

毛细管电泳-短小串联重复序列多态性方法 及对人凝血因子 XIII^B STR 位点的检测*

裴黎¹⁾ 邓华¹⁾ 张丽君²⁾ 姜成涛¹⁾ 赵兴春¹⁾ 常彩琴¹⁾ 王俭^{1)**}

(¹⁾公安部物证鉴定中心, 北京 100038; ²⁾天津市口腔医院, 天津 300000)

摘要 为开展高效毛细管电泳技术对 STR 位点的检测, 通过建立毛细管电泳-短小串联重复序列 (STRs) 多态性的检测方法, 实现了利用毛细管电泳快速检测人凝血因子 XIII^B (F13B) STR 位点 PCR 产物的长度多态性, 结果 F13B-STR 基因型分型正确, 图谱清晰. 方法的建立可简化常规多态性检测, 实现快速、准确分离.

关键词 短小串联重复序列 (STR), F13B 基因, 毛细管电泳

学科分类号 D919.2

对于核酸片段的测序、差异显示以至于点突变的检测是生化分析中的重要技术^[1]. 传统的差异显示和核心片段多态性的检测通常采用平板凝胶电泳方法, 这一方法无论从样品处理、测定时间和检测的灵敏度等诸多方面都存在一些问题: 该方法耗时, 分辨率不高, 无法实现自动化. 如何能够实现快速、简便和准确的基因片段多态性检测一直是人们关注的问题.

短小串联重复序列 (STRs) 作为法医学中个人识别的有力工具已经得到了广泛的应用^[2,3]. 目前, 对于 STR 位点的基因定型方法主要采用聚丙烯酰胺凝胶平板电泳. 毛细管电泳因其高效、自动、分辨率高的优势被广泛应用于 DNA 分析, 如 PCR 产物的分离检测、点突变的检测及测序等^[4-7].

本文通过建立毛细管电泳-短小串联重复序列 (CE-STRs) 多态性方法实现了快速、简便和准确的差异显示. 利用该方法重点检测了人凝血因子 XIII^B (F13B)^[8] 基因中 STR 位点的多态性^[9]. F13B 基因位于第一条染色体的 q31~q32.1 位置上, 其中存在核心序列为 [TTTA]_n 的 STR 位点, 常见等位基因为 8、9、10, 长度依次为 177 bp、181 bp、185 bp, 即各等位基因之间的碱基数相差 4 个或 4 的整倍数. F13B 是近年来被应用于法医个人识别的 STR 位点, 本实验利用毛细管凝胶电泳法来分离检测 F13B 位点的扩增产物, 以探索毛细管电泳在法医领域的应用.

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

PCR 扩增反应是在 PE-480 型 PCR 扩增仪上完

成的 (CA, USA); 毛细管电泳分离是在 Beckman P/ACE 5000 和 Beckman MDQ (Fullerton, CA, USA) 上完成; 毛细管电泳分离所采用的聚丙烯酰胺凝胶柱 (50~60 cm × 50 μm) 购自 Beckman 公司 (Fullerton, CA, USA).

PCR 反应中所使用的 dNTP, TaqDNA 聚合酶及引物购自上海生工生物工程公司, 毛细管电泳中使用的 100 mmol/L Tris-Boric (pH 8.3, 含 7 mol/L 尿素) 缓冲液及 40~60 bp 的 polyA Ladder 购自 Beckman 公司 (Fullerton, CA, USA), DNA 标准品 pBR322/MSPI (0.5 g/L) 和 pGEM-7Zf/Hae III (0.5 mg/L) 购自华美公司.

1.2 F13B 位点的 PCR 扩增反应

扩增引物: 5'-TGAGGTGGTGTACTACCA-TA-3', 5'-GATCATGCCATTGCACTCTA-3'.

PCR 反应以 25 μl 体系进行: 10 ng DNA, 0.2 μmol/L 的每种引物, 200 μmol/L 的每种 dNTP, 1.5 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L KCl, 0.01% 的白明胶, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 0.5 U Taq DNA 聚合酶, 于 480 型扩增仪中进行. 循环参数: 96℃ 2 min 后 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 70℃ 1.5 min. 10 个循环: 90℃ 1 min, 60℃ 1 min, 70℃ 1.5 min, 20 个循环; 60℃ 30 min, 4℃ 或 25℃ 保温.

1.3 毛细管电泳方法

毛细管电泳的运行电压设置在 300 V/cm 左

* 公安部重点课题基金资助 (998221403).

** 通讯联系人.

Tel: 010-63264488-476, E-mail: pl128@sina.com

收稿日期: 2001-09-24, 接受日期: 2001-11-23

右, 电极的极性从负极到正极, 紫外检测波长为 260 nm. 新的凝胶柱子用缓冲液平衡一段时间, 直至基线平稳. 每次进样前须用缓冲液平衡几分钟, 以保证基线的平稳. 采用电动进样, 样品中 DNA 浓度为 30 mg/L 左右, 柱温控制在 30 °C.

2 结果和讨论

2.1 CE-STR 方法的建立

2.1.1 电场强度对分离的影响: 依次改变电场强度为 80~ 480 V/cm, 观察 DNA 片段的迁移速度, 结果发现在不同的电压条件下, 各片段的迁移行为差别不大, 这与文献 [10] 报道的结果相吻合. 结合焦耳热效应, 在实验中采用较低的分电压值, 虽然分离时间有一定的增长, 但由于焦耳热效应被较好地控制, 分离峰峰宽变窄, 可得到较高的分离柱效. 在凝胶柱比较短时, 采取这种措施可使不能分离的片段得以分离. 图 1 为 DNA 标准物的分离图谱.

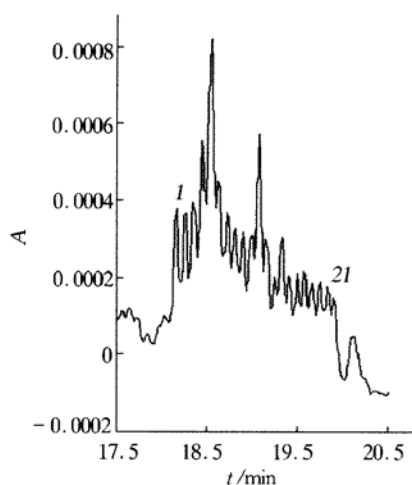


Fig. 1 Electropherogram of 40~ 60 ladder

effective length: 47 cm; injection: 10 kV × 1 s; electric field strength: 250 V/cm. 1: 40 bp; 21: 60 bp.

2.1.2 进样方式对分离的影响: 由于凝胶电泳只能采取电动进样, 在进样时不可避免地出现进样歧视的问题, 因此样品中的盐浓度将对进样和电泳, 特别是进样有很大影响. 我们所做的样品为 PCR 扩增产物, 其中所含的盐浓度是很高的, 因此样品未脱盐时, 样品峰无法显示^[11]. 现在所用的脱盐方法主要是乙醇或异丙醇沉淀法和使用 PCR 产物的纯化柱. 我们采用了异丙醇沉淀法, 效果比较理想. 具体方法是: 用 2.5 倍体积的无水异丙醇和 PCR 扩增产物混合, 在 4 °C 冰箱放置 30 min 以上,

10 000 g 离心 15 min, 取沉淀, 用 75% 的乙醇洗两遍, 50 °C 烘箱干燥, 最后用纯水溶解.

2.1.3 尿素浓度对分离的影响: DNA 在凝胶电泳中, 其迁移速度与其自身在溶液中的空间构象是有关的^[12]. 根据 Han 等^[13]的结果, 溶液中尿素浓度达到 7 mol/L 时, DNA 在溶液中完全变性, 二级结构不再存在, 这时, DNA 的迁移速度只与其长度有关. 因此, 在要确定 DNA 片段长度的实验中, 尿素的浓度要达到 7 mol/L.

2.1.4 样品浓度对分离的影响: 对于凝胶电泳, 进样量正比于进样电压与进样时间的乘积, 而迁移组分的区带展宽则直接与该组分进样的区带展宽相关, 与其他操作条件关系不大^[10]. 实际操作中, 我们认为样品浓度在 40 mg/L, 毛细管长 27 cm 时, 10 kV × 1 s 的进样量是比较合适的.

2.2 建立基因分型的方法

2.2.1 建立标准曲线法: 关于 DNA 在凝胶中的迁移机制已有几种模型^[12], 具体说法还不能确定. 对于同一次电泳, 不同长度的 DNA 片段其迁移时间与其长度是成线性关系的 (此时 DNA 片段完全变性), 这便为定义未知片段的长度提供了依据. 因此, 在未知样品中加入一系列已知长度的 DNA 片段 (标准 DNA), 根据这些片段的长度与迁移时间所作的曲线便能知道未知样品中 DNA 片段的长度. 图 2 为样品和标准 DNA 混合物的分离图谱, 其中 4' 峰为样品峰, 长度为 185 bp.

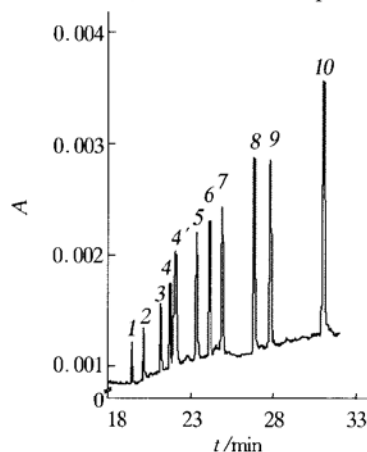


Fig. 2 Electropherogram of the mixture of pGEM7ZEI/Hae III and a sample

effective length: 27 cm; injection: 10 kV × 2; separation voltage: 4 kV. 1: 80 bp; 2: 102 bp; 3: 142 bp; 4: 174 bp; 4': the sample peak.

2.2.2 建立标准图谱法: 对于不同次的电泳, 同一长度的 DNA 片段其迁移时间是不同的. 因此,

为了定义未知片段的长度，每次电泳都要加入标准 DNA 和作标准曲线，这便使第一种方法变得繁琐和浪费。为此，可分离提纯某已知基因型的样品 DNA 片段作为内标，再根据其与其他基因型 DNA 片段同时电泳时的电泳图谱来确定未知样品的基因型。在本实验的具体操作中，由于 F13B 位点的常见等位基因长度是 177 bp, 181 bp 和 185 bp, 于是将 185 bp 的 DNA 片段作为内标，根据其分别与 181 bp 和 177 bp 的分离图谱 (图 3 和图 4) 来知道未知样品的基因型。如图 5 所示，185 片段的峰较前面的峰高出一半，结合图 3 和图 4 的图谱，确定该样品的基因型为 177~ 185。

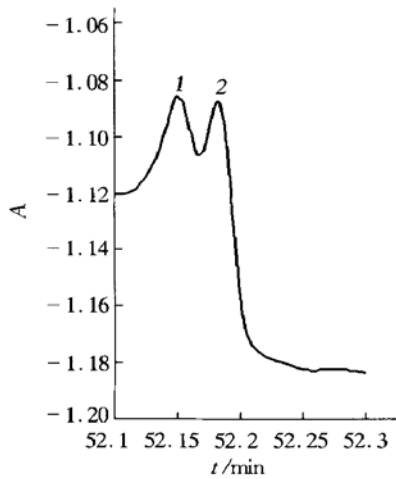


Fig. 3 Electropherogram of a sample

effective length: 50 cm; injection: 10 kV × 2s; separation voltage: 18 kV. 1: 181 bp; 2: 185 bp.

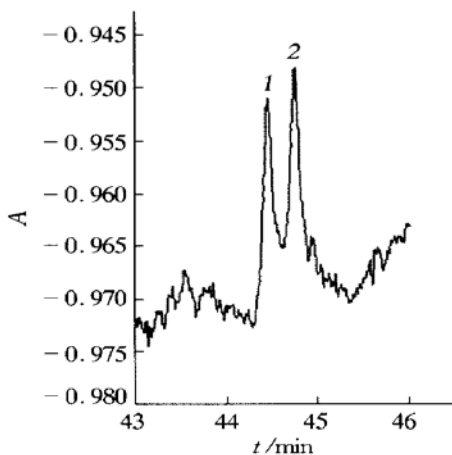


Fig. 4 Electropherogram of a sample

effective length: 50 cm; injection: 10 kV × 2s; separation voltage: 18 kV. 1: 177 bp; 2: 185 bp.

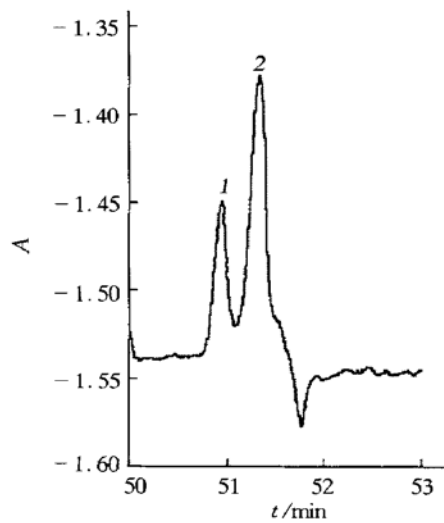


Fig. 5 Electropherogram of the mixture of two different sample

effective length: 50 cm; injection: 10 kV × 2 s; separation voltage: 18 kV. 1: 177 bp; 2: 185 bp.

3 对基因样品中多个位点多态性的检测

随着复合扩增技术的成熟与应用，数个不同的 STR 位点可一次复合扩增，并一次定型。我们应用毛细管电泳技术也能在短时间内一次检测出几个位点，这就大大提高了工作效率。图 6 为一样品的电泳图谱，该样品中包含 13 个 STR 位点的 PCR 复合扩增产物，由于各别位点间的片段长度有交叉，无法完全分开，但已说明利用毛细管电泳能同时检测两个或两个以上的 STR 位点，并可起到筛选最佳位点的目的。

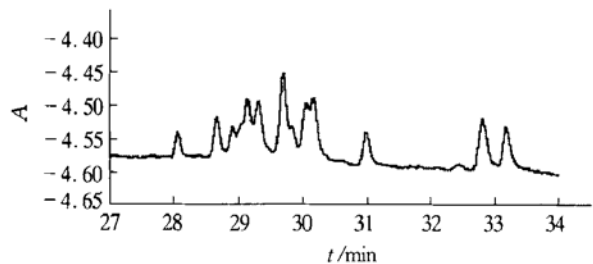


Fig. 6 Electropherogram of a sample

effective length: 50 cm; injection: 10 kV × 2 s; separation voltage: 18 kV.

参 考 文 献

1 林炳承. 后基因时代与毛细管电泳技术. 第四届全国毛细管电泳及相关微分离分析技术学术报告会文集, 广州, 2000

- Lin B C. Proceedings of Fourth National Symposia on Capillary Electrophoresis and Related Microscale Analysis Techniques. Guangzhou, 2000
- 2 Lygo J E, Johnson P E, Holdaway D J, *et al.* The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. *Int J Leg Med*, 1994, **107** (1): 77~ 89
 - 3 Oldroyd N J, Urquart A J, Kimpton C P, *et al.* A highly discriminating octoplex short tandem repeat polymerase chain reaction suitable for human individual identification. *Electrophoresis*, 1995, **16** (2): 334~ 337
 - 4 Larsen L A, Christiansen M, Vuust J, *et al.* High-throughput single-strand conformation polymorphism by automated capillary electrophoresis: robust multiplex analysis and pattern-based identification of allelic variants. *Hum Mutat*, 1999, **13** (4): 318~ 327
 - 5 Mitchelson K R, Cheng J, Kricka L J. The use of capillary electrophoresis for point-mutation screening. *Trends in Biotechnology*, 1997, **15** (11): 448~ 458
 - 6 Righetti P G, Gelfit C. Recent advance in capillary electrophoresis of DNA fragments and PCR products. *Modern Electrophoretic Techniques in Biochemistry*, 1997, **25** (1): 267~ 263
 - 7 Tan H D, Yeung E S. Integrated on-line system for DNA sequencing by capillary electrophoresis: from template to called bases. *Anal Chem*, 1997, **69** (4): 664~ 674
 - 8 Board P G, Coggan M. Polymorphism of the B subunit of human coagulation XIII. *Am J Hum Genet*, 1980, **32** (2): 348
 - 9 Nishimura D Y, Murray J C. A tetranucleotide repeat for the F13B locus. *Nucleic Acid Res*, 1992, **20** (5): 1167
 - 10 许旭, 罗国安, 褚新华, 等. 毛细管凝胶电泳中进样条件对进样量和分离的影响. *科学通报*, 1994, **39** (18): 1683~ 1687
Xu X, Luo G A, Chu X H, *et al.* *Chinese Science Bulletin*, 1994, **39** (18): 1683~ 1687
 - 11 林炳承, 刁海燕, 宋 昉, 等. 乙肝病毒聚合酶链反应扩增产物的毛细管电泳测定. *分析化学*, 1994, **22** (5): 449~ 452
Lin B C, Diao H Y, Song F, *et al.* *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 1994, **22** (5): 449~ 452
 - 12 Viovy J L, Duke T. DNA electrophoresis in polymer solution: Ogston sieving, reptation and constraint release. *Electrophoresis*, 1993, **14**: 322~ 329
 - 13 Han F, Lin B, Shen Y. Gene diagnosis of phenylketonuria by capillary electrophoresis in a novel nongel sieving polymer solution. *Chromatographia*, 1999, **49**: 179~ 183

PCR Typing of F XIII_B Short Tandem Repeat Polymorphism by Capillary Electrophoresis*

PEI Li¹⁾, DENG Hua¹⁾, ZHANG Li-Jun²⁾, JIANG Cheng-Tao¹⁾,
ZHAO Xing-Chun¹⁾, CHANG Cai-Qin¹⁾, WANG Jian^{1)**}

¹⁾Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security, Beijing 100038, China;

²⁾Tianjin Stomatological Hospital, Tianjin 300000, China)

Abstract The F XIII_B short tandem repeat (STR) alleles, four-base-pair difference in length, could be separated and identified by capillary gel electrophoresis (CGE). The gene types of these alleles were determined by running with them a known-length DNA fragment. This study paved the way for gene typing of STR locus or individual identification by capillary electrophoresis.

Key words short tandem repeat, F XIII_B, capillary electrophoresis

* This work was supported by a grant from the Important Project Foundation of Ministry of Public Security (998221403).

** Corresponding author. Tel: 86-10-63264488-476, E-mail: pl128@sina.com

Received: September 24, 2001 Accepted: November 23, 2001