

采用均匀设计法优化 PCR 复合扩增的实验研究

高 静, 许 言, 刘 钧, 刘建兴, 曾思阳, 许冰莹
(昆明医科大学法医学院, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 探索均匀设计法在优化 PCR 复合扩增条件中的应用. **方法** 采用均匀设计方法, 对影响 PCR 扩增体系的 $MgCl_2$ 、dNTP、模板 DNA 和扩增循环次数等因素进行了 U6 (64) 优化. **结果** 获得 5 个条带清晰的目的 DNA 扩增产物, 建立了适用于 5 个 Y-SNP 位点 (M130、M175、M174、M231、M45) 的复合扩增反应体系. **结论** 该优化复合扩增体系可用于法医学实验研究.

[关键词] 均匀设计; PCR 复合扩增; Y-SNP; 实验研究

[中图分类号] R89 [文献标识码] A [文章编号] 1003 - 4706 (2013) 01 - 0019 - 05

Application of Uniform Design in Optimizing Multi-PCR System

GAO Jing, XU Yan, LIU Jun, LIU Jian-xing, ZENG Si-yang, XU Bing-ying
(Dept. of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the application of uniform design in optimizing multi-PCR (polymerase chain reaction) conditions. **Method** Four factors including $MgCl_2$, dNTPs, DNA template and cycle number, were tested using uniform design U6 (64). **Result** DNA bands were clear, and a suitable multi-PCR system for 5 Y-SNPs (M130, M175, M174, M231 and M45) was established. **Conclusion** The optimization of multiplex system can be used in forensic medical examination.

[Key words] Uniform design; Multi-PCR amplification; Y-SNP; Experimental study

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是继限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 和短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 之后的新一代遗传标记系统, 因其具有分布频密、遗传稳定、分析易自动化等特点而被广泛用于疾病相关性分析、人类起源迁移和药物研究等领域, 成为当前研究的热点. 目前已经有人尝试着把 SNP 位点分析应用于法医学领域^[1-7]. 因单个 SNP 位点通常只有两个等位基因, 多态性较低, 要解决法医学领域的个人识别和亲子鉴定, 要联合检测多个 SNP 位点, 才有应用价值^[8].

均匀设计^[9]是由中国数学家王元和方开泰创造

的一种可以有效解决多因素、多水平的试验设计方法. 该方法只考虑试验点在试验范围内的均匀分散, 使试验更具均匀性和代表性, 可以大大减少试验次数, 提高试验效率, 因而可以适用于 PCR 扩增体系的优化^[10].

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 仪器 梯度 PCR 扩增仪 (中国北京东胜创新生物科技有限公司), DYY-8B 电泳仪 (中国北京市六一仪器厂).

1.1.2 试剂 Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L)、 $MgCl_2$

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2010CD226); 云南省社会发展科技计划重点资助项目 (2011CA022)

[作者简介] 高静 (1986-), 女, 内蒙古呼和浩特市人, 在读硕士研究生, 主要从事人类基因组 DNA 遗传多态性以及法医学应用研究工作. 许言和高静对本文有同等贡献.

[通讯作者] 许冰莹. E-mail: bingying_xu@126.com

(25 mmol/L)、10 mM dNTP (上海博彩生物科技有限公司), DNA Marker、溴酚蓝 (上海英骏生物有限公司), 氯仿、异戊醇、无水乙醇 (上海申博化工), 丙烯酰胺、Tris 饱和酚 (NOVON 公司), M130、M175、M174、M231、M45 位点的引物均由 Invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 的制备 采用饱和酚 / 氯仿法提取 DNA 样本 20 份。

1.2.2 引物设计与合成 设计 M130、M175、

M174、M231、M45 五个 Y-SNP 位点的引物, 每个位点的引物长度相差 50 bp 以上便于凝胶电泳区分。

1.2.3 PCR 扩增及产物检测 本实验主要检测了模板 DNA、dNTP、Mg²⁺ 与循环次数等四个因素对 PCR 扩增的影响。根据实验要求, 将每个因素分成 6 个水平 (见表 1), 采用 U₆ (6⁴) 均匀实验设计表^[9]来安排实验 (见表 2)。退火温度由 PCR 扩增仪自行形成温度梯度: 51℃, 51.8℃, 53℃, 54.7℃, 56.8℃, 59℃, 60.8℃。取 PCR 扩增产物 2 μL 上样至 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 260 V 电压,

表 1 均匀设计优化 PCR 扩增体系和条件方案的因素和水平

Tab.1 PCR amplification factors and their levels using uniform design

因素	水平					
	1	2	3	4	5	6
100 ng/μL 模板 DNA/μL	1.0	1.25	1.5	1.75	2.0	2.25
2 mmol/mL dNTP/μL	1.75	2.25	2.75	1.5	2.0	2.5
25 mmol/L MgCl ₂ /μL	1.5	3.0	1.0	2.5	0.5	2.0
循环次数 (次)	25	28	30	33	35	37

表 2 PCR 扩增体系与条件

Tab. 2 PCR amplification systems and their conditions

条件	扩增条件编号						
	1	2	3	4	5	6	
10 × buffer (μL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	
25 mmol/L MgCl ₂	1.5	3.0	1.0	2.5	0.5	2.0	
100 ng/μL 模板 DNA (μL)	1.0	1.25	1.5	1.75	2.0	2.25	
10 mmol/L 引物 (μL)	M130	上游	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
		下游	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	M175	上游	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
		下游	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	M174	上游	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
		下游	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	M231	上游	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
		下游	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	M45	上游	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
		下游	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	2 mmol/mL dNTP(μL)	1.75	2.25	2.75	1.5	2.0	2.5
	5 U/μL Taq 酶(μL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
V (终体积) (μL)	25	25	25	25	25	25	
变性温度 (°C)	95	95	95	95	95	95	
变性时间 (s)	30	30	30	30	30	30	
退火温度 (°C)	51 ~ 61	51 ~ 61	51 ~ 61	51 ~ 61	51 ~ 61	51 ~ 61	
退火时间 (s)	30	30	30	30	30	30	
延伸温度 (°C)	72	72	72	72	72	72	
延伸时间 (s)	45	45	45	45	45	45	
循环次数	37	35	33	30	28	25	

电泳 90 ~ 120 min. 硝酸银染色, 记录结果并拍照.

1.2.4 优化的 PCR 反应体系和扩增程序的验证
通过更换 DNA 模板, 采用优化后的扩增体系及扩增条件进行多次重复实验来验证其可行性与实用性.

2 结果

采用 $U_6(6_4)$ 均匀实验设计表进行 PCR 优化实验的结果见图 1~3. 从 3 个图中可见, 图 2 中 4-4、4-5、4-6 对应的泳道内显示的 5 条条带清

晰、明亮, 且非特异扩增带较少. 根据图中各条带的情况, 调整各引物的量, 5 个 PCR 扩增产物在聚丙烯酰胺凝胶电泳图上可见 5 条均匀的条带. 经过多次重复实验, 最终确定该优化的 PCR 复合扩增体系 (25 μL): 模板 DNA (100 $\text{ng}/\mu\text{L}$)1.75 μL , MgCl_2 (25 mmol/L)2.5 μL , dNTP(2 mmol/mL)1.5 μL , 混合引物体系 5.6 μL (具体成分见表 3), Taq DNA 聚合酶 (5 $\text{U}/\mu\text{L}$) 1 U , 其循环扩增条件为变性温度 95 $^{\circ}\text{C}$, 变性时间 30 s, 退火温度 56.8 $^{\circ}\text{C}$, 退火时间 30 s, 延伸温度 72 $^{\circ}\text{C}$, 延伸时间 45 s, 循环次数 30 次.

表 3 混合引物体系

Tab. 3 Primer mixture system

引物	M130	M175	M174	M231	M45
10 mmol/L 上游引物(μL)	0.7	0.7	0.5	0.4	0.5
10 mmol/L 下游引物 (μL)	0.7	0.7	0.5	0.4	0.5

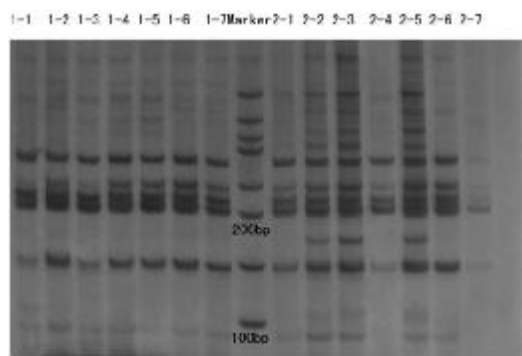


图 1 扩增条件编号 1、2 对应的 PCR 扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis map for conditions 1, 2 after PCR amplification

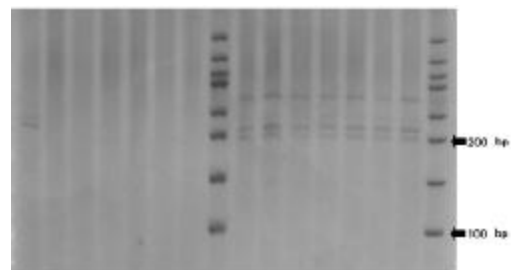


图 3 扩增条件编号 5、6 对应的 PCR 扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 3 Polyacrylamide gel electrophoresis map for conditions 5, 6 after PCR amplification

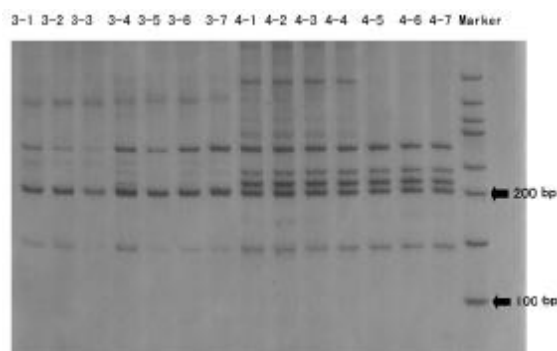


图 2 扩增条件编号 3、4 对应的 PCR 扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis map for conditions 3, 4 after PCR amplification

3 讨论

3.1 PCR 复合扩增的影响因素

PCR 扩增的效果涉及模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTP、引物、Taq DNA 聚合酶的量, 以及 PCR 反应条件中退火温度、循环次数等多个影响因素, 而复合 PCR 扩增因为涉及多个引物, 要想完成其优化, 则会更加复杂.

在多重 PCR 反应中, 引物的设计至关重要, 它是影响多重 PCR 反应成败的关键因素^[1]. 所设计的多条引物必须高度特异, 才可以更好地保证其与目的 DNA 片段的结合, 以便更好地完成下一步的工作. 并且要充分考虑不同引物对之间互补的碱基序列, 特别是引物二聚体的形成^[12].

因涉及多个引物,退火温度通常也是在 PCR 复合扩增中需要调整的一个重要因素.考虑到退火温度通常与引物的解链温度相近,刘志杰等^[12]建议所设计的引物最好有相近的退火温度. Henegariu O 等^[13]研究表明,单个目的片段能够在 56℃~60℃特异性地扩增,而在多重 PCR 反应中,降低 4℃~6℃的退火温度能够更好地用于所有目的片段的扩增.

Mg²⁺ 是 Taq DNA 聚合酶的激活剂.然而在第 5 组的实验中,由于 Mg²⁺ 的浓度过低,导致 Taq DNA 聚合酶的活性不足,因而没有得到相应的扩增产物.

3.2 均匀设计

对于 PCR 反应体系的优化过去大多采用单因素试验和正交设计试验.单因素试验须对反应体系中各个因素的最佳水平分别进行摸索,需要进行多次单因素梯度试验,过程繁琐,且不能兼顾到反应体系中各因素间的相互影响^[14].正交试验设计是根据正交性从全面试验中挑选出部分有代表性的点进行试验,将试验因素各水平平均分布,实现了因素和水平的均匀分散性和整齐可比性,极大地减少了试验次数,可谓是一种多因素、多水平、高效、经济的试验方法^[15].均匀设计舍弃了正交设计中的整齐可比性,让实验点在其实验范围内充分地“均匀分散”.这样每个实验点都有很好的代表性,而实验点的数目大幅度地减少,实验次数也就相应地大量减少^[16].并且由于均匀设计能从全面试验点中挑选出部分代表性的试验点,这些试验点能反映体系的主要特征,所以虽然试验次数大幅减少,但并不会影响实验结果^[10].

尽管本研究成功优化了 5 个 Y-SNP 位点的复合扩增体系,然而其只是一个优化的组合^[17].采用均匀设计表直接进行较少次数的实验,很难得到一个最优的条件组合.而由于试验结果不易量化以及 PCR 扩增体系中各因素间的复杂性^[18]等原因制约了均匀设计的主要功能,诸如建立有效的回归方程模型从而对主次影响因素排序、优化结果预报等^[17].因而笔者认为,如果自己所在的实验室有实验室反复实践的经典体系,可以采用经典体系进行尝试扩增,在效果不甚理想的情况下进行单因素的优化.或者尝试采用多轮均匀设计实验^[19]进行优化.一味地追求最少的实验次数并不一定得到一个理想的扩增效果,对均匀设计与 PCR 扩增反应之间进行进一步探究还是很有必要的.

多基因座复合扩增的特点是提高单次检测的信息量,可以减少检材用量,有利于复核鉴定,尤

其适合于法医学个人识别和亲子鉴定.而 SNP 作为新一代的遗传标记,已然开始尝试着在法医学领域应用.本课题选取的 5 个 Y-SNP 位点,是基于 2008 年 Y 染色体系统进化树^[19]与相关文献^[20,21]筛选出的与中国人群有密切联系的位点.该优化后的复合扩增体系可以为本实验室即将开展的云南男性人群 Y-SNP 遗传多态性研究以及法医学应用研究提供实验研究的依据.

[参考文献]

- [1] DIXON L A, MURRAY C M, ARCHER E J, et al. Validation of a 21-locus autosomal SNP multiplex for forensic identification purposes [J]. *Forensic Sci Int*, 2005, 154: 62-77.
- [2] KIDD K K, PAKSTIS A J, SPEED W C, et al. Developing a SNP panel for forensic identification of individuals [J]. *Forensic Sci Int*, 2006, 164: 20-32.
- [3] 王宝捷, 丁梅, 赵东, 等. Y 染色体 3 个 SNP 基因座及其单倍型的遗传多态性和群体差异 [J]. *中国法医学杂志*, 2002, 17(4): 195-197.
- [4] 杜宏, 张林, 周斌, 等. 微测序技术检测 12 个 Y-SNP 及其遗传多态性 [J]. *法医学杂志*, 2006, 22(2): 125-129.
- [5] ABLANCO-VEREA, MBRIO E, RAMOS-LUIS, et al. Forensic validation and implementation of Y-chromosome SNP multiplexes [J]. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2008, 1: 181-183.
- [6] MIGUEL ANGEL CHIURILLO, MARA ROJAS, NOELIA LANDER, et al. Development of Y-SNP typing assay for forensic application in Venezuelan population [J]. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2009, 2(1): 444-445.
- [7] ROBERT POMEROY A, GEORGE DUNCAN B, BULBIN SUNAR-REEDER C A, et al. Lowcost, highthroughput, automated single nucleotide polymorphism assay for forensic human DNA applications [J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 395: 61-67.
- [8] ANTONIO AMORIM, LUYSA PEREIRA. Pros and cons in the use of SNPs in forensic kinship investigation: a comparative analysis with STRs [J]. *Forensic Sci Int*, 2005, 150: 17-21.
- [9] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表 [M]. 北京: 科学出版社, 1994: 69.
- [10] 王兵, 王晓春. 均匀设计直观分析法优化 PCR 条件 [J]. *检验医学*, 2007, 22(5): 620-622.
- [11] 曹洪志, 颜其贵, 郭万柱, 等. 多重 PCR 技术在动物疫病诊断中的应用 [J]. *中国动物检疫*, 2007, 24(1): 45-48.

(下转第 52 页)

- tric oxide synthase expression in monocrotaline- induced pulmonary arterial hypertension in rats [J]. *Circulation*, 2001,104(21):945 - 950.
- [11] ESTEP J E, LAME M W, MORIN D, et al. [14C]monocrotaline kinetics and metabolism in the rat [J]. *Drug Metab Dispos*, 1991, 19 (1):135 - 139.
- [12] SPINALE F G, CRAWFORD F A, HEWETT K W, et al. Ventricular failure and cellular remodeling with chronic supraventricular tachycardia [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1991, 102:874 - 882.
- [13] GONZALES S, NORIEGA G O, TOMARO M L, et al. Angiotensin- (1-7) stimulates oxidative stress in rat kidney [J]. *Regul Pept*, 2002, 106(1-3):67 - 70.
- [14] TALLANT E A, FERRARIO C M, GALLAGHER P E. Angiotensin- (1 - 7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289 (4) :1 560 - 1 566. (2012 - 11 - 03 收稿)

(上接第 22 页)

- [12] 刘志杰,李如举,曾智勇,等. 多重PCR反应的影响因素及其优化[J]. *黑龙江畜牧兽医(科技版)*, 2011, (7): 26 - 28.
- [13] HENEGARIU O, HEEREMAN A, DLOUHY S R, et al. Multiplex PCR:critical parameters and step-by-step protocol[J]. *Biotechniques*, 1997, 23(3):504 - 511.
- [14] 朱岩芳, 祝水金, 王洋, 等. 均匀设计优化棉花ISSR-PCR 反应体系[J]. *棉花学报*, 2010, 22(3):202 - 208.
- [15] 刘瑞江, 张业旺, 闻崇炜, 等. 正交试验设计和分析方法研究[J]. *实验技术与管理*, 2010, 27(9):52 - 55.
- [16] 黄芳, 黄子杰. 均匀设计及其在药学研究中的应用[J]. *数理医药学杂志*, 2007, 20(5):20 - 22.
- [17] 朱红霞, 胡利宗, 邓小莉. 均匀设计优化野生狗牙根的SRAP-PCR 反应体系 [J]. *中国农学通报*, 2009, 25 (18):41 - 16.
- [18] 萨姆布鲁克J, 拉塞尔D W著. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 等译, 第3版. 北京:科学出版社, 2002:598 - 600.
- [19] TATIANA M, KARAFET, FERNANDO L, et al. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree[J]. *Genome Res*, 2008, 18:830 - 838.
- [20] SHI H, DONG Y L, WEN B, et al. Y-chromosome evidence of southern origin of the East Asian-specific haplogroup O3-M122 [J]. *Am J Hum Genet*, 2005, 77:408 - 419.
- [21] HINDS D A, STUVE L L, NILSEN, G B, et al. Whole - genome patterns of common DNA variation in three human populations[J]. *Science*, 2005, 307: 1 072-1 079. (2012 - 10 - 14 收稿)