

人ABO血型PCR与限制性片段长度多态性的遗传分析

白东升, 康宇佳, 石金磊

上海科技大学生命科学与技术学院, 上海

收稿日期: 2021年7月23日; 录用日期: 2021年8月13日; 发布日期: 2021年9月1日

摘要

由于三个等位基因 I^A 、 I^B 、 i 的不同组合, 红细胞表面带有不同的抗原, 因而ABO血型分为A型、B型、AB型、O型。其中A型血个体的基因型可能是 $I^A I^A$ 或 $I^A i$, B型血个体的基因型可能是 $I^B I^B$ 或 $I^B i$, 因此, 利用血清学方法无法直接判断A或B型血个体的基因型。根据 I^A 、 I^B 与 i 基因在序列上的区别, 应用PCR与限制性内切酶片段长度多态性相结合的技术, 可以进行人ABO血型的基因型鉴定。本实验用PCR-RFLP法对一名A型血个体进行基因型鉴定, 并用测序进行验证。结果显示, PCR-RFLP法与测序得到的结论一致, 说明该方法可行性较高。

关键词

PCR-RFLP, ABO血型, 自主设计, 开放式实验教学

Genetic Analysis of Human ABO Blood Type by PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism

Dongsheng Bai, Yujia Kang, Jinlei Shi

School of Life Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai

Received: Jul. 23rd, 2021; accepted: Aug. 13th, 2021; published: Sep. 1st, 2021

Abstract

Due to different combinations of alleles I^A , I^B and i , red blood cells carry different kinds of antigens, for which there are four blood types: A, B, AB and O in the ABO blood type system. Genotype of in-

dividuals with A blood type can be $I^A i$ or $I^A I^A$, and genotype of people with B type can be $I^B i$ or $I^B I^B$. As a result, we cannot know the genotype of people with A or B blood type directly by serological methods. According to the difference of sequences between I^A , I^B and i , we can use PCR combined restriction fragment length polymorphism method to identify genotype of human ABO blood type. In this experiment, we analyzed genotype of one individual with A blood type by PCR-RFLP and verified the result by sequencing. The result showed that the conclusion of PCR-RFLP and sequencing method is coincided, which means that PCR-RFLP is feasible.

Keywords

PCR-RFPL, ABO Blood Type, Self-Design, Open Experimental Teaching

Copyright © 2021 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. 引言

ABO 血型系统是第一个被描述的红细胞血型系统,也是最具有临床意义的一个系统[1]。ABO 血型由 I^A 、 I^B 、 i 等位基因的组合决定,其中 I^A 、 I^B 基因分别编码 N-乙酰半乳糖胺转移酶和 D-半乳糖糖基转移酶,可以对抗原前体 H 进行不同的修饰,从而得到 A、B 抗原; i 基因由于碱基缺失导致密码子移位,终止密码子提前出现,不能合成相关的酶,因此,抗原前体 H 保持不变[2]。基因型为 $I^A I^B$ 的个体为 AB 血型, ii 的个体为 O 血型, $I^A I^A$ 或 $I^A i$ 的个体为 A 血型, $I^B I^B$ 或 $I^B i$ 的个体为 B 血型。

人的 ABO 血型在分析家谱、亲缘关系鉴定等方面有重要的作用,因此鉴定个体的 ABO 血型和基因型有重要的意义。利用带有 A 抗原的红细胞遇到 A 抗体会凝集,带有 B 抗原的红细胞遇到 B 抗体也会凝集的特性,可以将抗体加入到血液样品中,如果发生凝集,则待测个体有对应的抗原。根据个体的抗原的种类,可以确定其血型。AB 或 O 型血的个体的基因型可以直接确定,但 A 或 B 血型的个体由于可能是杂合子或纯合子,基因型无法通过抗体凝集法确定。

ABO 血型决定基因定位于 9q34.1-9q34.2,包含了 7 个外显子和 6 个内含子。其中第 6、7 号外显子负责编码 ABO 糖基转移酶的催化结构域[3]。本文采用 Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)方法鉴定 A 或 B 血型个体的基因型。由于 6 号外显子上 G258 的存在, I^A 或 I^B 基因与 i 基因相比,在这个位点多出了一个 BstEII 酶的酶切位点,而少了一个 KpnI 酶切位点[3]。首先 PCR 扩增一段在 I^A 基因和 I^B 基因中完全相同且包含 G258 的 DNA 片段(i 基因中对应的片段没有 G258),然后用限制性内切酶处理 PCR 产物,最后进行琼脂糖凝胶电泳检测,根据条带来判断 PCR 产物的成分,进而确定待测个体的基因型。

2. 实验材料

2.1. 实验用品

2.1.1. 试剂

人唾液 DNA 提取试剂盒购自上海生工;高保真 PCR 试剂购自擎科公司;引物由上海铂尚公司合成;PCR 产物纯化试剂盒购自 MACHEREY-NAGEL 公司;DNA 10× loading buffer 购自诺唯赞公司;BstEII 和 KpnI 限制性内切酶购自 NEB 公司;DNA marker 购自全式金公司。

2.1.2. 仪器与耗材

移液器, 1.5 mL EP 管, 金属浴, PCR 仪, 琼脂糖凝胶电泳装置, 凝胶成像仪, 台式离心机, 锥形瓶, 药匙, 电子天平, 微波炉, NanoDrop2000 超微量分光光度计。

3. 实验方法

3.1. DNA 提取

分别收集一名 AB 血型个体、一名 O 型血个体和一名 A 型血个体的唾液, 按照人唾液 DNA 提取试剂盒的使用说明书提取 DNA。取 250 μ L 唾液至 1.5 mL EP 管中, 加入 350 μ L Buffer CL 和 20 μ L Proteinase K, 震荡混匀, 65 $^{\circ}$ C 水浴 20 min, 间或混匀。向离心管中加入 300 μ L 无水乙醇, 充分混匀, 然后将全部溶液和沉淀物转移至硅胶膜吸附柱内(吸附柱放入收集管中), 10000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中溶液, 将吸附柱放回收集管中。向吸附柱中加入 500 μ L Wash Solution (已经加过乙醇), 10,000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中溶液, 将吸附柱放回收集管中, 并重复一次。将吸附柱放回收集管中, 12,000 rpm 离心 2 min。取出吸附柱, 放入一个新的 1.5 mL 离心管中, 在吸附膜中央加入 50 μ L TE Buffer, 静置 3 min, 12,000 rpm 离心 2 min, 得到人唾液基因组 DNA, 并用 NanoDrop2000 测浓度。

3.2. PCR 扩增

根据 ABO 血型基因 6 号外显子序列设计引物如下:

引物 1: 5'-GCTGCTTCGTTCTCTCCTCT-3'

引物 2: 5'-TGAACACAAGGAGAGACCTC-3'

这两个引物可以用于扩增一段包含 G258 的区域, 序列长度为 674 bp。设置 4 组 PCR 反应: #1 组: 用 A 血型个体的 DNA 样品作为模板; #2 组: 用 AB 血型个体的 DNA 样品作为模板; #3 组: 用 O 血型个体的 DNA 样品作为模板; #4 组: 用等量 O 血型个体的 DNA 样品和 AB 血型个体的 DNA 样品作为模板。每组配置两管 50 μ L 反应体系。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。

3.3. PCR 产物鉴定、测序和纯化

用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 设定电压 130 V, 时间 25 min。每管取 1 μ L PCR 产物混合 0.1 μ L 10 \times loading buffer 上样。如果出现目的条带, 则每组各取一管送测序, 另一管进行 PCR 产物纯化, 用于后续实验。如果杂带较少, 则直接纯化; 如果杂带较多, 则将剩余 PCR 产物电泳并进行凝胶回收。

用 PCR 产物纯化试剂盒进行凝胶回收。将剩下的 4 管 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 设定电压 130 V, 时间 25 min。切下只含有目的条带的凝胶, 放入 1.5 mL EP 管中, 每 100 mg 凝胶加入 200 μ L Buffer NT1, 50 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 间或震荡。收集柱放入收集管中, 将液体倒入收集柱中, 11,000 g 离心 30 s。倒去废液, 将收集柱重新放回收集管中。向收集柱中加入 700 μ L Buffer NT3, 11,000 g 离心 30 s, 倒去废液, 将收集柱重新放回收集管中, 并重复一次。11,000 g 离心 1 min, 将收集柱放入干净的 1.5 mL EP 管中, EP 管用 70 $^{\circ}$ C 金属浴加热 2 min。向收集柱中加入 30 μ L Buffer NE, 室温静置 1 min, 11,000 g 离心 1 min。得到纯化的 DNA 片段。

3.4. 酶切消化

分别使用 BstEII 和 Kpn I 消化 4 种纯化后的 PCR 产物。构建 10 μ L 酶切反应体系和 10 μ L 对照体系(后者除了将限制性内切酶换为等量的双蒸水之外, 与前者完全相同), 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h。

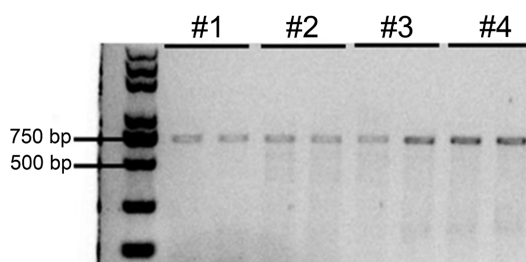
3.5. 酶切结果检测

配制 1% 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。

4. 实验结果

4.1. PCR-RFLP 鉴定结果

引物 1 和 2 用于扩增一段含有 G258 的片段, 用于区分 A 或 B 基因与 O 基因。图 1 为 PCR 的电泳检测结果, 可以看到每一管反应体系都出现了目的条带。A 或 B 基因的 PCR 产物(以下简称 pA)长度为 674 bp, 在 G258 的位置有一个 BstEII 酶切位点; O 基因的 PCR 产物(以下简称 pO)长度为 673 bp, 在缺失 G258 的位置有一个 KpnI 酶切位点。因此, pA 被 BstEII 酶切为 478 bp 和 196 bp 的片段, 被 KpnI 切为 530 bp 和 144 bp 的片段; pO 无法被 BstEII 酶切, 被 KpnI 切为 334 bp、195 bp 和 144 bp 的片段。不同基因型的个体的 PCR 产物由于含有不同的片段, 在经过酶切后会有不同的电泳结果。表 1 为基因型对应的电泳结果, + 表示会出现这个条带。注意表中标注的 DNA 片段的长度均为估计值, 实际长度可能与这些值相差几个碱基, 但这种微小的差异对琼脂糖凝胶电泳的结果基本没有影响。



PCR 产物纯化前电泳检测, 可以看到在 700 bp 附近都可以看到一条单一条带。

Figure 1. Results of PCR electrophoresis

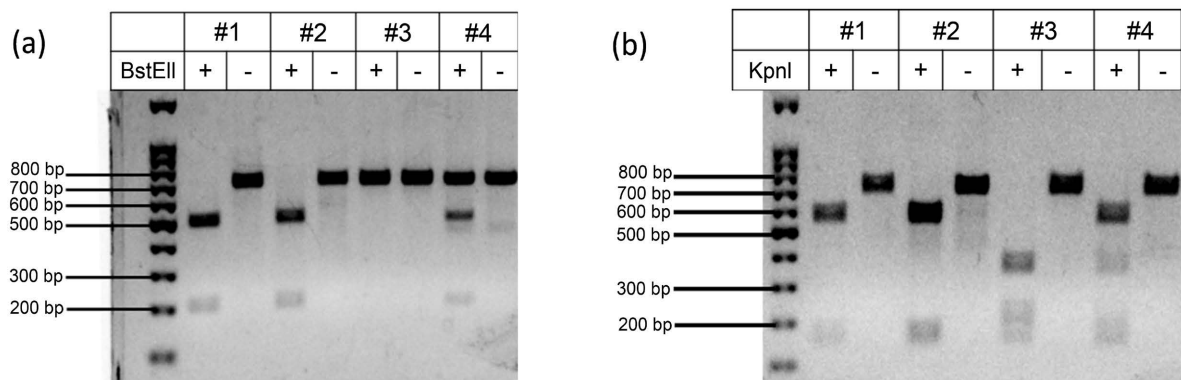
图 1. PCR 电泳结果

Table 1. Genotype and enzyme digestion results

表 1. 基因型与对应的酶切结果

基因型	血型	BstEII酶切			KpnI酶切				
		674 bp	478 bp	196 bp	674 bp	530 bp	334 bp	195 bp	144 bp
$I^A I^A$	A (纯合)		+	+		+			+
$I^A I^B$	AB		+	+		+			+
$I^B I^B$	B (纯合)		+	+		+			+
$I^A i$	A (杂合)	+	+	+		+	+	+	+
$I^B i$	B (杂合)	+	+	+		+	+	+	+
ii	O	+					+	+	+

本实验用 O 血型个体和 AB 血型个体的基因组样本作为对照, 检测了一名 A 血型个体的基因型。AB 血型个体的 PCR 产物(#2)中只有 pA; O 型血个体的 PCR 产物(#3)中只有 pO; 等量 AB 血型个体基因组和 O 血型个体基因组的混合物的 PCR 产物(#4)中有 pA 和 pO, 因而可以被看做 A 或 B 型血的杂合子的基因组 PCR 产物。图 2 为各组的 PCR 产物酶切后的电泳结果, 其中#1 为待测 A 型血个体的实验结果。从电泳结果可知, #1 的结果总是与#2 相同, 所以待测 A 血型个体为纯合子, 基因型为 AA。

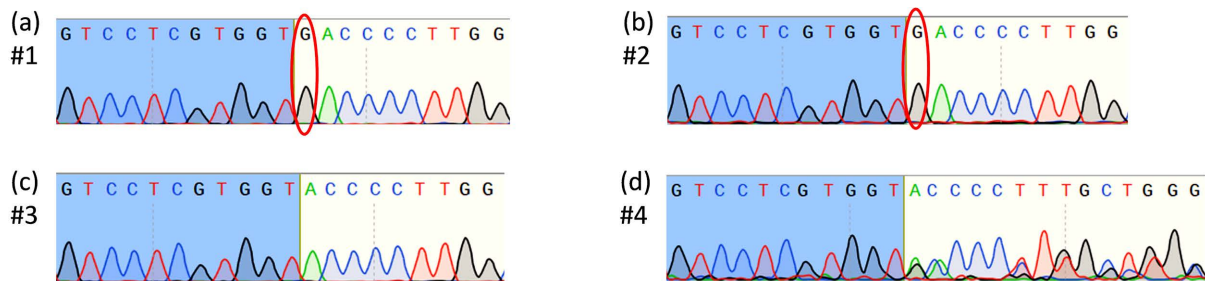


酶切电泳结果，+表示体系中加入酶，-表示将酶换为水。(a) BstEII 酶切电泳结果；(b) KpnI 酶切电泳结果。

Figure 2. Results of enzyme digestion electrophoresis
图 2. 酶切电泳结果

4.2. 测序结果

#1、#2 和#3 的测序峰图清晰，无杂峰(如图 3(a)、图 3(b)和图 3(c))。#1 和#2 中存在 G258，说明二者中只含有 pA；而#3 中没有 G258，说明#3 中只含有 pO。#4 的 G258 的位置有 G 对应的黑色峰，但从 G258 的位置开始全都是杂峰，且多数位置是两个不同颜色的峰(如图 3(d))。这说明#4 中有两种 DNA 片段，且其中一种片段(即 pA)有 G258，另一种(即 pO)没有，所以从 G258 的位置开始出现错位。#2、#3 和#4 的测序结果与之前预测的各组的 PCR 产物的成分对应。#1 的测序结果与#2 完全相同，说明待测的 A 血型个体为纯合子，基因型为 AA，这个结果与 PCR-RFLP 实验的结果相同。



(a) #1 的测序结果，红圈标出了 G258；(b) #2 的测序结果，红圈标出了 G258；(c) #3 的测序结果，没有 G258；(d) #4 的测序结果，虽然有 G258，但从此开始出现杂峰。

Figure 3. Sequencing results
图 3. 测序结果

5. 结语

ABO 血型是一种重要的血型分类系统，在输血、刑侦、鉴定亲缘关系等领域有重要的作用。利用红细胞在相应的抗体的作用下可以凝集的特点，可以快速判断待测个体的血型。如果确定该个体为 AB 型血或 O 型血，则基因型可以直接确定；但如果该个体为 A 型血或 B 型血，则抗体凝集的方法无法判断基因型。对于 A 或 B 型血的个体，判断其基因型最好用判断等位基因种类的方法。随着分子生物学技术的迅猛发展，血型的基因检测研究也取得了突破性进展。有通过双链探针，采用实时 PCR 方法对个体进行 ABO 血型基因的分型，也有应用单管 PCR，通过基因扫描(Gene Scan)的方法进行 ABO 血型基因的分型，还有采用分子信标的方法对 ABO 血型进行基因分型[2] [4] [5] [6]。

国内许多高校在遗传学实验教学过程中也经常采用 PCR-RFLP 技术对 ABO 血型进行基因分型, 并取得不错的教学效果[7] [8]。在实际的教学过程中, 我们发现由于 PCR 片段设计得过短, DNA 酶切并电泳之后, 小片段经常看得不是很清楚。因此, 我们重新设计了引物, 使 PCR 产物长度达到了 674 bp, 同时, 选用了 BstEII 和 KpnI 对一份 PCR 产物进行酶切分型, 简化了实验步骤, 大大提高了成功率, 所有的酶切分型结果同时用测序继续进行了验证, 证实本实验方法切实有效。为了更方便地确定结果, 在对 AB 血型 DNA 进行处理的同时也将等量 AB 型血的 DNA 与 O 型血 DNA 混合并处理。如果待测样本的酶切结果与 AB 型血 DNA 的酶切结果相同, 则待测个体为纯合子; 如果待测样本与混合 DNA 的酶切结果相同, 则个体为杂合子。这样不仅方便确定结果, 还可以证明 AB 型血的 DNA 的酶切结果与混合 DNA 不同的原因是二者的 DNA 成分不同, 而不是某个反应体系中酶切不彻底。

无论是 BstEII 酶切, KpnI 酶切, 还是测序, 结果都显示待测个体为纯合子。所以, 任何一种方法都可以鉴定 A 或 B 血型个体的基因型。考虑到测序所需要的时间较长, 所以推荐酶切法, 且只需要一种限制酶进行反应就可以得出结论。

本实验在加深学生对 ABO 血型系统的了解的同时, 锻炼了学生的动手能力和设计、优化实验方案的能力, 比如 PCR 的过程可以让学生根据电泳鉴定结果判断反应体系和程序是否合适, 进而掌握优化 PCR 反应的方法; 学生考虑设计几组实验、每组实验如何设计的过程可以增强学生的逻辑思考能力。通过最终的实验结果, 可以加深学生对复等位基因的理解, 同时领会表现型与基因型的关系。本实验是上海科技大学遗传学实验课程的自主设计实验, 旨在让学生通过自己设计实验, 感受到科研的趣味性和实际用途, 在实验成功后获得成就感, 为之后的科研生活打下基础。

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] 胡健, 等. ABO 血型综合实验基因分型技术简化及其群体遗传分析拓展[J]. *遗传*, 2017, 39(5): 423-429.
- [3] Yamamoto, F., *et al.* (1990) Molecular Genetic Basis of the Histo-Blood Group ABO System. *Nature*, **345**, 229-233. <https://doi.org/10.1038/345229a0>
- [4] 赵会安, 等. 单管实时 PCR 快速检验 ABO 基因型[J]. *中国法医学杂志*, 2007, 22(6): 363-365.
- [5] 刘长利, 等. 复合 PCR 技术在 ABO 血型基因分型中的应用[J]. *北京医学*, 2007, 29(2): 109-111.
- [6] 皮妍, 等. 遗传学实验的教学改革——经典实验与新技术相融合(一) [J]. *高校生物学教学研究(电子版)*, 2017, 7(3): 53-57.
- [7] 赵健, 等. 人类血型性状综合遗传大实验的设计与教学实践[J]. *遗传*, 2016, 38(5): 461-466.
- [8] 王晨航, 康宇佳, 石金磊. PCR-RFLP 方法鉴定 ABO 血型基因型[J]. *生物医学*, 2020, 10(2): 13-18. <https://doi.org/10.12677/HJBM.2020.102003>