

单管实时 PCR 快速检验 ABO 基因型

赵会安¹, 阮力², 夏邦勇¹, 栾国彦³, 李庆阁²

(1 江西省刑事科学技术研究所, 江西 南昌 330006; 2 厦门大学生物医学研究院, 福建 厦门 361005;
3 厦门百维信公司, 福建 厦门 361009)

【摘要】目的 建立快捷特异的 ABO 基因分型检测方法。方法 根据 ABO 基因结构特点, 设计特异性引物和四色双链探针, 采用单管实时 PCR 方法检测 ABO 基因, 结果与传统免疫学方法相对比。结果 该方法可检出常见的 3 个等位基因, 区分常见的 6 种基因型, 全部检测过程可在 100min 内完成。110 例中国人的随机个体定型结果与传统免疫学方法一致。结论 实时 PCR 法进行 ABO 基因分型, 简便快捷, 灵敏度高, 可以有效地为侦查破案服务。

【关键词】法医学物证学; ABO 基因型; 实时 PCR; 双链探针

【文献标识码】A **【文章编号】**1001-5728(2007)06-0363-03

Rapid single-tube real-time PCR for ABO genotyping([△]ZHAO Hui-an, RUAN Li, XIA Bang-yong et al [△]Jiangxi Forensic Science Institute, Nanchang 330006 China)

【Abstract】 Objective To develop a rapid ABO genotyping approach by using multicolor displacing probe based on real-time PCR. **Methods** Primers and four differently fluorophore-labeled displacing probes were designed to detect the nucleotide polymorphisms responsible for the three major ABO alleles and analyzed in a single PCR. The genotyping results were compared with conventional immunoassay. **Results** All of 110 blood samples were correctly genotyped as confirmed by conventional immunoassay. The assay could be finished within 100min. **Conclusion** The approach for ABO genotyping with real-time PCR using displacing probes is rapid and reliable and is very useful for forensic purposes.

【Key words】Forensic biological evidence; ABO genotype; Real-time PCR; Displacing probe

ABO 血型是第一个被认识的人类血型系统, 不仅在临床输血上具有重要意义, 而且在法医鉴定领域也广为应用。ABO 血型的分子遗传学机制已经被完全阐明, ABO 基因座位于人类第 9 号染色体 (9q34) 上, 由 7 个外显子组成, 其中第 6 和第 7 外显子占编码区的 90%。A、B、O 各等位基因间的序列差异也就主要分布在第 6 和第 7 外显子中^[1, 2]。其中以 261delG, 796C>A, 802G>A, 803G>C 4 处 (261 位 G

缺失, 796 802 803 位碱基置换) 最为重要, 检测此 4 处序列的差异就可分辨常见的 A、B、O 3 种等位基因, 从而推断出 ABO 血型的表型。

目前, 已经报道的 ABO 基因分型主要方法有 PCR-SSP 和 PCR-RFLP 法^[3-5], 但是这些方法操作较繁琐, 耗时较长, 灵敏度不高。本研究根据 ABO 基因结构特点, 设计特异性引物和四色双链探针, 采用实时 PCR 方法对随机个体进行基因分型。

1 材料与方 法

1.1 样 本

随机选择的中国无偿献血者血液样本 110 份。每例样本均已用传统血清学方法检测, 经正反定型法

【作者简介】赵会安 (1962-), 男, 辽宁新民人, 主任法医师, 学士, 主要从事犯罪现场勘查和法医遗传学研究。

【通讯作者】李庆阁 (1966-), 男, 河南开封人, 教授, 博士, 主要从事微生物、肿瘤以及遗传疾病的分子诊断研究。

作为《Forensic Science International》的分支期刊, 专门收录法医遗传学领域的研究论文, 于 2007 年 3 月正式发表第 1 期, 目前已发行 3 期。ISFG 委员会决定争取 1 年后申请为 SCI 期刊, 3 年内提高影响因子。

4 ISFG 委员会改选

ISFG 委员会进行了改选, 选举通过由丹麦歌本哈根大学法医学系的 Niels Morling 担任新一届主席, 任期从 2008 年 1

月 1 日开始。

5 下次会议召开的时间和地点

大会还决定了第 23 届 ISFG 大会的时间和地点: 2009 年 9 月 23~26 日, Buenos Aires 阿根廷。

确定了 ABO 血型表型,其中 A 型 43份, AB型 3份, B 型 16份, O 型 48份。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用 QIAamp DNA 提取试剂盒 (QIAGEN, Hilden, Germany)快速提取,经紫外分光光度计检测,将 DNA 终浓度调节至 20μg/ml

1.3 引物和探针设计

根据 NCBI上公布的 ABO 基因参考序列 (NC_000009),设计针对外显子 6的引物,并在扩增区间设计两个探针:①探针 O_{del}标记染料 ROX。该探针可以和 261G 缺失的序列杂交,在实时荧光 PCR 反应过程中,染料 ROX 升起时,表明该样品的等位基因至少有一个是 O 型;②探针 A_{del}标记染料 Cy5。该探针和没有 261G 缺失的序列杂交,所以只有等位基因为 OO 的纯合子,染料 Cy5 不会升起,其它的基因型则都会升起。另外还设计针对外显子 7的引物,并在扩增区间也设计两个探针:③探针 A 标记染料 FAM。该探针和 796C、802G、803G 的序列杂交,在实时荧光 PCR 反应过程中,染料 FAM 升起,表明该基因型的等位基因至少有 1个是 A 或 O 型,即不可能是纯合 BB 基因型;④探针 B 标记染料 HEX。该探针和 796A、802A、803C 的序列杂交,染料 HEX 升起,表明该基因型的等位基因至少有 1个是 B 型。根据以上 4个荧光染料的变化组合,可以判断 ABO 血型的 4个表型和 6种基因型。引物和探针设计示意图 1,引物序列见表 1,探针序列见表 2 基因型判别方法见表 3

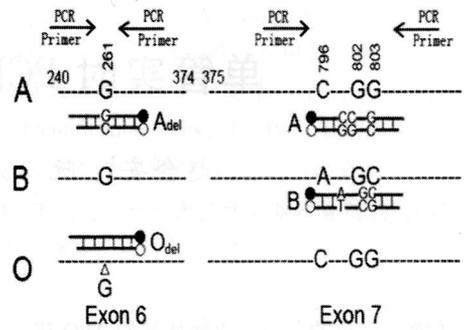


图 1 ABO 基因分型设计示意图

Fig 1 Schematic illustration of the designing strategy

表 1 引物序列表

Table 1. Primer sequences

Name	Sequence of Primers	PCR Product
Exon6-S	5'-ACGCCTCTCTCCATGTGCAGT-3'	79bp
Exon6-R	5'-AATGTGCCCTCCAGACAATG-3'	
Exon7-S	5'-CCAGTCCCAAGCCTACATCC-3'	06bp
Exon7-R	5'-GTGGCAGGCCCTGGTGAG-3'	

表 3 ABO 基因分型判定表

Table 3 Decision criterion for ABO genotyping

表型	基因型	A _{del} +Cy5	O _{del} +ROX	A-FAM	B-HEX
A	AA	+	-	+	-
A	AO	+	+	+	-
B	BB	+	-	-	+
B	BO	+	+	+	+
AB	AB	+	-	+	+
O	OO	-	+	+	-

表 2 探针序列表

Table 2 Probe sequences

Name	Sequence of Probes	Polymorphisms Detection Locus
A _{del}	5'-Cy5-TCCTCGTGGTGACCCCTTGG-PO ₄ -3' 3'-DABCYL-GGAGCACCACTGGGGAAC-5'	Exon6-261Gdel
O _{del}	5'-ROX-TCCTCGTGGTGACCCCTTGGC-PO ₄ -3' 3'-DABCYL-GGAGCACCACTGGGGAACC-5'	
A	5'-FAM-CCGAAGAACCCCCAGGTA-PO ₄ -3' 3'-DABCYL-GCTTCTTGGGGGGTCCA-5'	Exon7-796C>A, 802G>A, 803G>C
B	5'-HEX-ACTACATGGGGCGTTCTTCG-PO ₄ -3' 3'-DABCYL-GATGTACCCCGCAAGAAG-5'	

1.4 实时 PCR

反应总体系为 25μl 包括 2.5μl 10 × buffer (160mmol/L [NH₄]₂SO₄, 670mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 0.1% w/v Tween 20), 2.5μl 25mmol/L MgCl₂,

每种 dNTP 400μmol/L, 每种引物 0.4μmol/L, 每种探针 0.1μmol/L, 1U TaqDNA 聚合酶, 20ng 模板 DNA。实时 PCR 反应在 Rotogene 3000 (Corbett Research Australia) 型实时 PCR 仪上进行。反应条件为: 96℃

预变性 2min 随后 94℃变性 15s, 57℃退火 15s, 72℃延伸 10s, 50个循环; 后 40个循环中在每一循环 57℃退火时收集 4色荧光信号。

1.5 灵敏度分析

选一基因型为 BO 的样本, 提取基因组 DNA 后, 将 DNA 终浓度调节至 200ng/μl 进行 10 倍梯度稀释, 共 6 个稀释度, 最低稀释浓度为 2pg/μl。6 个稀释度各取 1μl 为模板进行实时 PCR, 每个稀释度同时做 3 个平行管。

2 结果

应用本方法对 110 例已知表型样本进行检测, 所得结果与血清学方法结果一致。灵敏度实验结果表明本方法具有较高的灵敏度, 可以检测到 20pg 的人类基因组 DNA (图 2)。初始模板浓度与其达到检测域值的循环数 (threshold cycle, Ct) 在检测范围内具有良好的线性关系。

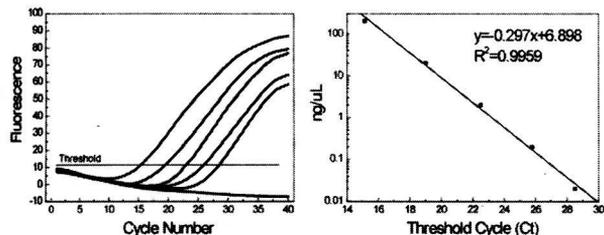


图 2 灵敏度实验结果

Fig 2 Determination of the sensitivity of the assay

左图: 初始模板浓度梯度 200 ng ~ 20 pg/μl (从左到右) 和阴性内对照。右图: 初始模板浓度与 Ct 值间的线性关系
The results (shown in the left panel) demonstrate that the amount of DNA added as template to each of the five reactions was 200~0.02ng/μl respectively. The results (shown in the right panel) demonstrate that the threshold cycle is inversely proportional to the logarithm of the number of target molecules initially present

3 讨论

ABO 血型一直被常规应用于法医生物样本的个人识别检验。传统的 ABO 分型采用血清学方法, 随着 DNA 技术的发展和运用, 也被用于 ABO 基因型检验。双链置换探针是近年建立的一种 SNP 检测方法^[6,7], 其特异性好, 杂交效率高, 设计灵活简单, 荧光本底低, 非常适合单碱基突变的多重检测。双链置换探针是由两条配对的单链寡核苷酸构成。在其中一条单链的 5' 端标记荧光基团, 在另一条单链的 3' 端标记淬灭基团, 同时两条链的 3' 端进行磷酸化封闭, 使其不能作为引物延伸。根据荧光能量转移原理, 探针成双链结构时, 荧光基团的荧光被与其靠近淬灭基团淬灭而检测不到荧光, 而当两条链分离时, 探针可以发出荧光。在 PCR 反应过程中的退火阶

段, 当双链置换探针的两条链或其中一条链与靶序列杂交时, 探针的两条链分离, 探针发出荧光, 而如果靶序列有碱基突变, 则双链探针不会和靶序列杂交, 探针回复到双链结构, 探针不发荧光 (图 3)。

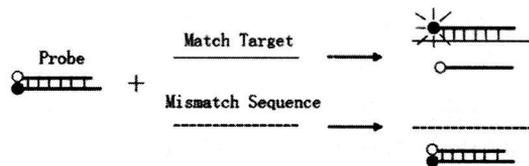


图 3 双链置换探针原理示意

Fig 3 Principle of displacing probes

本文采用双链置换探针实时 PCR 方法进行 ABO 血型基因分型, 实现了在同一反应管里采用两对引物的双重 PCR, 并利用标记不同荧光染料的 4 对探针, 同时检测 4 个位点单碱基突变, 实验操作简单; 直接利用荧光 PCR 仪进行扩增和分析, 操作步骤少, 操作时间缩短至 2h 所需试剂减少, 实验成本低。同时由于 PCR 反应完成后, 不必打开反应管, 可有效防止 PCR 污染, 防止假阳性, 使结果更加可靠。该方法灵敏度高, 可检测到 20pg 的基因组 DNA 模板, 特别适用于法医痕量样品分析。

本文对 110 例样本检测结果推导出的 ABO 血型表型, 与血清学方法检测结果一致, 说明该方法正确可靠。但本方法不能识别 O² 等位基因, 对具有 O² 等位基因的检材的判型可能会与血清学出现矛盾结果。O² 基因是白种人特有的等位基因, 中国人群中至今尚未见报道^[1,3], 因此本法用于对中国人的 ABO 基因型判定是可行的。

【参 考 文 献】

[1] Y P S P. Sequence variation at the human ABO locus [J]. Ann Hum Genet. 2002, 66: 1-27
 [2] Suzuki K. ABO blood group alleles and genetic recombination [J]. Leg Med. 2005, 7: 205-212
 [3] 白丽萍, 姜先华, 黄斌. 应用 PCR-SSP 方法进行 ABO 基因分型的研究 [J]. 中国法医学杂志, 2004, 19: 41-42
 [4] 程丽, 刘雅诚, 陈国弟, 等. 50 例强奸案混合斑中精子 ABO 基因分型 [J]. 中国法医学杂志, 2003, 18: 222-223
 [5] 杨庆恩, 朱传红. 复合 PCR-RFLP 技术检测 ABO 基因型 [J]. 中华医学遗传学杂志, 1999, 16: 110-112
 [6] Li Q, Luan G, Guo Q, et al. A new class of homogeneous nucleic acid probes based on specific displacement hybridization [J]. Nucleic Acids Res. 2002, 30: E5
 [7] Cheng J, Zhang Y, Li Q. Real-time PCR genotyping using displacing probes [J]. Nucleic Acids Res. 2004, 32: e61.

(收稿日期: 2007-01-10, 修回日期: 2007-08-08)