

基因群体遗传多态性检测方法的比较研究

王兴平¹, 罗仍卓¹, 许尚忠^{2*}, 高雪², 李俊雅², 任红艳², 除金宝²

(1. 新乡医学院生命科学技术系, 河南新乡 453003; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094)

摘要 [目的]寻找基因的群体遗传多态性检测的理想方法,为基因突变的群体检测提供方法指导。[方法]以104头中国荷斯坦牛群为研究对象,扩增了牛 *TLR4* 基因 243 bp 特异性片段,分别采用 SSCP 和创造酶切位点的 RFLP(CRS-RFLP)方法检测了扩增片段的第 27 bp 处 C→T 的突变,并对其方法进行了比较分析。[结果]结果表明,在 104 头个体的扩增片段中,SSCP 未能检测出多态性,而 CRS-RFLP 方法检测出了多态性。[结论]在不能直接采用 RFLP 方法的情况下,与 SSCP 相比,创造酶切位点 RFLP(CRS-RFLP)方法为群体多态性检测的理想选择。

关键词 牛; *TLR4*; 创造酶切位点 RFLP

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)26-11236-02

Comparative Study on Detecting Methods for the Genetic Polymorphism of Gene in Population

WANG Xing-ping et al (Department of Life Sciences & Technology, Xinxiang Medicine University, Xinxiang, Henan 453003)

Abstract [Objective] This experiment was conducted to search the optimal methods for detecting gene polymorphism in populations and to provide guidance for population detection of gene mutation. [Method] 243 bp fragments of *TLR4* gene for 104 Chinese Holstein were amplified by polymerase chain reaction, in which it had a mutation in the 27th base. The mutation was detected using Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) created restriction site combined restriction fragment polymorphism (RCS-RFLP) respectively. The advantages and disadvantages of the two methods were analyzed. [Result] The results showed that the mutation in this study could be detected easily and precisely by CRS-RFLP, but it could not be detected by SSCP in any condition. [Conclusion] Compared with SSCP, CRS-RFLP was the optimal method for gene polymorphism in populations.

Key words Bovine; *TLR4*; CRS-RFLP

在长期的进化过程中,基因会产生多种变异,造成 DNA 多态性,这种多态性可以通过分子遗传标记方法来检测。基因的群体遗传多态性是近年来国内研究的热点,它在物种的遗传变异、生物进化、种系发生及演变、遗传资源的评价、与生产性能的关联研究以及标记辅助选择等方面有着重要的作用。目前遗传标记的方法很多,但是各自都有其优缺点。创造酶切位点的限制性片段长度多态检测技术(CRS-RFLP)是一种应用引物碱基错配技术结合单碱基突变位点及其近旁序列而设计的一种检测单碱基突变型的简便、快捷且有效的手段^[1]。笔者通过对牛 *TLR4* 基因多态性的研究,比较分析了创造酶切位点 CRS-RFLP 法和 SSCP、RFLP 方法在检测群体遗传多态性上的优缺点,以期对基因突变的群体检测提供指导。

1 材料与方法

1.1 血样采集及基因组 DNA 提取 颈静脉采取 104 头中国荷斯坦奶牛的血液,每头 15 ml,ACD 抗凝, -20 °C 保存。用酚-氯仿抽提法从血样中提取基因组 DNA,0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的纯度,用紫外分光光度计法估计其含量,稀释 DNA 样品至 50 ng/μl。

1.2 引物设计 根据 GenBank 上公布的牛 *TLR4* 基因的 mRNA 序列 (AY634630) 和相关文献报道^[2],设计了 2 对引物,扩增相同的基因片段,且已知在其扩增片段的 27 bp 处存在 C→T 的突变。第 1 对引物的扩增产物用于 SSCP 检测,序列为:上游序列为 5'-CAAAAAGTATGGCAGGGCGAGAGCA-3',下游序列为 5'-ATGAAGTGCTGGACACCACGACAAT-3';

第 2 对引物的扩增产物用于 CRS-RFLP 检测,在设计上游引物时,在 3'端倒数第 2 个碱基处引入 C→A 的碱基错配,使之与扩增的片段的突变位点结合产生 *Hinf* I 酶切位点(G[^]ANTC),则可借助 RFLP 方法来检测群体中的突变。其上游引物序列为 5'-CAAAAAGTATGGCAGGGCGAGAGAA-3',下游引物与第 1 对引物的下游序列相同。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.3 PCR 扩增 2 对引物的 PCR 反应体系为:总体积 20 μl,其中 10 × buffer (含 20 μmol/L Mg²⁺) 2.0 μl,10 μmol/L dNTPs 0.4 μl,10 μmol/L 上、下游引物各 0.4 μl,模板 DNA 50 ng,2 U *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μl,超纯水 15.55 μl。PCR 反应条件:预变性 95 °C 5 min;然后变性 94 °C 30 s,退火 57 °C 30 s,延伸 72 °C 30 s,36 个循环;最后延伸 10 min。

1.4 PCR 产物酶切及基因分型

1.4.1 第 1 对引物扩增产物的多态性检测。取第 1 对引物的 PCR 产物 8 μl,与 2 μl 的变性缓冲液混合,95 °C 变性 10 min,迅速放到冰上冷却 5 min,使其变性为单链,分别上样于 10%、12% 和 14% 聚丙烯酰胺 (29:1) 凝胶以及 10%、12% 和 14% 聚丙烯酰胺 (39:1) 凝胶,分别以 120、150、200 V,7~10 h,采用以上条件的各种组合进行电泳。照像,统计基因型。

1.4.2 第 2 对引物扩增产物酶切分型。第 2 对引物扩增产物则借助于 RFLP 方法。酶切总体积 10 μl:PCR 产物 4 μl,加 *Hinf* I 内切酶 0.5 μl,10 × Buffer 1 μl,超纯水 4.5 μl,37 °C 过夜消化,12% 的聚丙烯酰胺 (29:1) 凝胶电泳,200 V,2.5 h。照像,统计基因型。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果 以基因组 DNA 为模板,分别采用 2 对引物进行 PCR 扩增,其扩增产物为同一片段,大小均为 243 bp。根据测序可知,其扩增片段的 27 bp 处确实存在 C→T 的突变。

基金项目 国家科技支撑计划 (2006BAD01A10; 2006BAD14B07; 2006BAD04A16)。

作者简介 王兴平 (1978-),男,陕西麟游人,讲师,从事基因表达调控研究。*通讯作者,研究员。

备注 该文作者的 2 单位为并列第一单位。

收稿日期 2008-06-17

2.2 第 1 对引物 PCR 产物的基因分型结果 将第 1 对引物的扩增产物,按照“1.4.1”的方法,分别不同条件的组合下,拟筛选合适的条件来检测扩增片段 27 bp 处存在 C→T 的突变。其电泳结果显示,在全部条件的组合下,都未检测到 104 头中国荷斯坦牛个体的扩增片段的多态性(图 1)。

2.3 第 2 对引物 PCR 产物的基因分型结果 将第 2 对引物的扩增产物,按照“1.4.2”的方法,其扩增产物的 *Hinf* I 酶切如图 2 所示。在 104 头中国荷斯坦牛个体的扩增片段中,出现 3 种带型,命名为 AA、AB 和 BB。根据电泳图和测序结果综合分析,这 3 种带型是由于 27 bp 处的 C→T 突变所引起的,其对应的片段的大小分别为 243 bp;243 bp/209 bp/24 bp 和 209 bp/24 bp,其中,由于 24 bp 片断太小,在电泳时跑出胶外,故在酶切图谱上没有体现出来。

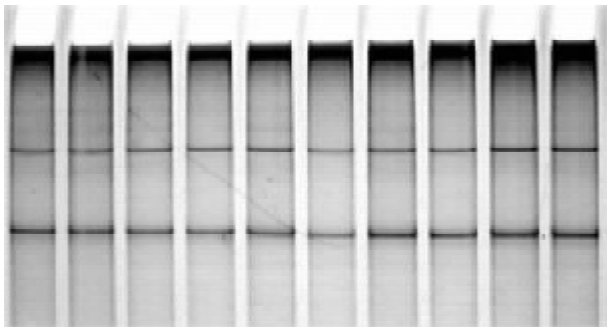


图 1 *TLR4* 基因的 SSCP 结果

Fig. 1 SSCP result of *TLR4* gene

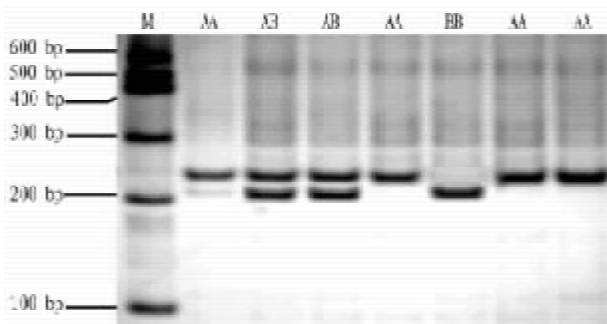


图 2 *TLR4* 基因的创造酶切位点 RFLP 结果

Fig. 2 Result of polymorphism detection for *TLR4* gene by CRS-RFLP

3 结论与讨论

目前,基因的群体遗传多态性检测的方法很多,如 RFLP,SSCP,CRS-RFLP 和 AS-PCR 等,但各自均有其优缺点。如 RFLP 检测受到限制性内切酶的限制,该试验的研究中,采用第 1 对引物扩增的 *TLR4* 基因的 243 bp 的产物,但是没有合适的限制性内切酶来检测第 27 bp 处存在 C→T 的突变,所以采用 RFLP 方法进行群体检测就无法实现。为了突破

限制性内切酶的限制,我们试图采用 SSCP 方法。SSCP 即单链构象多态性,是由于碱基突变而引起 DNA 单链的构象发生变化,在电泳时产生多态。但是,SSCP 检测方法受凝胶的浓度、凝胶中聚丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺的比例、电压和电泳时间等很多因素的影响。为了克服这些影响因素,在该试验中,我们设计了不同的条件组合,即采用 10%、12% 和 14% 聚丙烯酰胺 (29:1) 凝胶以及 10%、12% 和 14% 聚丙烯酰胺 (39:1) 凝胶,分别以 120、150、200 V 电泳 7~10 h 来组合,检测群体中该位点的突变情况。但是,所有组合的电泳结果显示,没有多态图谱产生。因此,用 SSCP 方法检测该基因位点的突变以失败而告终。

CRS-RFLP 是一种应用引物碱基错配技术结合单碱基突变位点及其近旁序列而设计的一种检测单碱基突变型的简捷有效的手段^[2-3]。通过引入错配碱基的方法使引物 3' 端邻近的序列在 PCR 扩增后与单碱基突变位点的一种基因型配合成一个酶切位点,从而使 PCR 产物可用类似于 PCR-RFLP 的方法进行基因型的鉴定^[1]。该试验中,我们在设计第 2 对引物的上游引物时,在上游序列的 3' 端倒数第 2 个碱基处引入 C→A 的碱基错配,使之与扩增的片段的突变位点结合产生 *Hinf* I 酶切位点 (G^{*}ANTC),则可借助 RFLP 方法来检测群体中的突变。结果显示,该方法为检测该位点群体遗传多态的最佳方法。这一基因型检测方法由于人为地引入错配碱基,与正常引物的相比,其扩增难度相对增大。其关键在于引物设计时错配碱基的引入,因为其引物只能在突变点的近旁序列进行设计,而且扩增片段大小也需要得到控制,一般以 100~300 bp 为宜。引物引入错配碱基的数量及类型有选择的余地。根据笔者的经验,在选择时需要遵循一定的条件,即所选择的碱基错配类型和数量在不影响扩增效率的前提下,尽可能地选择比较便宜的限制性内切酶进行检测的错配碱基。

综合以上,在普通 RFLP 无法进行群体遗传检测的情况下,与 SSCP 相比,CRS-RFLP 方法稳定性高,结果准确,又可以选择价格较低的限制性内切酶,以节省试验费用。因此,笔者认为,CRS-RFLP 是一种多态性检测的较为理想的方法,可用于大规模群体的基因遗传多态检测。

参考文献

- [1] KWOK S, KELLOGG D E, MCKINNEY N, et al. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 18: 999-1005.
- [2] 王兴平, 许尚忠, 马腾壑, 等. 牛 *TLR4* 基因的遗传多态性与乳房炎的关联分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2007 (2): 120-124.
- [3] 赵春江, 李宁, 邓学梅. 应用创造酶切位点法检测单碱基突变 [J]. *遗传*, 2003, 25 (3): 327-329.