQ 为模板，分别扩增出 PQ、PB 和 AQ 片段。

②在 Bi-PASA 法中，共有 4 条引物(如图 3 所示)，外侧引物 P 和 Q 分别位于待测等位基因的上、下游；内侧引物 A 和 B 均由一段与模板互补的寡核苷酸链和位于 5' 端约 10 个碱基的 G+C 尾组成。引物 A 位于 X（X 代表 SNP 突变位点）序列的中上游，其 3' 末端碱基与突变位点碱基互补；引物 B 位于待测等位基因序列的中下游，其 3' 末端碱基与野生型 SNP 位点互补。

③PCR 扩增片段，对于杂合子，可扩增出两条包含有野生型和突变型 SNP 位点的寡核苷酸序列，该反应将扩增出三条片段，分别为 PQ（PQ 野生型与 PQ 突变型长度相同）、AQ、PB；AQ 代表 X 突变型片段，BP 代表野生型片段，而 PQ 为公共片段。由于 PQ、PB、AQ 片段长度有明显差异而容易识别。对于纯合子（包括野生型和纯合突变型）只产生两条片段，即 AQ 和 PQ 片段或 PB 和 PQ 片段。

3.2 Bi-PASA 法的特点



（X 表示 SNP 突变位点，片段 P 和 Q 分别表示两条外侧引物，片段 A 和 B 分别表示两条内侧引物，片段 A 和 B 的 5' 端 GC 尾与模板不互补，用斜线表示。该多重 PCR 反应可产生四种片段，分别是 PQ 野生型、PQ 突变型、BP 野生型和 AQ 突变型，PQ 野生型和 PQ 突变型片段长度相同）

图 3 Bi-PASA PCR 法反应示意图

①两条内侧等位特异性引物的 3' 端碱基分别与待测位点的突变型和野生型碱基互补。

②内侧引物 5' 端有约 10 个碱基的 G+C 尾，该序列可使反应从以基因组 DNA 为模板的扩增转向以引物合成产物为模板的扩增；并且引物 5' 端的 G+C 尾可防止在扩增早期几个循环后，将 PB 或 AQ 作为引物进行扩增。

③该反应只需一个退火温度。

④两条内侧引物是使扩增产量由低到高转变的关键。

⑤内、外侧引物在反应中的浓度基本相同。经琼脂糖凝胶电泳，可鉴定出靶基因。实现了一次 PCR 反应即可鉴定一份样本。其优点为操作简单，实验成本低。

3.3 引物设计策略

引物 P 和 Q 的 Tm 值比 PQ~片段的 Tm 值低

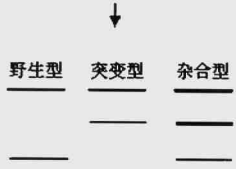


图 4 Bi-PASA PCR 法电泳结果，野生型及突变型纯合子只产生两条片段，即 AQ 和 PQ 片段（PQ 野生型片段和 PQ 突变型片段长度相同）或 PB 和 PQ 片段；杂合子产生 3 条片段，分别为 PQ、AQ 及 PB 片段。

维普资讯 http://www.cqvip.com

20~25℃，PQ 片段的长度应在 300~1000bp 之间。

引物 A 和 B 的 Tm 值比 PQ 片段的 Tm 值约低 35℃左右，此时 PCR 反应可有较好的特异性和较高的扩增效率。

3.4 Bi-PASA 法反应优化

Ta(退火温度)比 PQ 片段的 Tm 值低 20℃左右，或比内侧引物 A、B 的 Tm 值高 5~7℃。较高的 Ta 值可避免在 PCR 反应中非特异性条带的产生，但可能会导致引物 A、B 难以与模板结合。

对引物浓度进行优化，先固定外侧引物 P、Q 的浓度，改变内侧引物 A、B 的浓度。

PCR 循环次数在 35 个循环以内，32 个循环即可达到较高的扩增效率。过多的循环次数不利于 PCR 产物的保存。

Bi-PASA 法作为一种检测 SNP 行之有效的方法，其优点在于该方法不需要高档大型仪器设备及昂贵的 ExTaq 聚合酶，PCR 反应条件简单，仅需一次 PCR 反应即可完成一份样本 SNP 的检测。内侧引物 5' 端的 GC 尾能有效提高 PCR 反应目的条带的扩增效率，同时有效减少非特异条带的产生，避免假阳性或假阴性的产生，从而更便于观察结果。本文应用 Bi-PASA 法检测了 220 例汉族自然人群的 PTEN 基因的 rs9651492 和 rs2673835 位点，证明该方法具有较高的特异性，可重复性和实验费用低廉等优点。而实验成功的关键在于多重 PCR 反应的引物设计和各项反应条件优化。

国外学者[8]应用等位特异 PCR 法（allele-specific amplification PASA）对肾上腺 β_2 受体基因上位与 -645 到 79 之间的 SNPs 进行检测。证明该方法具有较高的特异性和稳定性，提出内侧引物 5 端的 GC 尾有助于 PCR 反应退火温度的提高，从而提高了检测的特异性，但应用 PASA 法检测一个样本的多态性位点需两次 PCR 反应。而本文所应用的 Bi-PASA PCR 技术检测一份样本仅需一次 PCR 反应，从而实现了高效低成本大批量检测 SNP。经直接测序也证明 Bi-PASA PCR 法检测 SNP 准确性高，特别适合于已知 SNP 的检测和人群中突变 SNP 的筛查。值得在基因组 SNP 以及微缺失和插入研究中进一步推广。

（通讯作者：彭惠民，重庆医科大学细胞生物学及遗传学教研室，400016，E-mail:penghuimin6@sohu.com）

参 考 文 献

[1] Nollau P, Wagener C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment.IFCC Scientific Division, Committee on Molecular Biology Techniques[J].Clin Chem, 1997;43:1114-1128.

[2] Collins A, Lonjou C, Morton NE.Genetic epidemiology of single-nucleotide polymorphisms [J].Proc Natl Acad Sci USA, 1999;96:15173-15177.

[3] Tost O, Brandt F, Boussicault D, et al. Molecular haplotyping at high throughput [J]. Nucleic Acids Res, 2002;30:96- 99.

[4] Ishihara H, Sasaoka T, Lagawa S, et al.Association of the polymorphisms in the 5' -untranslated region of PTEN gene with type 2 diabetes in a Japanese population[J]. FEBS Lett, 2003;20(554):450-454.

[5] Nichols WC, Liepnieks JJ, McKusick VA, et al. Direct sequencing of the gene for Maryland/German familial amyloidotic polyneuropathy type II and genotyping by allele-specific enzymatic amplification [J].Genomics, 1989;5:535-540.

[6] Liu Q, Thorland EC, Heit JA, et al. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles:a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes [J].Genome Res, 1997;7:389-398.

[7] Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA.The amplification refractory mutation system (ARMS) [J]. Nucleic Acids Res, 1989;17:2503-2516.

[8] Wijesekara N, Konrad D, Eweida M, et al.Muscle-Specific Pten Deletion Protects against Insulin Resistance and Diabetes [J].Mol Cell Biol, 2005;25:1135-1145.

（上接第 644 页）

参 考 文 献

[1] 王智彪.生物学焦域的概念及在高强度聚焦超声切除组织中的作用[J].临床超声医学杂志，1998;9(4):217-218.

[2] Malcolm AL, ter Haar GR.Ablation of tissuvolumes using high intensity focused ultrasound [J].Ultrasound in Med.Biol, 1996;22(5):659-669.

[3] 冯 若.高强聚焦超声“切除”肿瘤的机理[J].中国超声医学杂志，2000;16(12):881-884.

[4] McDannold N, Moss M, Killiany R.MRI-guided focused ultrasound surgery in the brain:tests in a primate model [J].Magn Reson Med, 2003;49(6):1188-1191.

[5] Chen L, Bouley DM, Harris BT, et al.MRI study of immediate cell viability in focused ultrasound lesions in the rabbit brain [J].Magn Reson Imaging, 2001;13(1):23-30.