

DHPLC 与 ABI377 系统的微卫星检测效果比较

王 翀, 李加琪, 凌 飞, 张 豪, 陈瑶生

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:利用猪 SCAU-LL 资源群,根据猪 USDA-MARC2.0 连锁图谱,选取 4 号染色体上微卫星标记 SW1678,用变性高效液相色谱(DHPLC)系统和 ABI377 系统分析了 F_2 代 64 个个体的微卫星多态性,比较了这 2 个分析系统在进行微卫星分型中的效率和利弊.2 个系统检测到 57 个样品的基因型相同,有相同的 2 个样品未检测到产物.另外有 3 个样品,DHPLC 检测出基因型,ABI377 未检测到,有 2 个样品 ABI377 检测出基因型,而 DHPLC 未检测到.2 个系统检测微卫星多态性的相同率达 92.2%,DHPLC 未检出率 6.3%,ABI377 未检出率 7.8%,2 个系统检测的灵敏度和准确度基本接近,但是 DHPLC 的检测成本低于 ABI377 的检测成本.

关键词:猪;微卫星标记;变性高效液相色谱(DHPLC);ABI377

中图分类号:S813.1

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2007)01-0096-04

Comparison of Detecting Microsatellite Polymorphism by Using DHPLC and ABI377

WANG Chong, LI Jia-qi, LING Fei, ZHANG Hao, CHEN Yao-sheng

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract:Based on pig linkage map of USDA-MARC2.0, the SW1678 microsatellite marker on SSC4 was chosen for genotyping 64 F_2 pig samples of the SCAU-LL reference population. The efficiency and deficiency of detecting microsatellite polymorphisms were compared by WAVE[®] nucleotide fragment analysis system (denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC) and ABI377 DNA sequencer. Out of 64 individuals, 57 were detected genotype and 2 were missed by both systems, 3 were only detected by DHPLC, and 2 only by ABI377. The results showed the coincidence of detection was 92.2% for the two systems, while failure in detection was 6.3% for DHPLC and 7.8% for ABI377. The sensitivity and accuracy were similar for both systems, but the testing cost was lower for DHPLC than for ABI377.

Key words:pig; microsatellite marker; denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC); ABI377

近 20 多年来分子生物学技术的飞速发展,越来越多的遗传标记被应用到动、植物遗传群体分析,微卫星 DNA 标记是共显性的遗传标记,具有丰富的多态性、较高的杂合度,以及在整个基因组上分布广泛、均匀、数量充足、特异性强、可重复性好等,特别是分析易于自动化等特性,从而被广泛地应用于动、植物遗传图谱的构建、QTL 定位、群体遗传结构分

析、亲子鉴定、标记辅助选择等.

对于通过 PCR 扩增的微卫星多态性位点的检测有同位素放射自显影、溴化乙锭(EB)显色、荧光染料标记、银染和变性高效液相色谱(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)等技术,荧光标记技术于 20 世纪 80 年代末出现,该方法具有无污染、简单、安全、技术成熟,且一次处理样品较

收稿日期:2006-07-15

作者简介:王 翀(1968—),女,副教授,博士;通讯作者:陈瑶生(1962—),男,教授,博士,E-mail:yschen@scau.edu.cn

基金项目:国家重点基础研究发展计划“973”项目(2004CB117506);国家自然科学基金(30300249);农业部 948 项目(2003-Z91)

大等优点,得到广泛应用^[1-4]. DHPLC 是一种高通量筛选 DNA 序列变异的新技术,最先由美国 Stanford 大学 Oefner 等^[5]于 1995 年报道,美国 Transgenomic 公司采用该原理制造专利化仪器,专利产品为 WAVE® DNA 片段分析系统(WAVE® DNA fragment analysis system). DHPLC 基本原理是应用离子对反向高效液相色谱法:在不变性的温度条件下,检测并分离相对分子质量不同的双链 DNA 分子或分析具有长度多态性的片段,类似 RFLP 分析,也可进行定量 RT-PCR 及微卫星不稳定性测定;在充分变性温度条件下,可以区分单链 DNA 或 RNA 分子,适用于合成寡核苷酸探针的纯度分析和质量控制. 随着其技术的成熟和完善将会在微卫星多态性检测中得到广泛的应用.

本研究根据猪 USDA-MARC 2.0 连锁图谱,用猪 4 号染色体上的微卫星标记 SW1678 设计引物,对李加琪等^[6]建立的参考家系 F₂ 代的 64 个个体,用 ABI377 和 DHPLC 系统分别对其 DNA 样本进行微卫星标记多态性分析,以确定 2 个系统在微卫星高通量、大规模检测中的应用效果,为进一步采用微卫星标记进行猪大规模基因组扫描奠定基础.

1 材料与方法

1.1 试验猪群

本研究所用的资源群体(SCAU-LL)由李加琪等^[6]建立,利用选定的微卫星标记对参考家系 F₂ 代的 64 个个体的 DNA 样本进行多态性分析.

1.2 微卫星标记引物

根据猪 USDA-MARC 2.0 连锁图谱,用猪 4 号染色体上的微卫星标记 SW1678,其上、下游引物序列分别为 5'-CAAAATTTTGAGATGGGAGATG-3', 5'-ACTTGTGCTAATCATTTTATGTCTG-3',并标记 FAM 荧光,网上公布的微卫星扩增产物片段长度在 111 ~ 119 bp 之间,所用的引物由上海基康生物有限公司合成并标记荧光.

1.3 ABI377 的微卫星检测

PCR 反应总体积 15 μ L,含 DNA 模板约 40 ng, 10 $\times$ PCR buffer(含 Mg²⁺),分别从 Taq 酶用量、引物浓度、退火温度等几个方面利用梯度 PCR 仪摸索最优的 PCR 反应体系,最后确定 PCR 反应条件.

用灭菌的去离子水将 PCR 扩增产物稀释 5 ~ 10 倍,取 1 μ L 稀释产物,加入含 TEMERA(发红色荧光)内标的上样缓冲液 1 μ L. 上样前 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min,取出后立即插于冰上,聚丙烯酰胺凝胶预电泳 20 min,然后间隔泳道加样,电泳 3 ~ 5 min,再加上所有的样品,在 ABI377 序列分析仪 GS-Run-36C-2400-

module 下电泳 3 ~ 4 h,收集胶图像. 应用 GENE SCAN™3.0 软件进行数据收集、泳道线校正、校正相对分子质量内标及迁移片段大小测量. 应用 Genotyper™2.5 软件进行基因分型,并根据个体谱信息人工校对基因型.

1.4 DHPLC 的微卫星检测

1.4.1 合成引物的检测 合适的微卫星引物一般选择 20 bp 左右,引物部分降解易引起非特异性扩增,在进行微卫星多态性检测的色谱图上会出现许多杂峰,干扰结果判断. 将引物稀释为 5 pmol/ μ L,取引物 5 μ L,放入 DHPLC 自动进样器,按设定的程序进行引物检测.

1.4.2 WAVE® 核苷酸片段分析系统运行条件 采用 WAVE® 核苷酸片段分析系统对 64 个样本进行基因分型. ① 走空针:上样量为 0 μ L,平衡仪器;② 走 DNA marker DL 2000 针:取 3 μ L DNA marker DL 2000,作为以后定性的依据;③ 上样:取每个样本的 PCR 产物 5 ~ 10 μ L,每个程序运行约 6.9 min.

1.4.3 微卫星基因型定型 依据 DNA marker DL 2000 运行的图形数据,以停留时间(retention time)为自变量(x),Marker 片段大小为依变量(y),根据检测样品的停留时间,用线性回归方程 $y = a + bx$ 确定被检测样品的片段大小,参照系谱资料信息最终定型.

1.5 DHPLC 系统与 ABI377 系统检测微卫星效果比较

采用 4 号染色体上的微卫星标记 SW1678 设计引物,扩增 64 个样品的基因组 DNA,分别在 ABI377 测序仪和 DHPLC 核苷酸片段分析系统上进行基因分型,比较 2 种仪器设备进行微卫星基因分型的优劣,以及 2 种分析方法的相对试验成本.

2 结果与分析

2.1 ABI377 的微卫星检测

应用 ABI377 序列分析仪 GS-Run-36C-2400-module 对个体标记基因型进行分型,图 1 为检测结果示意图,根据所检测片段大小及家系资料即可判

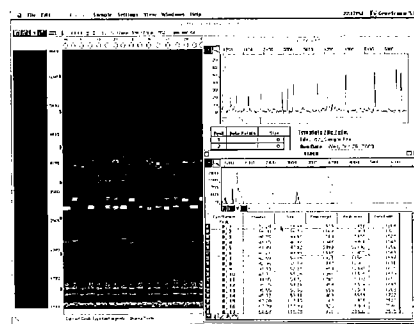


图 1 个体基因型判别示意图

Fig. 1 Individual genotyping

断基因型。

2.2 DHPLC 微卫星检测

2.2.1 引物检测结果 采用 DHPLC 对所合成的引物纯度进行检测,图2是所检测的1对引物示意图,其中上游引物是1条高而直的单峰,表明引物纯且含量高,而下游引物出现2条较矮的峰,表明合成的引物已降解,无法扩增出所需要的特异性片段,必须重新合成引物。可见,利用 DHPLC 系统在试验前对合成的引物进行质量监控是非常必要的,如果不及时对引物进行检测,将会严重影响 PCR 扩增的效率,增加不必要的人力、财力浪费。

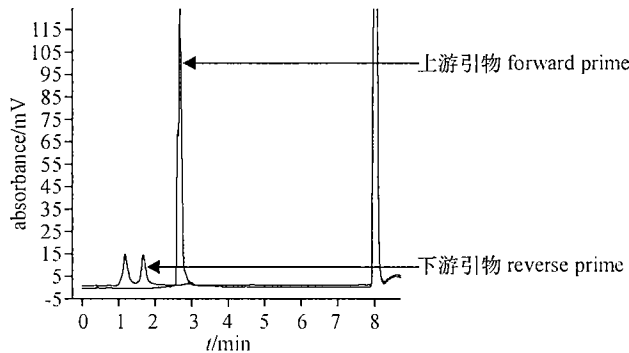


图2 DHPLC 检测引物纯度示意图

Fig 2 Purity analysis of synthesized primer by DHPLC

2.2.2 微卫星座位的基因分型 用合成的引物对64个个体的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 产物用 WAVE® 核苷酸片段分析系统,采用已确立的洗脱梯度进行检测分型。根据目标基因片段大小范围,判别目标基因的位置,得到的单峰为纯合子,双峰为杂合子,并通过其家系关系确定该个体的基因型,如图3和图4所示。

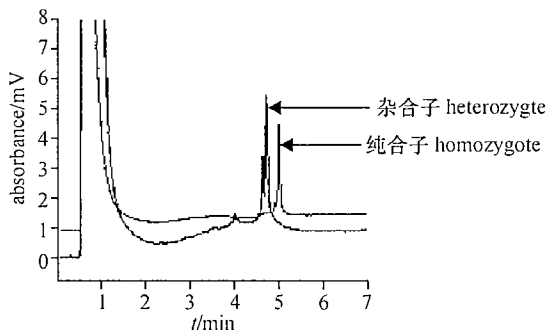


图3 纯合子和杂合子示意图

Fig.3 Genotyping of homozygote and heterozygote by DHPLC

2.3 DHPLC 系统与 ABI377 系统检测微卫星效果比较

对检测的64个样品,2个系统检测到57个样品的基因型相同。有相同的2个样品未检测到产物,可能是 PCR 产物浓度太低或无产物所致。另外有3个样品,DHPLC检测并分析出基因型,ABI377未检测

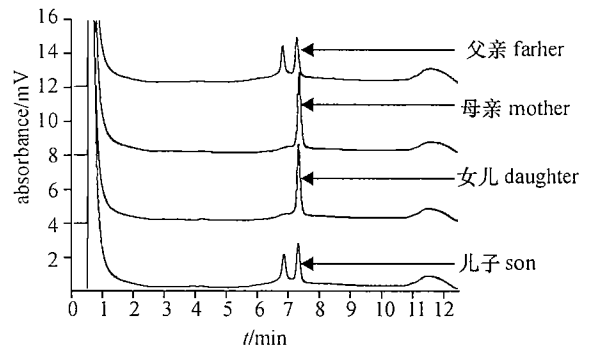


图4 家系基因分型示意图

Fig.4 Individual genotyping in family

到,有2个样品 ABI377 检测并分析出基因型,而 DHPLC 未检测到产物。故2个系统检测微卫星多态性的相同率达 92.2% (59/64), DHPLC 未检出率 6.3% (4/64), ABI377 未检出率 7.8% (5/64),2个系统检测的灵敏度和准确度基本接近。华南农业大学动物遗传育种与繁殖实验室采用 DHPLC 系统检测1个样品的消耗品约需人民币 10.00 元。由于 ABI377 所用引物和内标都需要荧光标记,因此检测1个样品的消耗品约需人民币 15.00 元。

2.4 猪微卫星标记

本试验利用 ABI377 发现了该座位片段范围 111 ~ 119 bp 以外新的等位基因 104 bp 和 110 bp,已有的研究表明,同一微卫星标记在不同的群体所获得的等位基因片段范围是有所不同的。由于本研究所用的杂交母本是我国广东特有的地方猪种,获得新的片段是合理的。

3 讨论

从功能上看,DHPLC 系统相对于 ABI377 分析系统,能对合成的引物进行纯度测定,大批量的合成引物经常会出现部分引物纯度不高,导致试验反复摸索条件而难以获得理想的结果,既浪费人力,又浪费财力,故在大批量 PCR 反应前,对合成的引物进行纯度检测,能为进一步进行大规模基因组扫描奠定良好的基础。而 ABI377 分析系统能直接测出微卫星片段大小,发现新的等位基因座位。在大规模基因检测中各自发挥优势。

对2个系统微卫星检测效果的比较表明,DHPLC 系统和 ABI377 系统在进行基因组 DNA 微卫星分型上共有的显著优点就是都能达到高通量、快速检测基因型的目的。本研究通过对64个 PCR 产物样品的对照分析发现:① 2个系统的检出率基本接近,都能直观地提供检测样品峰图;② 从结果判断来看,DHPLC 系统需人工判读基因型,而 ABI377 系统能通过软件分辨基因型(如果峰图结果非常理

想),但通常情况下,软件判读的结果都有一定的误差,需通过人工校对才能获得准确结果;③ ABI377系统在加入内标的情况下,能精确地提供所分析片段大小,为进一步研究所用.而 DHPLC 系统只能进行基因分型,不能提供准确的片段大小,但若在每个样品中加入内标,也能推算出所分析片段大小,其方法有待进一步确立,检测成本会相对提高;④因为在进行 PCR 扩增和 PAGE 胶电泳时,ABI377系统都需要用到荧光标记引物和内标,导致大批量进行基因组扫描时检测成本较高,每个样品成本约合人民币 15 元,而 DHPLC 系统检测 1 个样本约需人民币 10 元,在进行大规模基因组扫描时能降低成本.

虽然许多研究者通过比较试验,认为 DHPLC 的灵敏度和特异性很高,可达 96% ~ 100%^[7-10].但从本研究结果来看,DHPLC 对 PCR 产物的要求较高,首先要求 PCR 产物的浓度和纯度均较高,上样量约 50 ~ 200 ng 可获得较理想的结果.浓度太低,信噪比下降,分析结果的可靠性也随之下降低. PCR 产物不纯会导致杂峰出现,从而影响结果的判断.其次,对 PCR 反应所用的 DNA 模板、*Taq* DNA 聚合酶、缓冲液组成、水的要求均较高,模板 DNA 最好在 50 ng 以下,因为过多的大分子 DNA 会滞留于层析柱,影响分离效果.*Taq* DNA 聚合酶要求用进口的高纯度酶,且 PCR 缓冲液中不能含有 BSA、DMSO 或甲酰胺,目前许多公司的 *Taq* 酶缓冲液都含有其中的 1 种或 2 种,这些物质会直接影响层析柱的分离效果,且破坏层析柱,降低柱子使用寿命,要求试验所用超纯水电阻率 < 18.2 MΩ,有机碳总含量 < 5×10^{-9} .叶建伟等^[11]对 DHPLC 分析技术特征及应用中也有类似的报道.若对仪器使用及保养不善,使层析柱(约 1.8 万元/支)破坏,会直接影响试验结果,提高试验检测成本.

参考文献:

- [1] KNOTT S A, NYSTROEM P E, ANDERSSON-EKLUND L, et al. Approaches to interval mapping of QTL in a multigeneration pedigree: the example of porcine chromosome 4 [J]. *Animal Genetics*, 2002, 33: 26-32.
- [2] 胡晓湘. 通过基因组扫描定位鸡重要经济性状基因的初步研究[D]. 北京:中国农业大学动物科学学院, 2001.
- [3] 方美英. 中国地方猪种进化研究[D]. 北京:中国农业大学动物科学学院, 2002.
- [4] 郭晓令, LOOFT C, REINSCH N, 等. 用商品群作为参考构建猪的微卫星连锁图谱[J]. *遗传学报*, 2003, 30(7): 653-656.
- [5] OEFNER P J, UNDERHILL P A. Comparative DNA sequencing by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) [J]. *Am J Hum Genet*, 1995, 57: 266.
- [6] 李加琪, 刘小红, 王翀, 等. 长白猪 QTL 定位资源群建立及其遗传分析[J]. *遗传学报*, 2004, 31(12): 1361-1368.
- [7] ARNOLD N, GROSS E, SCHWARZ-BOEGER U, et al. A highly sensitive, fast and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers [J]. *Hum Mutat*, 1999, 14: 333.
- [8] SKOPEK T R, CLAAB W E, MONROE J J, et al. Analysis of sequence alterations in a defined DNA region: comparison of temperature-modulated heteroduplex analysis and denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Mutat Res*, 1999, 430: 13.
- [9] COTTON R G H, BRAY P J. Using CCM and DHPLC to detect mutations in the glucocorticoid receptor in atherosclerosis: a comparison [J]. *J Biochem Biophys Meth*, 2001, 47: 91.
- [10] CHOY Y S, DABORA S L, HALL F, et al. Superiority of denaturing high performance liquid chromatography over single-stranded conformation and conformation-sensitive gel electrophoresis for mutation detection in TSC2 [J]. *Ann Hum Genet*, 1999, 63: 383.
- [11] 叶建伟, 丁洁. 变性高效液相色谱分析的技术特征及其应用[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2003, 12(2): 197-200.

【责任编辑 柴 焰】

[1] KNOTT S A, NYSTROEM P E, ANDERSSON-EKLUND