

应用改进的通用荧光 PCR 引物 进行多重 STR 分型

张超 范忠鹏 朱旺升 赵莹 陈绅波 李凯 周宇荀 肖君华 *

(东华大学化学化工与生物工程学院 生物科学与技术研究所 上海 201600;
上海市实验动物研究所-复旦大学-东华大学模式动物生物多样性联合实验室 上海 201200)

摘要: 通过设计通用荧光 PCR 引物并结合 DNA 测序系统建立了小鼠的多重 STR 分型方案。实验针对小鼠基因组设计了两对不同的通用引物序列,标记了 FAM 荧光的通用序列和“加尾”的位点特异性引物共同用于小鼠的多重 PCR 的 STR 基因分型。本研究优化了通用引物和特异性引物间的比例,优化了多重 STR-PCR 的反应条件,并最终利用该技术方案实现了五重 STR 分型。实验验证了该方案在多重 STR 分型中的可行性。与传统的荧光检测 PCR 产物方案相比,应用通用方案完成多重 PCR 反应大大节省了实验时间与经费。

关键词: 通用引物; STR; 多重 PCR; 基因分型

中图分类号:Q81 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2008)03-75-06

Multiplex STR Genotyping with Improved Universal Fluorescent PCR Primers

ZHANG Chao FAN Zhong-Peng ZHU Wang-Sheng ZHAO Ying CHEN Shen-Bo
LI Kai ZHOU Yu-Xun XIAO Jun-Hua *

(*Institute of Biology Science & Technology, Donghua University, Shanghai 201600;*
Joint Laboratory of Model Animal Biodiversity, Shanghai 201200, China)

Abstract: This study established a multiplex STR genotyping system through universal fluorescent primers in combination with sequencing. For each panel of multiplex STR genotyping amplification, two sets of primers were used, namely universal primers labeled with FAM and specific primers with an added 5' tail. We optimized the proportion of universal and specific primers and reaction of multiplex PCR was achieved. By using this method, five STR marker loci genotyping were successfully conducted within a single reaction. The optimized universal fluorescent primers amplification genotyping system can be used in multiplex STR genotyping, which allows reliable, effective and low-cost genotyping compared with regular microsatellite fluorescent detection assays.

Key words: Universal primers; STR; Multiplex polymerase chain reaction; Genotyping

短串联重复 DNA 序列 (short tandem repeat, STR) 广泛存在于人类和其他生物体基因组中。其核心序列一般为 2~6 bp,核心序列重复次数的不同形成了丰富的遗传多态性^[1]。由于 STR 遗传标记数量众多,杂合度高,特异且稳定,使得其成为目前遗传学分析最重要的遗传标记之

—^[2,3]。

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30771191);

* 通讯作者, E-mail: xiaojunhua@dhu.edu.cn;

第一作者介绍 张超,女,硕士;研究方向:医学分子遗传学;

E-mail: zhang8244@163.com。

收稿日期:2007-11-02,修回日期:2008-03-10

目前应用 PCR 技术对 STR 位点进行 DNA 多态性分析,多采用荧光标记配合测序分型系统区分不同的基因型,达到鉴别品系间^[4]或个体间 DNA 多态性的目的^[5,6],并采用多重 PCR 同时检测多个不同的 STR 位点。逐个荧光标记 PCR 引物会产生巨额合成费用。为了减少由于逐个进行荧光标记而产生的大量实验成本,Oetting^[7]等提出了一种新的 PCR 策略,即利用通用引物方案完成基因分型,并得到了广泛的应用^[8~10]。之前的研究并未涉及通用引物在多重 PCR-STR 上的应用。因此,本研究分析了通用荧光引物在多重 PCR 中应用的可行性,旨在建立一种更经济实用的方案完成多重 PCR-STR。这将为 PCR-STR 分型技术提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料 C3H/HeJ (C3H)、C57BL/6J (B6) 两个小鼠品系及其子一代 C3B6F1 (F1) 个体。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 将小鼠尾尖剪下 1 cm 左右,用 DNA 提取试剂盒(北京博大泰克生物公司)抽提小鼠尾尖 DNA,最终溶于 70 μ l TE 中,0.8%琼脂糖凝胶电泳检测产物,并稀释成约 100 ng/ μ l 作为 PCR 模板。

1.2.2 微卫星 DNA 标记的选取 从 NCBI(美国国立生物技术信息中心)网站的小鼠基因组数据库中,选取在 C3H/HeJ 和 C57BL/6J 小鼠品系中片段长度有差异的 10 个 STR 位点,分别位于小鼠 1、2、3、4 和 17 号染色体: D1Mit210、D2Mit142、D4Mit71、D4Mit163、D3Mit221、D3Mit225、D3Mit357、D3Mit110、D3Mit162、D17Mit129。

1.2.3 引物设计合成 引物设计分为通用引物(universal primer)和特异性引物(specific primer)两部分。通用引物的设计原则如下:(1)与小鼠基因组没有同源性;(2)避免引物本身形成发夹结构、二聚体等;(3)上下游引物的

T_m 值都在 60 左右;(4)通用引物长度控制在 15~30 bp。实验采用 2 对通用引物,U1-上游(5 标记 FAM 荧光): 5-CGC AAA CCT GTA CGC-3',U1-下游: 5-CCC TCT GAG TGA TGC-3'; U2-上游(5 标记 FAM 荧光): 5-TCA CTT GCT TCC GIT GAG G-3',U2-下游: 5-GGT TTC GGA TGT TAC AGC GF-3'。用 Oligo 6.0 软件设计每个位点的特异性引物,设计好后用 BLAST 检验引物在整个基因组中特异性情况。然后将对应的通用引物上下游分别连接到每对特异性引物的上下游 5 端。多重 PCR 反应各位点引物序列见表 1。本实验所用引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.4 STR 片段的多重 PCR 扩增 采用 5 μ l PCR 反应体系,其中 0.5 μ l 10 \times buffer(含 15 mmol/L $MgCl_2$),0.3 μ l Mg^{2+} (1.5 mmol/L),0.5 μ l dNTPs(0.2 mmol/L),0.25 U *Taq* 酶,特异性引物 0.2 μ mol/对,通用引物(U1,U2) 2 μ mol \times 2,0.5 μ l DNA 模板(25~50 ng)。PCR 反应程序: 95 15 min; 19 个“Touch down”循环,“Touch down”与正常的 PCR 循环类似,退火温度从 60 开始,每个循环降低 0.5 ; 25 个主循环包括 94 30 s,合适的退火温度(如 56) 90 s,68 90 s; 最后 68 20 min。使用的 PCR 仪型号为 9600,生产厂家 Perkin Elmer。

1.2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测及数据分析 使用核酸自动测序仪(ABI 377 Genetic Analyzer)检测分型结果并用软件 GeneMapper ID 分析数据。

1.2.6 通用引物方案多重 PCR 扩增流程 实验中针对小鼠基因组设计的两种不同的通用引物序列(U1,U2)均含有上下游两段引物序列,每对位点特异性引物的上下游 5 端也分别连上一段“尾巴”,用来与通用引物的上下游紧密配对。即四段式引物序列,使其共同用于 STR 多重 PCR。通用方案 PCR 流程示意图 1。

表 1 10 个 STR 位点的特异性引物序列及其 PCR 产物在 C3H 及 B6 中的长度
Table 1 Specific primers sequences and fragment lengths of 10 STR loci amplified by PCR from inbred mouse strains C3H, B6

位点名称 ^a STR Markers ^a	引物序列 5 - 3 Sequence of primers (5 - 3)	PCR 产物长度 Product size (bp)	
		C3H	B6
D2Mit142-B8U + U2U	<i>TCA CTTGCTCCGTTGA</i> GGGGGTGGCTCTATTAGGCACA	159	157
D2Mit142-B8L + U2L	GGTTTCGGA TGTTA CA GCGTGA GCAA GGCATAA GGA GACCA		
D4Mit71-D4U + U2U	<i>TCA CTTGCTCCGTTGA</i> GGGAA GGACA GCCA GGTGGATAG	200	206
D4Mit71-D4L + U2L	GGTTTCGGA TGTTA CA GCGTACCCCAA ACTGCCATA GTTAGTG		
D4Mit163-D6U + U2U	<i>TCA CTTGCTCCGTTGA</i> GGA GCCTCTAAA GACCCGAGA G	172	176
D4Mit163-D6L + U2L	GGTTTCGGA TGTTA CA GCGTCTTGC GACTCAC GICTAAA GG		
D1Mit210-A10U + U1U	CGAAA CCTGTA CGCCATAA GACAAATACCCCACTATTAC	139	143
D1Mit210-A10L + U1L	CCCTCTGA GTGA TGCACATGICTGCAAA TGGGIATG		
D3Mit221-C1U + U2U	<i>TCA CTTGCTCCGTTGA</i> GGCAAAATGTA GATCCCTTCATAC	174	162
D3Mit221-C1L + U2L	GGTTTCGGA TGTTA CA GCGTCTTATCTCCATAAA GAA GATGTA		
D3Mit225-C2U + U2U	<i>TCA CTTGCTCCGTTGA</i> GGGIAATTTTAA GATTTCTTCCAT	212	206
D3Mit225-C2L + U2L	GGTTTCGGA TGTTA CA GCGTGITGAATTTATACACATGCTCA		
D3Mit357-C3U + U2U	<i>TCA CTTGCTCCGTTGA</i> GGC TACTATCTCACTGAGA GAAT	136	142
D3Mit357-C3L + U2L	GGTTTCGGA TGTTA CA GCGTGA GTATTACTTGCCTTAACTGA		
D3Mit110-C4U + U2U	<i>TCA CTTGCTCCGTTGA</i> GGATTTAATGATTTGGGGITTTGAC	184	188
D3Mit110-C4L + U2L	GGTTTCGGA TGTTA CA GCGTAGGATTTACATGCCA GGA GGA GA		
D3Mit162-C5U + U2U	<i>TCA CTTGCTCCGTTGA</i> GGCTAGGA GAGACCGTCCCA	232	242
D3Mit162-C5L + U2L	GGTTTCGGA TGTTA CA GCGTGAACACATTACAGGATATTTTC		
D17Mit129-upper + U1U	CGAAA CCTGTA CGCATTITGACACCTGACAGGTTGA	188	198
D17Mit129-lower + U1L	CCCTCTGA GTGATGATGATGATTTCTGGTGICC		
D17Mit129-upper *	ATTTTGACCGCTGACAGGTTGA	158	168
D17Mit129-lower *	ATTGATGATGATTTCTGGTGICC		

5 端斜体部分是连接的与通用引物序列相同的“尾巴”序列；* 上游 5 端直接加荧光标记的传统特异性引物,用来与相同位点的通用引物作对照；a:名称包括 STR 位点名称及搭配的通用引物序列名称。

5' end sequence, defined as “tail sequence” in *italic* format was identical to universal primer sequence; * Regular fluorescent specific primers were used as control; a: STR markers and the matching universal primers are presented and symbolized.

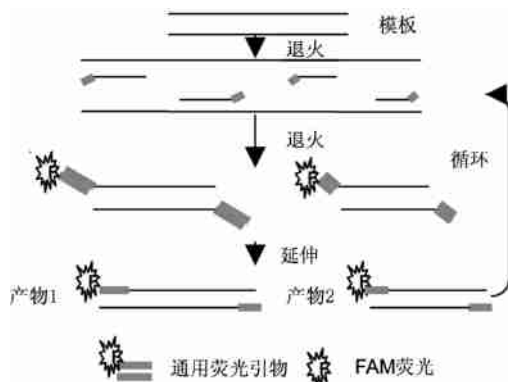


图 1 通用引物方案多重 PCR 扩增示意图

Fig. 1 Multiplex PCR amplification by universal primer approach

2 结果

2.1 小鼠基因组 DNA 提取 使用北京博大泰克生物公司生产的动物基因组 DNA 小量快速提取试剂盒提取 DNA,经 0.8% 琼脂糖电泳、溴化乙啶染色检测提取结果。如图 2 所示,提取的基因组 DNA 状态良好,没有降解,可以作为模板用于后续的多重 PCR 扩增。

2.2 多重 PCR 反应条件优化

2.2.1 特异性引物与通用引物间的比例优化

特异性引物与通用引物间的比例对 PCR 反应的影响是不同的,本实验采用针对 D4Mit163-D6 的单重 PCR 反应,研究了引物之间的最佳

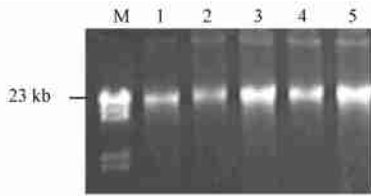


图 2 小鼠基因组 DNA 提取结果

Fig. 2 The result of DNA extraction in mouse

M. DNA/*Hind* DNA 分子量标准;
1~5. 小鼠 DNA 抽提样本。

M. DNA/*Hind* DNA marker; 1-5. DNA samples of mice.

配比关系。通用引物与特异性引物分别按照浓度为 1、1.5、1、10、1、15、1 的比例混合, 分别以 C3H/HeJ (C3H)、C57BL/6J (B6)、C3B6F1 (F1) 小鼠 DNA 样本为模板, 按照 1.2.4 的方法进行 PCR 扩增, 反应结果通过 ABI377 测序仪测得荧光值。研究结果显示, 随着通用荧光引物比例的升高, 荧光强度增加 (图 3)。当通用引物与特异性引物比例为 10:1 时荧光强度最强。继续提高通用引物浓度 (15:1) 对扩增效率没有明显影响。因此, 选用通用引物为特异性引物 10 倍浓度时, 扩增效率较高, 并相对节省荧光引物用量。

2.2.2 退火温度的优化 退火温度在多重 PCR 反应中相对比较重要, 在 D1Mit210、D2Mit142、D4Mit163、D4Mit71 四个位点的多重 PCR 反应中, 选择 50、53、56、59 4 个温度梯度来寻找最佳退火温度。梯度实验结果显示, 当退火温度为 56 时, 该组合 PCR 扩增效果最好, 峰形整齐, 且荧光强度较高。以

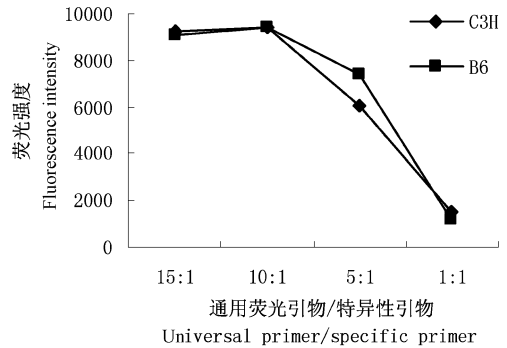


图 3 PCR 产物的荧光强度随引物比例变化曲线

Fig. 3 Relationship curve between PCR products fluorescence intensity and proportion of universal and specific primers

C3B6F1 杂合子小鼠 DNA 为模板, 在 56 退火温度时得到的 4 个 STR 位点的 PCR 扩增效果如图 4 所示。

2.3 五重 PCR-STR 应用 前述方法, 以通用引物方案针对其他 5 个不同的 STR 位点进行了多重 PCR 反应, 实验结果进一步得到了验证 (图 5)。图 5 显示当退火温度为 53 时得到的 D3Mit221、D3Mit225、D3Mit357、D3Mit110、D3Mit162 五个 STR 位点的多重 PCR 结果 (以 C3B6F1 杂合子小鼠 DNA 样本为模板)。

2.4 通用引物与传统荧光引物方案在 STR 基因分型中的比较 本实验采用的通用引物 STR 分型方案是建立在传统的荧光修饰引物 STR 分型方案基础上的。实验随机选择了一个 STR 位点 D17Mit129 来比较通用与荧光两种方案的检测结果。如图 6 显示, 通用引物方案和传统

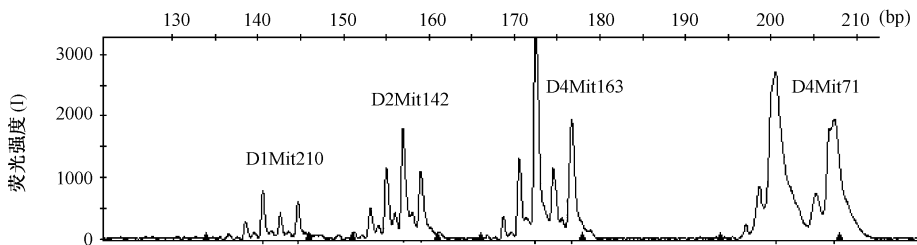


图 4 56 退火温度时得到的四重 STR C3B6F1 杂合子 PCR 结果

Fig. 4 The multiplex PCR result of four STR markers at the annealing temperature of 56

横坐标代表 PCR 产物片段长度大小, 单位 bp; I 表示荧光强度。(后图同)

Abscissa shows the size of PCR fragments (bp); I stands for fluorescence intensity. (as same as following fig.)

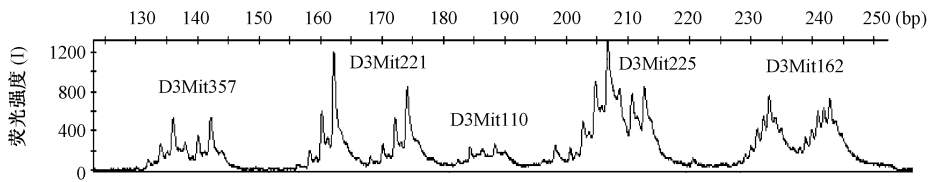


图 5 53 退火温度时得到的五重 STR 电泳图

Fig. 5 The electrophoretogram of quintuple STR system at the annealing temperature of 53

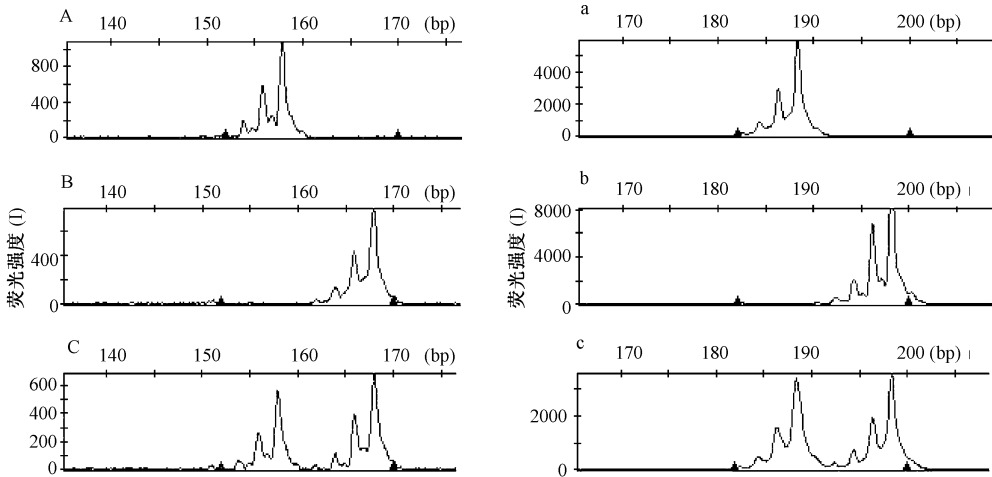


图 6 D17Mit129 的单重 STR PCR 扩增分型结果

Fig. 6 Simplex STR genotyping of D17Mit129 PCR products

左侧图是采用传统的荧光标记位点引物,右侧图是用通用荧光引物方案完成。A、a 是以亲本 C3H 为模板;

B、b 是以亲本 B6 为模板; C、c 是以 F1 杂合子为模板。

Left figure presents conventional florescent primer method and the right presents universal florescent primer approach.

A, a, C3H; B, b, B6; C, c, F1.

的荧光引物方案在单点的 STR 分型结果一致。

3 讨论

本研究将通用荧光引物方案应用于多重 PCR,扩增多个 STR 位点,并针对小鼠基因组设计了两种不同的通用引物序列,均可成功地用于小鼠基因组多个 STR 位点分型。通用引物方案的应用主要局限于单重 STR 的分型^[8],而本研究利用改进的通用引物方案实现了针对小鼠基因组的 STR 五重 PCR 反应,进一步提高了工作效率。与 Oetting 等^[7,9,10]设计的只提供上游通用引物序列不同,本研究在上下游均设计了通用引物。一般而言,PCR 反应开始的 3 个循环后,普通位点特异性引物扩增给通用荧光

引物提供了大量的模板,改进后的通用引物方案使得 PCR 反应进行几个循环后,其扩增效果主要取决于通用荧光引物,而与特异性引物无关系。因此,对每个位点来说引物量更均一,PCR 扩增反应更稳定,效果更好(图 4),而 Oetting 等^[7]设计的通用引物只有一条,无法保证在多重 PCR 过程中各位点效率的一致性。

本研究对多重 PCR 的反应条件进行了优化,除了在引物设计上要求严格外,退火温度、退火时间、延伸温度和延伸时间与单重 PCR 相比都做了调整。在退火条件上,实验通过设定退火的温度梯度,找到每组引物的最佳退火温度,并选择退火时间 90 s 来保证所有的引物充分地结合到模板上;由于 STR 短串联重复序

列的特点,在延伸过程中很容易“起泡”而导致延伸效果不理想,所以实验中适当降低延伸温度至 68℃,并增加延伸时间至 90 s 来确保延伸的效果。然而,即使各位点的工作浓度、反应条件一致,但 PCR 扩增的效率并不一致(图 4,5)。这可能是由几个原因导致的:各特异性引物与模板的配对效率存在差异;多重 PCR 体系中存在引物搭配、竞争等因素,会导致某种引物的实际工作浓度小于理论值;或与位点自身序列及产物长度相关。可以通过进一步调整位点特异性引物浓度来达到较均一的多重 PCR 扩增结果。

由于通用引物可以与设计的每个特异性引物搭配,当位点多、样本多时易产生污染。因此本实验设计了两种不同的通用引物(U1,U2),随后的特异性引物设计也分成两组,一组与 U1 搭配,另一组与 U2 搭配。这样可以有效地降低产生污染的风险。

本研究建立的分型方案高效、准确,且节省了大量实验成本。使用通用引物与特异性引物相结合来完成 STR 多重 PCR,使得通用荧光引物在扩增任何 STR 位点时都可以重复使用,节省了荧光修饰成本,因此可应用于大规模 STR 位点的基因分型。举例来说,若每个位点有 100 个样本,按通用引物与特异性引物为 10:1 的工作浓度比计算,合成 5 OD 的通用荧光引物,可以完成 250 个 STR 位点的分型。而如果用传统的特异性荧光引物方法,每个位点都要合成荧光引物,250 个位点的分型则需要花费相对通用荧光引物方案近 3 倍的实验成本。

总体来说,利用该方案可以做到高通量、准确、特异地检测 STR 位点分型结果,同时节省了大量的成本,其应用前景将会非常广阔。

参 考 文 献

- [1] Edwards A L, Civitello A. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet*, 1991, **49**(4): 746 ~ 752.
- [2] 陈雪玲,袁育康,黄辰. 短串联重复序列的研究进展. 医学综述, 2002, **8**: 72 ~ 74.
- [3] 马威,张亮,李岩等. 人类短串联重复序列(STR)及其研究进展. 大连医科大学学报, 2007, **29**: 78 ~ 81.
- [4] 李瑞生,陈振文,张嘉保等. 近交系大鼠 STR 复合扩增 DNA 多态性的分析. 动物医学进展, 2004, **25**: 107 ~ 109.
- [5] 邹浪萍,杨燕,褚嘉佑. 多重 PCR 检测 CSF1PO, TPOX 和 TH01 基因座在中国汉族中的多态性. 遗传学报, 1998, **25**: 199 ~ 204.
- [6] 邹浪萍,申滨,杨燕. 云南十个少数民族的 F13A01、FESFPS 和 vWA 位点遗传多态分析. 遗传学报, 2001, **28**: 895 ~ 902.
- [7] Oetting W S, Lee H K, Flanders D J, et al. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics*, 1995, **30**: 450 ~ 458.
- [8] Missiaggia A, Grattapaglia D. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. *Genetics and Molecular Research*, 2006, **5**(1): 72 ~ 78.
- [9] Neilan B A, Wilton A N, Jacobs D. A universal procedure for primer labelling of amplicons. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 2 938 ~ 2 939.
- [10] Guo D C, Milewicz D M. Methodology for using a universal primer to label amplified DNA segments for molecular analysis. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**: 2 079 ~ 2 083.