

· 论 著 ·

# 多重 PCR-RFLP检测 XRCC1 基因两位点多态性

王威, 金如锋, 吴芬, 夏昭林\*

(复旦大学公共卫生学院劳动卫生教研室与公共卫生安全教育部重点实验室, 上海 200032)

**摘要:** 目的 探讨多重聚合酶链反应 限制性片段长度多态性 (多重 PCR-RFLP) 技术在单核苷酸多态性检测中的应用。方法 应用多重聚合酶链反应 (Multiplex) (多重 PCR) 原理设计人类 X射线交错互补修复基因 1 (XRCC1 基因) 194、399 位点引物, 通过 PCR-RFLP 技术判断 XRCC1 基因 2 个 SNP 位点多态性。结果 设计的两对引物可同时 PCR 扩增分别含 2 个多态位点的 DNA 片段, MspI 限制性内切酶酶切可判断 2 位点多态性, PCR 和酶切效果均较好。结论 多重 PCR-RFLP 技术可应用于单核苷酸多态性位点的检测, 并节省时间和费用, 提高检测效率。

**关键词:** 多重 PCR; PCR-RFLP; 单核苷酸多态性; XRCC1 引物设计

**中图分类号:** Q343.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2008)01-0003-04

Application of multiplex PCR-RFLP to identify two SNP of XRCC1 gene

WANG Wei JIN Ru feng WU Fen XIA Zhao lin\*

(Department of Occupational Health School of Public Health Fudan University Key Laboratory of Public Health Safety Ministry of Education Shanghai 200032 China)

**Abstract:** Objective To explore the strategy for identifying single nucleotide polymorphism (SNP) with technique of multiplex PCR by primer design combined with PCR-RFLP. Methods Primer was designed with multiplex theory then using PCR-RFLP to identify 2 SNPs of XRCC1 gene. Results One pair of primers could simultaneously amplify DNA segments containing 2 SNP sites by PCR while MspI restriction enzyme could identify 2 SNPs both of them showed good effect. Conclusion

It was suggested that Multiplex combined with PCR-RFLP can be used to identify SNP and is good in time and money saving and detect efficiency improving.

**Key words:** Multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR); Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP); Single nucleotide polymorphism (SNP); X-ray repair cross complementing gene 1 (XRCC1); Primer design

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNPs) 是指染色体基因组水平上单个核苷酸变异引起的 DNA 序列, 在人群中的发生频率大于 1%。这些差异决定了个体间的差别, 在环境反应基因中这种多态性就决定了个体对环境有害因素的易感性。随着人类基因组计划和人类基因组单体型计划 (HapMap) 的开展, 相关 SNP 的深入研究正在成为热点, SNP 的研究在人类遗传学、分子遗传学、药物遗传学、法医学以及疾病的诊断和治疗等方面将产生积极的作用。聚合酶链反应 限制性片段长度多态性 (polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism PCR-RFLP) 检测技术具有操作简单、特异性高、重复性好等优点, 而且可以直接确定突变

的部位和性质, 因此在多态性检测中应用很广<sup>[1]</sup>。

1988 年 Chamberlain 首次将多重 PCR 用于检测杜氏肌营养不良症 (DMD) 基因多个外显子<sup>[2]</sup>。其原理是在普通 PCR 的基础上加以改进, 于一个 PCR 反应体系中加入多对特异性引物, 可扩增多个目的片段的 PCR 技术。由于多重 PCR 同时扩增多个目的基因, 具有节省时间、降低成本、提高效率的优点, 特别是节省珍贵的实验样品, 所以一经提出, 即得到众多研究者的青睐, 并且发展迅速, 在生命科学的各个领域, 多重 PCR 已经成为一项成熟而重要的研究手段。多重 PCR 技术在多态性检测中通常用于缺失型基因多态的检测, 而多重 PCR 结合 PCR-RFLP 技术在单核苷酸多态性检测中应用较少, 可能与引物设计以及多态位点内切酶的选择有关。

人类 X 射线交错互补修复基因 1 (X-ray repair cross complementing gene 1, XRCC1) 是第一个分离到的影响细胞对电离辐射敏感性的哺乳动物基因, 它广泛参与 DNA 损伤的修复<sup>[3]</sup>。XRCC1 是目前研究较多的一种 DNA 修复基因, 在人类的 XRCC1 基因中现已

收稿日期: 2007-08-01; 修回日期: 2007-09-30

基金项目: 国家自然科学基金 (30671740 30070650); 国家 973 项目 (2002CB512909); 复旦大学研究生创新基金资助

作者简介: 王威 (1975-), 男, 博士生, 研究方向: 职业卫生与分子毒理, E-mail: ww375@126.com

\* 通讯作者, 教授, E-mail: zkc@shmu.edu.cn

发现 3 种氨基酸突变, 分别位于密码子 194 (Arg→T)<sub>1</sub>、280(A<sub>2</sub>→His)和 399(A<sub>2</sub>→G)<sub>1</sub>位点。目前, 该基因多态与肿瘤发生的关系成为有关研究的一个热点, 在职业卫生领域的研究亦在逐步展开<sup>[4-8]</sup>。

本研究应用 Multiplex PCR-RFLP检测方法, 检测 XRCC1 基因 194和 399位点的多态性, 并对应用中的一些注意问题进行了探讨。

### 1 对象和方法

#### 1.1 对象

上海市某氯碱化工厂工人 (211名), 经知情同意采取研究对象的外周血 3ml 酚氯仿抽提法提取 DNA

#### 1.2 主要试剂及仪器

试剂: 2× PCR mix (MB 公司), 限制性内切酶 MspI 和 PvuII (MBI公司), 琼脂糖 (BBI公司), 引物由上海 Sangon公司合成。

仪器: 9600型 PCR仪 (PE公司), 微型电泳槽 (Pharmacia Biotech EPS1000)、Gel Doc 2000凝胶成像仪 (BioRAD公司)。

#### 1.3 方法

Multiplex PCR是根据 PCR扩增特异性原理, 设计多对引物, 将多对引物在同一体系进行扩增, 可同时扩增多条目的片段。RFLP技术即限制性酶切片段长度多态技术, 将含多态位点的 DNA扩增片段应用相应的内切酶进行酶切鉴定。

#### 1.4 序列查找及引物设计

在 NCB 网站 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) 查找 XRCC1 基因序列和 XRCC1 基因 194、399多态位点碱基变异信息, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。

#### 1.5 PCR扩增及酶切鉴定

取 50 ng 的基因组 DNA 每个引物 0.2 μmol/L, 1 × PCR mix ddH<sub>2</sub>O 组成 25 μl 反应体系。PCR反应条件为首先 94℃ 预变性 5 min 然后 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环后 72℃ 延伸 10 min PCR 扩增后, 分别取 PCR 产物, 加入 5 μl 内切酶和 2 μl 10× 酶切缓冲液和 ddH<sub>2</sub>O 组成 20 μl 反应体系, 37℃ 水浴中酶切 16 h 电泳后于凝胶成像仪紫外灯下观察成像。

### 2 结果

#### 2.1 序列搜索与多态位点确定

查找 NCB 的 SNP 数据库, 获取 XRCC1 基因全序列及多态位点信息, 基因组全序列、194、399 多态位点信息所在网页如下:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NC\_000019.8&from=48739304&to=48771555&strand=2&doctype=gb

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\_ref.cgi?rs=1799782

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\_ref.cgi?rs=25487

根据网页提供信息总结 2 个多态位点一般情况见表 1。

表 1 XRCC1 基因 2 个多态位点一般情况

rs	密码子	氨基酸变异	多态碱基	外显子	基因组位置
r1799782	194	A <sub>2</sub> /T <sub>1</sub>	C/T	6	22142
r25487	399	A <sub>2</sub> /G) <sub>1</sub>	G/A	10	23990

#### 2.2 引物设计

根据 2 个多态位点情况, 194、399 多态位点均可为 MspI 内切酶识别, 因此可首先设计 194 位点多态扩增引物, 选择评分较高者, 然后再根据 194 多态扩增产物及酶切图谱情况设计 399 位点多态引物 (特别需要考虑多重 PCR 扩增产物和酶切图谱应易于辨认) 最后对多条引物之间的二聚体以及引物与基因组序列错配情况进行判断, 选择合适引物对。

2.2.1 194 位点引物设计 根据序列情况分析, PvuII 和 MspI 内切酶均可识别 194 位点多态, 为使 194 和 399 位点同时进行 PCR-RFLP 需考虑使用 MspI 内切酶来识别。而 194 多态位点 (22142 处) 上游 20 bp 处 (22121 处) 有另外一 MspI 内切酶识别序列, 而通常的 PCR 扩增产物酶切后该处被切开, 使电泳图谱条带增多, 且两等位基因酶切后长度差异仅 20 bp 不利于电泳后条带识别。因此根据错配碱基引物设计的原理, 在 194 多态位点上游 20 bp 处引入一错配碱基来消除该处酶切位点, 增加两变异等位基因酶切后的长度差异。

设计 194 位点引物为: 上游 P<sub>1</sub> 5'-CGCCAACCTCTGAGGACG-3', 下游 P<sub>2</sub> 5'-GGTCGCTGGCTGTGACTATG-3', 扩增后产物全长 383 bp 引物与对应扩增序列如下:

```
CGCCAACCTCTCTGAGGACG (上游引物 5'→3')
CGCCAACCTCTCTGAGGCCGggggctctcttctcagccggatcaaa
.....
..... tca tcc tggatccactttctccctCATAGTCACAGCCAGCGA-
CC
```

(下游引物 3'→5') GTATCAGTGTGGTCTGCTGG

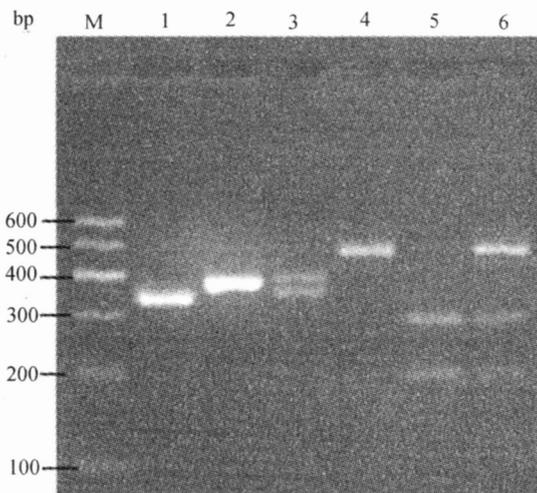
上下两行分别为上下游引物序列, 中间两行为 PCR 扩增序列, 扩增序列中大写碱基为引物所对应

碱基, 单下划线为引物错配碱基所在位置, 双下划线为内切酶 *MspI* 识别序列, 加粗斜体为多态位点。扩增后原序列第一个内切酶识别位点消失, 仅余多态位点可为内切酶识别。

2.2.2 399 位点引物设计 399 位点引物设计除了普通 PCR-RFLP 引物设计外, 需考虑酶切后图谱的识别情况, 酶切后片段应与 194 位点酶切后片段长度存在一定差异, 使之易于辨认。设计 399 位点引物为: 上游 P<sub>3</sub> 5'-TGTCCTCCCCTGTCCTCGTTC-3'; 下游 P<sub>4</sub> 5'-ACTGTTCCTCCACCCCTGA-3', 扩增后产物全长 463 bp。

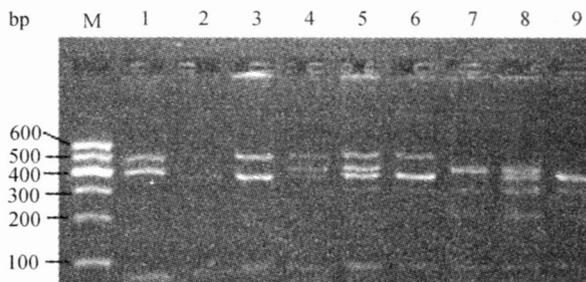
### 2.3 基因型的判断

XRCC1 194 位点扩增后出现 383 bp 片段, 经 *MspI* 酶切后可出现 383 bp、346 bp 和 37 bp 三种片段 (37 bp 片段过小而不能分辨), 其中, 野生纯合型 (A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>) 为 346 bp 和 37 bp 两个片段, 突变纯合型 (T<sub>1</sub>T<sub>1</sub>) 为 383 bp 一个片段, 杂合型 (CT<sub>1</sub>) 为 383 bp、346 bp 和 37 bp 三个片段; XRCC1 399 位点扩增后出现 463 bp 片段, 经 *MspI* 酶切后可出现 463 bp、277 bp 和 186 bp 三种片段, 其中, 野生纯合型 (A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>) 为 277 bp 和 186 bp 两个片段, 突变纯合型 (T<sub>2</sub>T<sub>2</sub>) 为 463 bp 一个片段, 杂合型 (CT<sub>2</sub>) 为 463 bp、277 bp 和 186 bp 三个片段。图 1 为两对引物分别进行 PCR-RFLP 时所呈现的电泳图谱, 图 2 为多重 PCR-RFLP 后所呈现的电泳图谱。



M: DNA ladder  
194 位点基因型, 泳道 2: Trp/Trp; 泳道 3: Arg/Trp; 泳道 1: Arg/Arg  
399 位点基因型, 泳道 4: Gln/Gln; 泳道 6: Arg/Gln; 泳道 5: Arg/Arg

图 1 XRCC1 基因 194 399 位点 PCR 产物经 *MspI* 酶切后的电泳图谱



M: DNA ladder  
194 位点基因型, 泳道 1, 7: Trp/Trp; 泳道 4, 5, 8: Arg/Trp; 泳道 2, 3, 6, 9: Arg/Arg  
399 位点基因型, 泳道 1, 2, 3: Gln/Gln; 泳道 4, 5, 6: Arg/Gln; 泳道 7, 8, 9: Arg/Arg

图 2 XRCC1 基因 194 399 位点 Multi-PCR 产物经 *MspI* 酶切后的电泳图谱

### 2.4 结果验证

采用 Abdelrahman 等<sup>[9]</sup> 相关文献中引物及 PCR-RFLP 过程进行结果验证, 分别扩增后, 399 位点仍用 *MspI* 内切酶酶切, 而 194 位点产物改用 *PvuII* 内切酶进行酶切以取得更好的分离效果。随机取 20 例标本进行多态检测结果验证, 结果全部一致。

### 2.5 XRCC1 基因多态分布情况

XRCC1 194 (A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub>A<sub>2</sub> A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>/T<sub>1</sub>T<sub>1</sub> T<sub>1</sub>T<sub>1</sub>) 三种基因型频率分别为 54.0%、37.9% 和 8.1%, 等位基因 A<sub>1</sub> 和 T<sub>1</sub> 的频率分别为 72.9% 和 27.1%。XRCC1 399 (A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub>A<sub>1</sub> A<sub>2</sub>A<sub>1</sub>/G<sub>2</sub>G<sub>2</sub> G<sub>2</sub>G<sub>2</sub>) 三种基因型频率分别为 55.0%、36.0% 和 9.0%, 等位基因 A<sub>2</sub> 和 G<sub>2</sub> 的频率分别为 73.0% 和 27.0%。该多态分布与 Shen<sup>[10]</sup> 等报道相似。

### 3 讨论

尽管一些高通量的 SNP 检测方法如基因芯片、分子内标、荧光共振、质谱、电磁学分析等使得检测效率大大提高, 在许多大规模检测中广泛应用, 并取得了比较满意的效果, 但同时存在重复性差、价格昂贵等缺点, 在常规实验室中难以开展应用。由于人类疾病的多样性和复杂性, 众多易感基因的发现不可能完全靠大规模的研究来筛查, 需要发展高通量、经济、灵敏度和特异度高的 SNP 检测技术<sup>[11]</sup>。

多重 PCR 技术通常在插入缺失多态中应用较多, 而在 SNP 检测中应用较少。许青松<sup>[11]</sup> 等应用该技术分析 GSIM1、GSTT1 和 GSIP1 基因型, 首先 PCR 扩增判断 GSIM1、GSTT1 缺失插入多态, 然后运用 RFLP 技术检测 GSIP1 基因多态。

2000 年 Abdelrahman 等应用多重 PCR-RFLP 技术进行了 XRCC1 两位点多态的检测<sup>[9]</sup>。该方法不足

之处在于 194 位点产物酶切后两种多态分别为 313 和 292 bp 长度差异仅 21 bp 且酶切图谱中线条过多, 不利于基因型的分辨。本研究通过采用碱基错配的方法重新设计引物, 将 194 多态附近的一个酶切位点消除, 使 194 位点 PCR 产物酶切后两种多态产物长度分别为 383 bp 和 346 bp 长度差异为 37 bp 亦比原方法酶切图谱减少一个条带, 减少了多态辨别的难度。

该研究结果在一定程度上改进了 AbdelRahman 等<sup>[9]</sup>创造的 XRCC1 两个 SNP 检测方法, 实验中亦需进一步优化实验方案。实际 PCR 扩增中 194 位点扩增效率较高, 且其电泳片段分离需要时间较长, 因此可能导致 399 位点片段条带较弱, 可考虑将 399 引物量加倍来达到较好的扩增效果, 亦可在观察结果时分两次观察结果, 第一次观察 399 位点的片段分离情况 (其片段长度差异大, 分离较早), 第二次观察 194 位点酶切图谱, 两者时间约相差一倍。同样, 该引物设计亦存在继续优化的可能, 如将 194 位点下游引物重新设计, 缩短片段长度, 使之更易分辨, 同时 399 位点的引物亦需根据实际情况进行相应更改, 但是否有更好的方案需要进一步的实验研究来确定。

综合考虑有关检测中出现的一些问题, 多重 PCR 结合 RFLP 技术在单核苷酸多态性检测中应注意如下事项: (1) 采用多重 PCR 引物设计原理设计特异、灵敏的多个引物对, 除考虑普通 PCR 引物设计影响因素外, 更需考虑多对引物之间以及引物与不同扩增序列处的错配情况; (2) 根据 RFLP 的原理考虑引物对与多态位点的相对位置, 使扩增后酶切产物易于鉴别, 酶切后形成的多个条带位置分布如何需要考虑, 特别要考虑扩增片段中是否存在其他酶切位点; (3) 碱基错配原理的应用可扩大 RFLP 的应用范围, 使该方法的应用更加灵活。创造酶切位点引物设计可使无内切酶识别多态位点能够被内切酶识别, 或者价格昂贵的内切酶可为价格便宜的内切酶识别, 或者不同的位点可为同一种内切酶识别<sup>[12]</sup>。同样该方法可以用来消除酶切位点, 本研究即采取逆向思维, 利用碱基错配原理消除酶切位点使酶切后多态等位基因片段易于识别; (4) 由于琼脂糖电泳方便实用, 且价格便宜, 因此用途较广, 引物设计时亦多考虑采用该方法分离酶切片段。如果多重 PCR-RFLP 技术在引物

设计时难以实现琼脂糖电泳分离片段达到的要求, 亦可考虑采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术来分离片段差异较小的酶切产物。

多重 PCR-RFLP 技术的开展将节约大量的样本、经费和时间, 将对今后相关研究产生良好的促进作用, 具备很高的推广价值。

#### 参考文献:

- [1] 王威, 夏昭林. 人类基因组单核苷酸多态性研究与疾病三级预防体系 [J]. 国外医学卫生学分册, 2006, 33 (6): 321-325
- [2] Chamberlain J S, Gibbs R A, Ranier J E, et al. Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiple DNA amplification [J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16 (23): 11141-11156
- [3] Cappelli E, Taylor R, Cevasco M, et al. Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair [J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272 (38): 23970-23975.
- [4] Sak S C, Barrett J H, Paul A B, et al. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and bladder cancer risk [J]. BMC Genetics, 2007, 8: 13
- [5] Yin J, Vogel U, Ma Y, et al. The DNA repair gene XRCC1 and genetic susceptibility of lung cancer in a northeastern Chinese population [J]. Lung Cancer, 2007, 56 (2): 153-160
- [6] 朱人, 陆凤娟, 张忠彬, 等. XRCC1 基因多态性与儿童急性白血病遗传易感性的关系 [J]. 卫生研究, 2005, 34 (3): 300-302
- [7] Zhang Z, Wan J, Jin X, et al. Genetic polymorphisms in XRCC1, APE1, ADPRT, XRCC2 and XRCC3 and risk of chronic benzene poisoning in a Chinese occupational population [J]. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention, 2005, 14 (11): 2614-2619
- [8] Li Y, Marion M J, Zippich J, et al. The role of XRCC1 polymorphisms in base excision repair of ethenoDNA adducts in French vinyl chloride workers [J]. International Journal of Occupational Medicine & Environmental Health, 2006, 19 (1): 45-52
- [9] AbdelRahman S Z, Soliman A S, Bondy M L, et al. Inheritance of the 194T>P and the 399G> in variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt [J]. Cancer Letters, 2000, 159 (1): 79-86
- [10] Shen H, Xu Y, Qian Y, et al. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population [J]. International Journal of Cancer, 2000, 88 (4): 601-606
- [11] 许青松, 朴大燮, 崔彦, 等. 应用多重 PCR 技术同时分析 GSTM1, GSTT1, GSTP1 基因型 [J]. 延边大学医学学报, 2005, 28 (2): 82-84
- [12] 张忠彬, 朱人, 夏昭林. 应用 CR-SRFLP 技术检测 HGG1 326 位点的单核苷酸多态性 [J]. 中国工业医学杂志, 2004, 17 (5): 293-295.

## 欢迎投稿 欢迎订阅