

ABO Genotypes Were Identified by PCR-RFLP Method

Chenhang Wang, Yujia Kang, Jinlei Shi*

School of Life Science and Technology, Shanghai Tech University, Shanghai
Email: *shijl@shanghaitech.edu.cn

Received: Mar. 29th, 2020; accepted: Apr. 13th, 2020; published: Apr. 20th, 2020

Abstract

The substitution of several bases in ABO gene and the deletion of single base lead to the production of A, B and O alleles, which can make the erythrocyte membrane surface with different antigens, and thus form four blood type phenotypes. According to the differences of the key loci of the three alleles, the PCR-RFLP method was used to amplify the DNA fragments and perform specific enzyme digestion. The genotype could be preliminarily determined based on the enzyme digestion results, and then the enzyme digestion results are verified by sequencing method. In this study, ABO genotypes were identified for the first author and another student, and the results showed that the PCR-RFLP results were consistent with the sequencing results.

Keywords

PCR-RFLP, ABO Genotypes

PCR-RFLP方法鉴定ABO血型基因型

王晨航, 康宇佳, 石金磊*

上海科技大学, 生命科学与技术学院, 上海
Email: *shijl@shanghaitech.edu.cn

收稿日期: 2020年3月29日; 录用日期: 2020年4月13日; 发布日期: 2020年4月20日

摘要

ABO基因中几个碱基的替换、单碱基缺失导致A、B、O三种等位基因的产生, 可使红细胞膜表面带有不同抗原, 进而形成四种血型表型。根据三种等位基因关键位点的不同, 采用PCR-RFLP方法扩增DNA片

*通讯作者。

段并进行特异性酶切, 根据酶切结果可以初步判断基因型, 再通过测序的方法验证酶切结果。本实验对笔者和另一名同学进行了ABO基因型鉴定, 结果显示, PCR-RFLP结果与测序结果相一致。

关键词

PCR-RFLP, ABO基因型

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 背景介绍

ABO 血型系统是人类最早发现的一种血型分类系统[1], 在临床上具有重要意义。根据 ABO 基因参比序列(Genebank:NM_020469), ABO 血型基因位于人类染色体 9q34.2, 长度约 25 kbp, 包含 7 个外显子和 6 个内含子, 基因编码糖基转移酶。A 基因编码 N-乙酰半乳糖转移酶, 可使红细胞膜表面的 H 抗原的寡糖链末端携带 N-乙酰半乳糖胺, 成为 A 抗原。B 基因表达半乳糖转移酶, 可使 H 抗原的寡糖链末端携带半乳糖, 成为 B 抗原。O 基因由于碱基缺失形成移码变异, 表达产物无酶活性, 因此红细胞表面的 H 抗原无变化[2]。O 基因为隐性基因, A、B 基因为共显性, 二者对 O 基因完全显性。

根据 Yamamoto 等人的研究[3], B 基因的 cDNA 与 A 基因的 cDNA 相比有 7 个单碱基替换, 分别是 A294G, C523G, C654T, G700A, C793A, G800C, G927A。其中, C523G、G700A、C793A、G800C 导致编码的氨基酸改变, 使表达产物酶活性发生改变。G700A 位点位于外显子 7 内, 可被限制性内切酶 Alu I、Msp I 等特异性识别。O 基因的 cDNA 发生 258G 缺失, 导致第 352 位的 TTA 形成终止密码子 TAA, 提前终止翻译, 使产物失去活性。这一位点位于外显子 6 内, 可被 Kpn I 识别。

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)先 PCR 扩增目的片段, 再用限制性内切酶特异性识别并切割待测 DNA 片段, 然后对酶切产物进行电泳, 最终, 观察比较限制性图谱分析序列差异。PCR-RFLP 技术可用于各种基因型鉴定、细菌或真菌的菌种鉴定、基因突变的快速检测等。

本实验利用 PCR-RFLP 方法, 利用两对引物分别扩增 ABO 基因的第 6、7 外显子片段, 再根据 A、B、O 基因的序列不同, 利用限制性内切酶特异性识别序列, 通过酶切产物条带的不同来判断基因型。同时, 通过对 PCR 产物直接测序并比对, 再次验证基因型。

2. 实验材料与方法

2.1. 实验用品

2.1.1. 试剂

一管式口腔拭子 DNA 抽提试剂盒购自上海生工; 引物由金唯智合成; 高保真聚合酶试剂盒购自诺唯赞公司; DNA marker 购自全式金公司; 限制性内切酶购自 NEB 公司, 测序由上海铂尚生物公司完成。

2.1.2. 仪器与耗材

灭菌棉签, EP 管(1.5 mL、0.2 mL), 金属浴, PCR 扩增仪, 移液器, 琼脂糖凝胶电泳装置, 凝胶成像系统, 离心机, 250 mL 锥形瓶, 电子天平, 药匙, 微波炉, Nanodrop 超微量分光光度计。

2.2. 实验方法

2.2.1. DNA 提取

根据 DNA 抽提试剂盒的方法,用灭菌棉签刮取口腔上皮细胞,放入 1.5 mL EP 管,加入 200 μ L Qlysis-S Reagent 和 20 μ L 蛋白酶 K,室温放置 2 min,震荡混匀 5 min。将灭菌棉签上的液体全部挤压在离心管内,弃掉棉签。室温放置 5 min,95 $^{\circ}$ C 金属浴 3 min。向离心管中加入 200 μ L buffer NST,震荡混匀,12,000 rpm 室温离心 5 min。取上清作为 PCR 扩增的 DNA 模板。分别提取笔者自己和班内另一名同学的 DNA。

2.2.2. PCR 扩增

根据参考文献[4] [5],设计 2 对引物如下。

引物 1: 5'-CGGAATTCACCTCGCCACTGCCTGGGTCTC-3';

引物 2: 5'-CGGGATCCATGTGGGTGGCACCCTGCCA-3';

引物 3: 5'-GTGGAGATCCTGACTCCGCTG-3';

引物 4: 5'-CACCGACCCCGAAGAA-3'。

引物 1、2 用于扩增包含 6 号外显子的片段,片段长度 252 bp;引物 3、4 用于扩增 7 号外显子的片段,片段长度 159 bp。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,最后 4 $^{\circ}$ C 保温。PCR 结束后使用 Nanodrop 测量产物浓度和纯度。

2.2.3. PCR 产物鉴定及测序

用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,设定电压 130 V,时间 25 min。取 9 μ L PCR 产物混合 1 μ L 10 \times loading buffer 上样。如果得到目的条带,取 20 μ L PCR 产物送测序。

2.2.4. 酶切消化

使用 Kpn I 消化引物 1、2 扩增的 PCR 产物,使用 Alu I 消化引物 3、4 扩增的 PCR 产物。酶切反应体系为 20 μ L,37 $^{\circ}$ C 金属浴 3 h。

2.2.5. 酶切片段检测

配制 3% 琼脂糖凝胶进行电泳,设定电压 130 V,时间 30 min。取 9 μ L PCR 产物混合 1 μ L 10 \times 上样缓冲液上样,根据条带判断基因型。

2.2.6. 测序结果比对分析

使用 MEGA-X,将测序结果与 ABO 基因参比序列(GeneBank: NM_020469)进行序列比对,判断基因型。

3. 实验结果

3.1. PCR-RFLP 鉴定结果

引物 1、2 用于扩增一段包含第 6 外显子的 252 bp 的序列,用于区分 O 基因。O 基因在该序列上有 Kpn I 酶的特异性识别位点,可被水解成 169 bp 和 83 bp 长度的两段 DNA。但 A、B 基因上无法被识别,因此不会被酶消化。引物 3、4 用于扩增第 7 外显子上的 159 bp 长的序列,B 基因在该区域上有 Alu I 的识别位点,可形成 118 bp 的条带,而 A、O 基因缺少识别位点。表 1 为酶切结果与对应的基因型。

本次实验提取了笔者和另一位同学的 DNA 进行鉴定,分别记为 #1、#2。每人的 DNA 都用 2 对引物分别扩增,记为 #1-12、#1-34、#2-12、#2-34。PCR 产物浓度及纯度如表 2 所示,PCR 电泳结果如图 1(a)所示,酶切结果如图 1(b)所示。PCR 产物浓度较高, A_{260}/A_{280} 在 1.7~1.9 范围内,表明 DNA 纯度较好,

电泳条带清晰,无非特异性扩增,引物 1、2 扩增的片段均在 252 bp 处有条带,引物 3、4 扩增的片段均在 159 bp 处有条带,结果符合预期。#1-12、#2-12 的酶切结果均只有 252 bp 一个条带, #1-34 酶切结果只有 159 bp 条带, #2-34 酶切结果有 159 bp 和 118 bp 两个条带, 118 bp 条带颜色略浅。根据酶切结果,对应表 1,可知#1 基因型为 AA, #2 基因型为 AB。

Table 1. Digestion results and corresponding genotypes

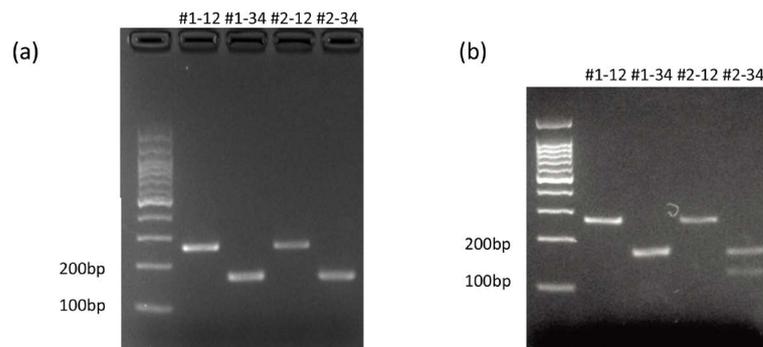
表 1. 酶切结果与对应基因型

基因型		AA	AO	BB	BO	AB	OO
引物 1、2 扩增片段	252 bp	√	√	√	√	√	
	169 bp		√		√		√
	83 bp		√		√		√
引物 3、4 扩增片段	159 bp	√	√		√	√	√
	118 bp			√	√	√	

Table 2. The concentration and purity of PCR products

表 2. PCR 产物浓度及纯度

	浓度(ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
#1-12	510.8	1.77	0.78
#2-12	502.9	1.78	0.80
#1-34	506.0	1.77	0.78
#2-34	470.7	1.79	0.81



(a) PCR 产物电泳结果。#1-12 是#1 的 DNA 提取物用引物 1、2 进行 PCR 扩增的产物,长度为 252 bp; #1-34 是#1 的 DNA 提取物用引物 3、4 扩增的产物,长度为 159 bp。同理, #2-12、#2-34 是#2 的 DNA 提取物分别用引物对 1、2 和引物对 3、4 扩增的产物,分别长 252 bp、159 bp。(b) 酶切反应结果。#1-12 是#1 的 DNA 提取物用引物 1、2 扩增,再用 Kpn I 酶切得到的产物,由图中可知仅有 252 bp 一个条带。#1-34 是#1 的 DNA 提取物用引物 3、4 扩增,再用 Alu I 酶切产物,仅得到 159 bp 条带。#2-12 是#2 的 DNA 提取物用引物 1、2 扩增, Kpn I 酶切,得到一个 252 bp 条带。#2-34 是#2 的 DNA 提取物用引物 3、4 扩增, Alu I 酶切,得到 159 bp 和 118 bp 两个条带

Figure 1. Electrophoresis results

图 1. 电泳结果

3.2. 测序结果

#1-12、#2-12 测序峰图清晰,无杂峰(如图 2(a)和图 2(b)),测序结果与参比序列比对后显示无碱基缺失(图 2(e)),表明均不携带 O 基因。#1-34 测序结果如图 2(c)所示,信号清晰,结果表明不携带 B 基因。

#2-34 测序结果出现双峰位点, 表明是携带 B 基因的杂合子。与参比序列比对的结果(图 2(f))表明#1 不携带 B 基因, #2 携带 B 基因。综合所有测序结果, 可得结论, #1 基因型为 AA, #2 基因型为 AB, 与之前的 PCR-RELP 结果相一致。

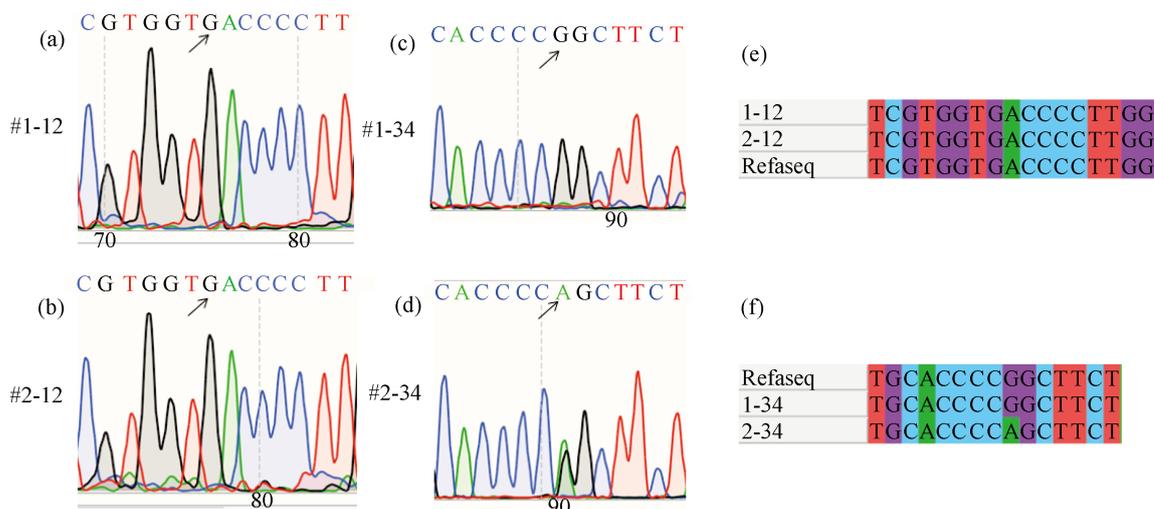


Figure 2. Sequencing results
图 2. 测序结果

4. 讨论

ABO 血型系统是一套应用最广泛的血型分类系统, 在临床输血、器官移植、法医检验鉴定等领域都有重要意义。血型的鉴定可通过抗原-抗体反应鉴定红细胞膜表面抗原种类, 但这种方法只能区分不同表型, 对 A 型血和 B 型血的个体不能确定是纯合子还是杂合子。A、B、O 等位基因的关键差异在于几个位点的单碱基缺失或替换, 因此, 如果想鉴定个体基因型, 可以对包含相关位点的片段进行测序; 可以采用 PCR-RFLP 方法, 选择能够识别相关位点的限制性内切酶, 通过是否被酶切判断相关位点的序列情况; 也可采用 AS-PCR 方法, 根据相关位点的序列变化设计引物, 通过扩增结果条带的有无、长度、数量来判断基因型。

本实验选择了 PCR-RFLP 方法。实验中根据参考文献、试剂使用说明等设计实验步骤, 进行实验, 根据实验结果修改步骤, 以得到更好的实验数据。比如在 PCR 时, 第一次 PCR 每种引物都加入 2 μL , 结果有引物二聚体生成, 第二次 PCR 就将每种引物用量改为 1 μL , 得到的结果就没有引物二聚体(如图 2(a)所示)。酶切反应时第一次使用 50 μL 反应体系, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 电泳结果条带非常浅, 不确定是否发生了酶切, 推测可能是 DNA 含量太少的原因; 第二次仍使用 50 μL 反应体系, 增加反应体系中的 DNA 含量, 延长反应时间为 1 h, 电泳结果条带依然很浅, 有很模糊的酶切后的短条带形成, 推测体系中 DNA 浓度仍然太低导致条带很浅, DNA 含量太低或酶切不充分导致酶切后的短条带非常模糊; 第三次为留出足够的 PCR 产物用于测序, 改用 20 μL 反应体系, 加入 6 μL PCR 产物, 使体系中 DNA 浓度比之前更高, 同时延长酶切反应时间至 3 h, 得到清晰结果(图 2(b))。

通过本次实验, 学生们对 ABO 血型系统有更深入的了解, 同时, 锻炼了查阅文献、设计修改实验方案的能力。本次实验是在遗传学实验《人的 ABO 血型测定》之后提出的自主性实验, 希望学生们能够设

计实验并检测自己血型所对应的基因型，是遗传学实验教学的有益尝试，达到了提高学生自主设计实验的目的，为以后的毕业设计打下坚实的基础。

基金项目

上海科技大学生命科学与技术学院本科生实验室运行经费——2019A0202-405-18。

参考文献

- [1] Landsteiner, K. (1900) Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Zentbl Bakt Parasitkde (Abt)*, **27**, 357-363.
- [2] 王静, 游国岭, 叶星辰, 等. B 等位基因新突变导致 AB 弱表型[J]. 中国输血杂志, 2017(30): 676-678.
- [3] Yamamoto, F., Clausen, H., White, T., *et al.* (1990) Molecular Genetic Basis of the Histo-Blood Group ABO System. *Nature*, **345**, 229-233. <https://doi.org/10.1038/345229a0>
- [4] 刘长利, 龚晓燕, 王卓研, 等. ABO 血型基因分型诊断方法的建立[J]. 北京医学, 2007(29): 745-747.
- [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.