

用任意引物 PCR 进行基因多态性 分析时最佳反应条件的建立*

艾斯卡尔·依米提** 哈木拉提·吾甫尔 伊力哈木江·沙比提

(新疆维吾尔自治区维吾尔医研究所, 乌鲁木齐 830001)

摘要 用任意引物进行基因组指纹分析是检测 DNA 多态性的一种通用方法, 对遗传图谱绘制、系统发育学和种群生物学都很有用。由于任意引物 PCR (AP-PCR) 影响因素很多, 获得理想的指纹扩增图谱比较困难, 有必要寻找一种简单有效的方法建立最佳扩增体系。对 Mg^{2+} 浓度、模板浓度、引物浓度等三个因素进行优化选择 AP-PCR 扩增反应实验研究。实验结果表明: AP-PCR 反应的最佳反应条件为 2 mmol/L $MgCl_2$, 50 ng 的 DNA 模板及 0.3 μ mol/L 的引物浓度, 在上述条件下获得的 AP-PCR 产物最丰富, 条带清晰。

关键词 任意引物 PCR, 多态性, 最适扩增条件

学科分类号 O781

以基因组 DNA 为模板用任意引物 (arbitrarily primer) 进行 PCR 研究基因多态性及基因突变分析已成为生命科学日常工作的重要内容之一^[1]。这种方法是用随机选择的引物在一定反应条件下产生 DNA 指纹, 反应条件只要求引物能与起始 DNA 配对, 而不管此时引物和模板的配对是否完全。有些引物最初的 DNA 合成发生在两条相对的 DNA 链上, 其中最有效的那些反应在扩增过程中互相竞争而产生指纹。但用 PCR 产生大量的产物并非易事, 有时未找到最佳扩增条件导致产生许多不确定的、不需要的产物, 有时甚至没有目的产物。其中, Mg^{2+} 浓度、DNA 模板浓度、引物浓度等条件尤为重要。

AP-PCR 扩增产物质量和产物的量在研究人类基因多态性分析中至关重要。本文为搞清 Mg^{2+} 、DNA 样品浓度、引物浓度对 AP-PCR 反应体系产生的影响, 保证电泳分析的准确度, 选择了 20 种随机引物中能产生最佳指纹的两种单引物并配对, 以此对 AP-PCR 扩增条件进行了优化研究, 并且指出 20 种 10 个碱基引物单独扩增时的指纹条带不如配对扩增时的那么丰富。

1 材料与方法

1.1 DNA 样品收集

严格按照 WHO 诊断标准收集新疆和田地区的肿瘤病人 50 例及正常人群 50 例, 血液样品 7 mL,

按照改良以后的 Blin 和 Stafford 方法^[2]抽提总 DNA, 用超纯水溶解样品 DNA, 并测 260 nm 处 A 值, 然后定量成 100 mg/L, 4℃保存待用, 并作为本次实验的样品。

1.2 试剂与仪器

20 种随机引物 (RAPD primer), 脱氧核苷三磷酸 (dNTP) 均为 Promega 产品。Taq DNA 聚合酶 (4 U/ μ L), PCR 扩增缓冲液, $MgCl_2$ 为 MBI 产品。PCR 热循环仪 Perkin Elmer 公司, (Gene Amp PCR System 9700 型), 紫外光度仪 (Amersham Pharmacia Biotech 公司, Gene QuantTM II RNA/DNA Calculator 型), ALLEGRA64RTM 台式高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司)。垂直电泳系统 (Hoefer SE410 Series Amersham Pharmacia 公司产品), 一次性成像系统 (美国 Polaroid 公司产品)。

1.3 引物设计

按照文献 [3] 选取了 20 种 10 个碱基随机引物。对上述样品进行任意引物 PCR。最后筛选出了最适本实验条件的两种引物, 其序列为 S1: TGCTCTGCCCC, S2: CTGCTGGGAC; 并配对, 用于扩增。

* 国家自然科学基金资助项目 (39960085)。

** 通讯联系人。

Tel: 0991-2562589, E-mail: askaryimit@hotmail.com

收稿日期: 2000-08-21, 接受日期: 2000-12-11

1.4 PCR 扩增

0.02 ml 的基因扩增体系含 100 mmol/L KCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L EDTA, 0.5% NP-40、200 μ mol/L dNTP, 1 U/ μ l Taq DNA 聚合酶. Mg^{2+} 浓度梯度为: 1 mmol/L $MgCl_2$ 、1.5 mmol/L $MgCl_2$ 、2 mmol/L $MgCl_2$ 、2.5 mmol/L $MgCl_2$. DNA 样品浓度梯度为: 50 ng、100 ng、200 ng. 引物浓度梯度为: 0 μ mol/L、0.1 μ mol/L、0.2 μ mol/L、0.3 μ mol/L、0.4 μ mol/L. 按上述各标准准备好扩增成分后, 500 g 离心 10 s 左右, 然后按 95 $^{\circ}C$ 60 s, 40 $^{\circ}C$ 60 s, 72 $^{\circ}C$ 120 s 顺序反复循环 40 次, 72 $^{\circ}C$ 10 min.

1.5 垂直电泳

取上述扩增产物 10 μ l 进行 12% 的非变性聚丙烯

酰胺凝胶电泳. 电泳时间为 80 V/cm, 7 h 左右. 电泳后溴化乙锭染色 20 min 并用 Polaroid 一次性成像系统拍照.

2 结 果

以基因组 DNA 为模板进行 3 因素 34 水平 AP-PCR 优化实验的结果见图 1. 从图 1 可见, 在正常组中泳道 3、4、7、8 的电泳条带较丰富、明亮清晰且指纹条带最多, 泳道 1、2、11、12 显示的电泳条带清晰但指纹带较少, 泳道 5、6、9、10 没有条带显示或条带极少. 肿瘤样品组 15、16、19、20 泳道的条带清晰、明亮, 其中 15、16 为最理想, 泳道 13、14、17、18、21、22、23、24 没有出现 DNA 指纹条带, 产量很低, 这与文献 [2] 所得结果相近.

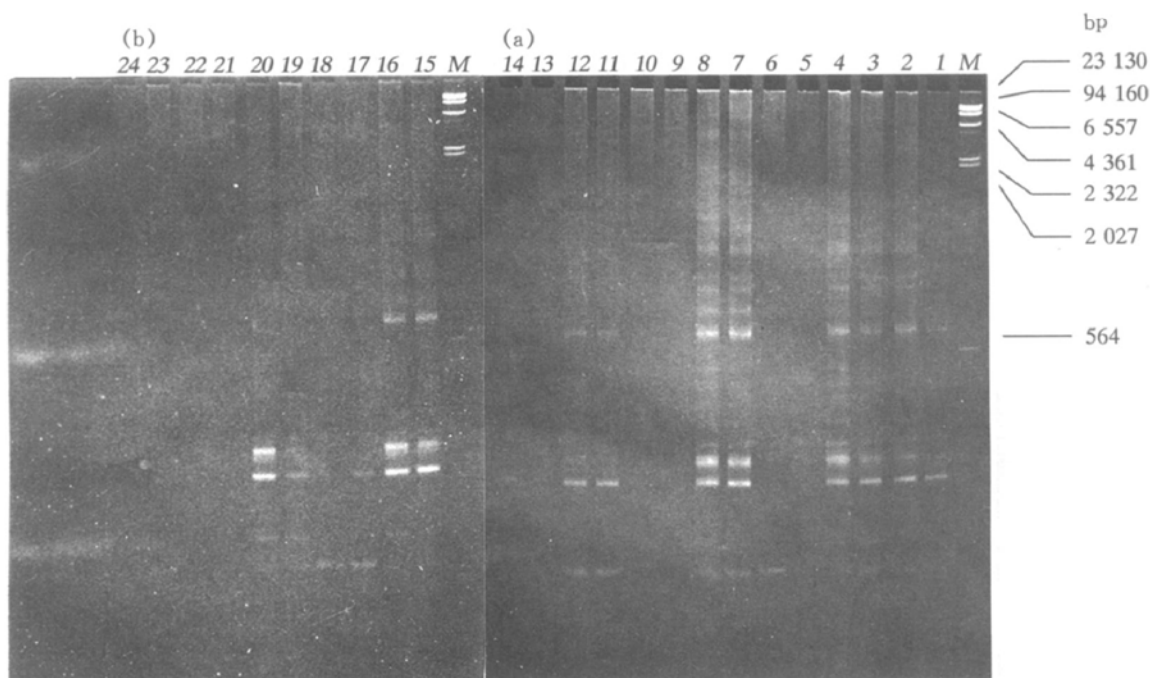


Fig. 1 Effect of DNA and $MgCl_2$ concentration on efficiency of AP-PCR

(a) normal group; (b) cancer group. M: λ DNA/*Hind* III markers. 1, 13: 50 ng DNA, 1.0 mmol/L $MgCl_2$; 2, 14: 50 ng DNA, 1.5 mmol/L $MgCl_2$; 3, 15: 50 ng DNA, 2.0 mmol/L $MgCl_2$; 4, 16: 50 ng DNA, 2.5 mmol/L $MgCl_2$; 5, 17: 100 ng DNA, 1.0 mmol/L $MgCl_2$; 6, 18: 100 ng DNA, 1.5 mmol/L $MgCl_2$; 7, 19: 100 ng DNA, 2.0 mmol/L $MgCl_2$; 8, 20: 100 ng DNA, 2.5 mmol/L $MgCl_2$; 9, 21: 200 ng DNA, 1.0 mmol/L $MgCl_2$; 10, 22: 200 ng DNA, 1.5 mmol/L $MgCl_2$; 11, 23: 200 ng DNA, 2.0 mmol/L $MgCl_2$; 12, 24: 200 ng DNA, 2.5 mmol/L $MgCl_2$.

在其他 PCR 条件相同时 (200 μ mol/L dNTP、1 U/ μ l Taq DNA 聚合酶、2 mmol/L Mg^{2+} 、50 ng 的 DNA) 对引物浓度进行了梯度最佳实验研究. 结果, 从图 2 可见, 正常组与肿瘤组中泳道 1、7

未出现 DNA 指纹条带 (加水阴性对照组), 2、3、4、5、8、9、10、11 泳道都出现了 DNA 指纹条带, 但以 4 和 10 为最理想, 其条带丰富、清晰.

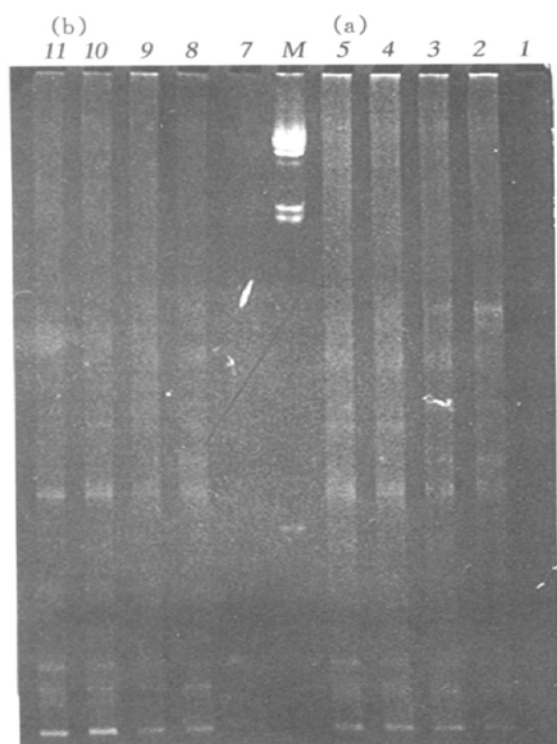


Fig. 2 Effect of arbitrarily primers concentration on efficiency of AP-PCR

(a) normal group; (b) cancer group. M: λ DNA/*Hind* III markers. 1: Water; 2, 8: 0.1 μ mol/L; 3, 9: 0.2 μ mol/L; 4, 10: 0.3 μ mol/L; 5, 11: 0.4 μ mol/L; 7: 0 μ mol/L (primer).

3 讨 论

优化 AP-PCR 反应条件, 需要解决的首要问题是如何选择确定因素和水平. Welsh 等^[4,5] 建议, 对于哺乳动物 DNA, 在每 20 μ l 反应体积中用 5~50 ng DNA 通常能获得最好的指纹, 引物的最佳浓度必须根据经验决定, 对于大多数 10 碱基的引物, 最佳浓度大约为 0.4 μ mol/L. 在一定范围内优化上述条件是十分必要的, 但由于这些因素之间存在着较强的交互作用, 只要具体问题具体分析, 可以只对较少的因素进行优化而获得理想的扩增效果.

在本研究中, 考虑到 a. DNA 中可能混有蛋白酶、核酸酶、Taq DNA 聚合酶抑制剂等. 此外, 模板浓度直接影响扩增产物的再现性、特异性和产量, 过量的 DNA 模板会增加错配的机会, 从而增加非特异性的程度. 如果起始模板太少, 扩增高分子量、低拷贝数的靶序列时再现性不好, 常常检测不到 PCR 产物. 需要优化起始模板浓度以达到要获得的 AP-PCR 产物的丰富性和清晰性; b. Mg^{2+} 浓度是一个最容易控制的参数, 因为所有的浓度变

化都可以在不同的反应管中进行. 此外, Mg^{2+} 是 Taq DNA 聚合酶依赖性分子, Mg^{2+} 浓度不仅影响酶的活性和真实性, 而且还影响引物的退火、模板和 PCR 产物的解链温度、产物的特异性和引物二聚体的形成等; c. PCR 反应中若引物浓度过低, 产物量会降低, 引物浓度过高会造成错误引导的非特异产物合成, 还会增加引物二聚体的形成, 从而导致靶序列的扩增量降低; 从以上几点考虑我们设计了两组实验, 第一组实验参数为 DNA 浓度和 Mg^{2+} 浓度梯度, 第二组实验参数为引物浓度梯度. 通过正常人组和肿瘤病人 DNA 样品交叉式浓度梯度实验, 掌握了适合于本实验目的最佳扩增条件并得出结论为:

第一组非变性聚丙烯酰胺凝胶图中 50 ng DNA、2.0 mmol/L $MgCl_2$ 时扩增指纹条带最为丰富、清晰. 第二组图 2 中引物浓度为 0.3 μ mol/L 时扩增条带最为理想. DNA 浓度为 100 ng (2.0 mmol/L $MgCl_2$) 时虽然条带比较明显, 可是存在着拖带现象, 这使我们无法分别有些彼此距离较近的条带, 200 ng (2.0 mmol/L $MgCl_2$) 时条带非常模糊, 无法看清或没有出现条带. 这表明样品浓度过高时, 导致错配, 使得 PCR 反应非特异性增强, 影响了正常产物的形成, Mg^{2+} 浓度为 1.0 mmol/L、1.5 mmol/L 时扩增条带模糊不清, 这说明 1.0 mmol/L 及 1.5 mmol/L 的 $MgCl_2$ 量不足于提高 Taq DNA 聚合酶活性, 影响了反应真实性, 从而使反应产量降低. 2.5 mmol/L 的 $MgCl_2$ 量过高, 影响 Taq DNA 聚合酶活性, 导致拖带现象. 引物浓度为 0.1 μ mol/L、0.2 μ mol/L、0.4 μ mol/L 的扩增条带大致相同, 0.3 μ mol/L 的样品条带较为清晰, 最适合于 DNA 指纹条带的再现.

总之, 通过本次实验研究指出 Mg^{2+} 及 DNA 浓度对 AP-PCR 反应系统产生的影响最明显. 引物浓度在一定范围内对 PCR 反应系统产生的影响差异不象前两组那样明显. 而且, 最适实验设计用于与 AP-PCR 有关的样品处理方法研究可以避免盲目性, 获得事半功倍的效果.

参 考 文 献

- 1 Collins FS, Patrinos A, Jordon E, *et al.* New goals for the U. S. human genome project: 1998 ~ 2003. *Science*, 1998, **282** (5389): 682~ 689
- 2 Blin N, Stafford D W. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 1976,

- 3: 2303~ 2304
- 3 Williams J G K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**: 6531~ 6535
- 4 Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**: 7213~ 7218
- 5 McClelland M, Arensdorf H, Cheng R, *et al.* Arbitrarily primed PCR fingerprints resolved on SSCP gels. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**: 1770~ 1771

Construction of the Optimum Amplified Condition for Genomic Polymorphisms Analysis by Arbitrarily Primer (AP) -PCR*

Askar Yimit**, Halmurat Upur, Ilhamjan Sabit

(Institute of Xinjiang Uighur Medicine, Urumqi 830001, China)

Abstract Polymorphisms in genomic fingerprints generated by arbitrarily primed PCR (AP-PCR) can distinguish between slightly divergent strains of any organism. Sequence polymorphisms detected by genomic fingerprinting can be mapped genetically or used in phylogenetic and population studies, but too many factors affect the AP-PCR result. Sometimes, it is difficult to obtain a perfect genomic fingerprints are difficult. So an optimization project with minimum times of test is needed. The optimization of the amplified conditions included concentration of Mg^{2+} , concentration of DNA, concentration of primers were reported. The results show that the optimum amplified condition of AP-PCR are 2 mmol/L $MgCl_2$, 50 ng of DNA and 0.3 μ mol/L of primers. Under these conditions the AP-PCR productions are richness and the most clear.

Key words AP-PCR, polymorphisms, optimum amplified condition

* This work was supported by a grant from National Natural Sciences Foundation of China (39960085).

** Corresponding author. Tel: 86-991-2562589, E-mail: askaryimit@hotmail.com

Received: August 21, 2000 Accepted: December 11, 2000