

• 检验技术与方法 •

RFLP-PCR 和 ASP-PCR 方法对 AHSG 基因 SNP 位点检测^{*}

王 玲^{1,3}, 刘 华³, 王玉明³, 高冬花², 杨秋萍^{4△}

(云南省楚雄州人民医院:1. 内分泌科;2. 检验科 675000;云南省昆明医学院
第一附属医院:3. 检验科;4. 糖尿病科 650032)

摘 要:目的 建立 α 2-HS-糖蛋白(AHSG)基因 4 个位点 SNP(rs4917,rs4918,rs1071592,rs2248690)的分型技术,并分析该地区汉族人群中 AHSG 的基因型及等位基因频率。**方法** 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术及等位基因特异引物-聚合酶链反应(ASP-PCR)技术分别对 AHSG 基因 4 个位点 SNP 进行检测。**结果** 在汉族人群中 AHSG 基因 SNP rs4917 中 C 和 T 的等位基因频率为 80.2%和 19.8%,rs4918 中 C 和 G 的等位基因频率为 77.2%和 22.8%,rs1071592 中 C 和 A 的等位基因频率为 84.1%和 15.9%,rs2248690 中 A 和 T 的等位基因频率为 81.7%和 18.2%;以测序佐证检测结果的准确性。**结论** 在该地区汉族中存在 AHSG 基因 rs4917(C/T),rs4918(C/G),rs1071592(C/A),rs2248690(A/T)多态性;PCR-RFLP 和 ASP-PCR 两种方法对 AHSG 基因 SNP 分型稳定,其重复性、特异性和准确性均较好。

关键词: α 2-HS-糖蛋白; 单核苷酸多态性; 聚合酶链反应; 限制性片段长度多态性; 等位基因特异引物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.028 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)05-0595-03

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)指在基因组水平上由于单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性。因其在人类基因组中密度高、遗传稳定、易于分型等特点而被广泛应用于遗传作图、疾病相关性分析、群体遗传学和药物研究等领域,是当前相关学科研究的热点^[1-2]。目前 SNP 的检测方法较多,基于聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)的方法是大量使用的,最常用的有:(1)聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism, PCR-RFLP)技术;(2)等位基因特异引物-聚合酶链反应(allelic specific primer polymerase chain reaction, ASP-PCR)技术;(3)PCR 直接测序技术。本文通过 PCR-RFLP 和 ASP-PCR 方法对钙化抑制因子- α 2-HS-糖蛋白(α 2)-heremans-schmid glycoprotein, AHS-G)的 4 个 SNP(rs4917,rs4918,rs1071592,rs2248690)分别进行检测,并通过测序验证其检测结果,比较常用的不同 PCR 方

法对于 SNP 分型的检测。

1 资料与方法

1.1 一般资料 (1)研究对象:选择云南昆明地区汉族 333 例为研究对象,相互之间无血缘关系,其中男 171 例,女 156 例,平均年龄(56.02 \pm 8.56)岁。(2)标本采集:所有研究对象隔夜空腹 8 h 以上,清晨抽空腹血 2 mL,分别置于两支 EDTA-K₂管中各 1 mL,充分摇匀,彻底混匀,用于检测 AHSG 基因多态性。(3)仪器:PCR 基因扩增仪(美国 PE5700),Tanon 3500 紫外图像分析系统(上海天能),电泳仪(北京六一),BIO-RAD Gel Doc 1000 紫外分光光度仪(美国),Centrifuge 5415C 高速离心机(德国 Eppendorf)。(4)试剂:血液基因组 DNA 提取试剂盒由上海华舜生物技术公司提供,Tag 酶(耐热性 DNA 聚合酶)、dNTP、10 \times PCR 缓冲液、Hin1 II (Nla III)内切酶、SacI 内切酶购于立陶宛 Fermentas 公司,引物(见表 1)由上海捷瑞生物有限公司合成。

表 1 AHSG 基因 4 个 SNP 的引物

| SNP 位点 | 上游引物(P) | 下游引物(F) |
|-----------|--|-------------------------------------|
| rs4917 | P:5'-GTA AGG CAA CAC TCA GTG A-3' | F:5'-ACA CAG TAA GAT GGT TCT TC-3' |
| rs4918 | P:5'-GTA AGG CAA CAC TCA GTG A-3' | F:5'-TCA TCT CTG CCA TGT CTA G-3' |
| rs1071592 | P1:5'-CAA TGA AGC AGT CCC CAC A-3' P2:5'-CAA TGA AGC AGT CCC CAC C-3' | F:5'-TCT GTG CCA AAC CTC CTC AT-3' |
| rs2248690 | P1:5'-GAA CCC AGA GCT GTG TCA AAT-3' P2:5'-GAA CCC AGA GCT GTG TCA AAA-3' | F:5'-GGA AGG GAG GAT ACT CAG CAA-3' |

1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 提取 操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 PCR-RFLP 法检测基因型 (1)检测位点:rs4917 和 rs4918。(2)PCR 反应体系:rs4917 与 rs4918 模板 DNA 200 ng,Tag DNA 聚合酶 5 U,10 \times Buffer 5 μ L,25 mM MgCl₂ 2 μ L,dNTP 1 μ L,上、下游引物各 20 ng,加双蒸水补足为 50 μ L。(3)PCR 反应条件:①rs4917 的 PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,60 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s 共

循环 33 次,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。②rs4918 的 PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 60 s,62 $^{\circ}$ C 退火 60 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s 共循环 35 次,72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。(4)酶切:①rs4917,取 PCR 扩增产物 12 μ L,用 5 U 的 Hin1 II (Nla III)于 37 $^{\circ}$ C 过夜酶切。②rs4918,取 PCR 扩增产物 12 μ L,用 10 U 的 SacI 于 37 $^{\circ}$ C 过夜酶切。(5)电泳:制备 2%琼脂糖凝胶电泳,以 DL 1000 DNA 片段长度标准物为参考,加样后进行电泳,电压 100 V,当溴酚蓝移动到合适的位置后停止电泳。(6)结果判断:将电泳产物用 Tanon 3500 紫外图像分析系统进行 rs4917(C/T)基因型多

^{*} 基金项目:云南省自然科学基金项目资助(项目编号:2009CD166)。[△] 通讯作者,E-mail:YOP22@sohu.com。

态性与 rs4918(C/G)基因型多态性分析。

1.2.3 ASP-PCR 法检测基因型 (1)检测位点:rs1071592 和 rs2248690。(2)PCR 反应体系:rs1071592 与 rs2248690 模板 DNA 100 ng,Tag DNA 聚合酶 2.5 U,10×Buffer 2.5 μL,25 nM MgCl₂ 1 μL,dNTP 0.5 μL,上、下游引物各 10 ng,加双蒸水补足为 25 μL。(3)反应条件:①rs1071592 中 A 等位基因与 C 等位基因相同,94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 45 s,62 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 45 s 共循环 33 次,72 ℃过度延伸 5 min。②rs2248690 中 T 等位基因与 A 等位基因相同,94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 45 s,67 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 45 s 共循环 35 次,72 ℃过度延伸 5 min。(4)电泳:制备 2%琼脂糖凝胶电泳,以 DL 1000 DNA 片段长度标准物为参考,加样后进行电泳,电压 100 V,当溴酚蓝移动到合适的位置后停止电泳。(5)结果判断:将电泳产物用 Tanon 3500 紫外图像分析系统进行基因型分析:rs1071592(A/C)基因型多态性与 rs2248690(T/A)基因型多态性。

1.2.4 核苷酸系列测定 rs4917 和 rs4918 根据酶切结果,随机分别选取每个位点各 3 个不同基因型进行测序,测序引物同 PCR 扩增上游引物(见表 1)。rs1071592 和 rs2248690 随机分别选取 1 管不同等位基因型的 PCR 产物测序,测序引物为其下游引物(见表 1)。测序公司为大连宝生物有限公司,ABI PRISM™377XL DNA Sequencer 测序仪。

1.3 统计学处理 用 SPSS11.5 统计软件进行分析处理,应用基因计数方法计算出等位基因频率,用 χ^2 检验进行基因型 Hardy-weinberg 平衡吻合度检验。

2 结 果

2.1 SNP 基因型的确定

2.1.1 PCR-RFLP 对 SNP 基因型的确定 (1) rs4917(C/T) 基因型多态性,PCR 扩增片段为 298 bp,根据限制性内切酶 Hin1Ⅱ(NlaⅢ)酶切片段的情况,基因型有 3 种,CC 型(298 bp,1 条带),CT 型(57 bp,242 bp,298 bp,3 条带),TT 型(57 bp,242 bp,2 条带)。(2)rs4918(C/G)基因型多态性,PCR 扩增片段为 1 063 bp,根据限制性内切酶 SacⅠ酶切片段的情况,基因型有 3 种,CC 型(1 063 bp,1 条带),CT 型(354 bp,709 bp,1 063 bp,3 条带),TT 型(354 bp,709 bp,2 条带)。

2.1.2 ASP-PCR 对 SNP 基因型的确定 每个标本分别用 2 对引物扩增,若野生型引物可出现扩增带,而突变引物不能扩增出条带,则该标本基因型为野生型;反之为突变型纯合子。若均可出现扩增条带,则为杂合子。(1)rs1071592(A/C)基因型的扩增片段为 349 bp,在检测样品中发现 AA、AC、CC 共 3 种基因型。(2)rs2248690(A/T)基因型的扩增片段为 433 bp,在检测样品中发现 AA、AT、TT 共 3 种基因型。

2.1.3 核苷酸序列测定结果 rs4917(C/T)、rs4918(C/G)、rs1071592(A/C)、rs2248690(A/T)位点的不同基因型测定结果分别与 PCR-RFLP、ASP-PCR 的检测结果一致。

2.2 云南昆明地区汉族人群 AHSG 基因的 4 个 SNP 的基因型及等位基因频率 通过 Hardy-weinberg 平衡吻合度检验,该人群 4 个 SNP 位点基因型分布符合 Hardy-weinberg 平衡,表明研究资料具有群体代表性。其基因型及等位基因频率,见表 2。

表 2 AHSG 基因的 4 个 SNP 基因型及基因等位频率分布

| SNP | 基因型频率分布 n(%) | | | 等位基因频率分布 n(%) | | χ^2 | P |
|----------------|--------------|-----------|---------|---------------|-----------|----------|-------|
| rs4917(C/T) | CC | CT | TT | C | T | 0.997 | 0.607 |
| | 217(65.2) | 100(30) | 16(4.8) | 534(80.2) | 132(19.8) | | |
| rs4918(C/G) | CC | CG | GG | C | G | 4.294 | 0.117 |
| | 205(61.6) | 104(31.2) | 24(7.2) | 514(77.2) | 152(22.8) | | |
| rs1071592(A/C) | CC | AC | AA | C | A | 3.492 | 0.174 |
| | 247(74.2) | 66(19.8) | 20(6.0) | 560(84.1) | 106(15.9) | | |
| rs2248690(A/T) | AA | AT | TT | A | T | 8.238 | 0.016 |
| | 230(69.1) | 84(25.2) | 19(5.7) | 544(81.7) | 122(18.3) | | |

3 讨 论

研究发现,人类健康与疾病的个体差异性就在于其基因多态性,其中 SNP 作为第 3 代基因作图标记是最普遍的基因多态性^[3]。目前对 SNP 的基因型检测仍然大量使用 PCR-RFLP 法,其使用的必要条件是基因突变点位于限制性内切酶的识别位点处。有 3 种情况:(1)酶切后 PCR 产物长度无变化,说明此扩增片段无此酶的酶切位点(—/—);(2)杂合型(+/—),即 1 条染色体上有此酶的切点,而其等位基因没有此酶切位点,电泳图谱出现 3 条带;(3)PCR 产物被切开,说明 2 条染色体上均有此酶的切点,为纯合型(+/+)^[4]。ASP-PCR 法又称扩增受阻突变体系(amplification refractory mutation system, ARMS),其原理为分别在一端设计 2 条引物,一条为野生型,另一条为突变型引物,另一端设计 1 条共同引物。突变型引物的突变碱基设计在引物的 3'端,可以是与检测位点相同或互补,利用 Tag 酶缺乏 3'→5'外切酶活性的特点,在以突变型引

物扩增正常 DNA 模板时,在其 3'端就形成了错配,延伸反应就会因二磷酸二酯键形成困难而不能进行,也就得不到特异长度的条带,从而表明 DNA 无此模板;如果 PCR 结果能得到特异性长度的条带,表明模板 DNA 上具有与引物 3'碱基相应的突变^[5]。每个标本分别用 2 对引物扩增,若野生型引物可出现扩增带,而突变引物不能扩增出条带,则该标本基因型为野生型;反之为突变型纯合子。

本文就 AHSG 基因的 4 个 SNP 的基因型通过 PCR-RFLP 与 ASP-PCR 两种方法进行检测,运用 PREMIER5.0 软件,根据参考文献^[6-7]及引物设计原则,分别设计引物,都有较高的扩增特异性,可以确定突变的部位及性质,结果清楚。PCR-RFLP 方法对于 SNP 的基因型检测是较为传统的方法,但是人类基因组中只有不到 1/3 的多态性影响限制性内切酶的识别序列,使其运用有一定的限制^[8]。对于 SNP 为 rs1071592 和 rs2248690 的检测,由于没有合适的限制性内切

酶,故采用了 ASP-PCR 方法进行检测。与 PCR-RFLP 法比较而言,笔者认为对于 AHSG 基因 SNP 位点的检测 ASP-PCR 法具有以下优点:(1)由于不需要酶切来判断结果,故所需的 PCR 体系体积可较 PCR-RFLP 法明显减少,从而节约 Tag 酶和 dNTP。(2)DNA 模板为 100 ng 即可(本研究中 RFLP-PCR 的 DNA 模板为 200 ng),并且引物浓度也较 PCR-RFLP 方法低,故灵敏度较高。(3)ASP-PCR 法产物中无小的 bp 值的条带产生,易于判断结果。

总而言之,本文对 AHSG 基因 4 个 SNP(rs4917、rs4918、rs1071592、rs2248690)的检测,无论使用 PCR-RFLP 方法,还是使用 ASP-PCR 方法进行多态性的检测,其基因分型结果与 DNA 测序结果一致,说明 2 种方法对基因分型的特异性和准确性均较好。这也提示当 SNP 位点不能用传统的 RFLP-PCR 进行检测时,ASP-PCR 方法不失为一种简便、特异性高、费用少、便于推广(特别是群体基因多态性研究)的 SNP 检测方法。

参考文献

[1] Nachman MW. Single nucleotide polymorphisms and recombination rate in humans[J]. Trends Genet, 2001, 17(9): 481-485.

• 检验技术与方法 •

[2] Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms[J]. Nature, 2001, 409(6822): 928-933.

[3] 杨昭庆, 洪坤学, 褚嘉佑. 单核苷酸多态性的研究进展[J]. 国外医学遗传学分册, 2002, 23(1): 4-8.

[4] 张维铭. 现代分子生物学实验手册[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2003: 303-305.

[5] Myakishev MV, Khripin Y, Hu S, et al. High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers[J]. Genome Res, 2001, 11(1): 163-169.

[6] Yang YJ, Wang YB, Lei SF, et al. AHSG gene polymorphisms are associated with bone mineral density in Caucasian nuclear families[J]. Eur J Epidemiol, 2007, 22(8): 527-532.

[7] 李建华, 彭惠民. AHSG 基因 SNPs 与 2 型糖尿病相关性研究[J]. 湖北民族学院学报: 医学版, 2006, 23(3): 22-26.

[8] Oefner PJ. Sequence variation and the biological function of genes: methodological and biological considerations[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002, 782(1/2): 3-25.

(收稿日期: 2010-09-10)

结核生物蛋白芯片技术在结核病临床诊断中的价值探讨

白广红¹, 李耀军²

(1. 陕西省结核病防治院, 西安 710100; 2. 西安医学院第二附属医院 710038)

摘要:目的 利用结核生物芯片技术,探讨国产重组结核分枝杆菌蛋白 38 kD(γ TPA38)、16 kD(γ TPA16)和脂阿拉伯甘露糖(LAM)用于肺结核与肺外结核的早期诊断价值。**方法** 采用 CCD 原理结合视频采集方法,应用结核生物芯片检测系统,对门诊及住院患者血清标本 3 448 例进行了检测。**结果** LAM、16 kD、38 kD 结核生物蛋白芯片联合检测门诊患者 782 例,阳性 219 例,阳性率为 28.0%(219/782)。住院患者 2 666 例,结核生物蛋白芯片联合检测阳性 1 368 例,阳性率为 52.0%(1 368/2 666)。实验室检查了结核生物蛋白芯片联合检测阳性的 1 386 例住院患者的细菌涂片,其中菌阳患者 213 例,菌阴患者 1 155 例。还对 69 例健康人群及肺部其他疾病患者血清标本进行了 16 kD、38 kD、LAM 抗体的检测,结果阴性 66 例,特异性为 95.7%(66/69),3 448 例患者 3 种抗原联合检测,结果阳性 1 587 例,敏感度为 46.0%(1 587/3 448)。**结论** 结核生物芯片检测系统联合运用 16 kD、38 kD、LAM 3 种抗原检测其对应的抗体有较好的灵敏度和很高的特异性。对结核病血清学诊断有较高的参考价值。

关键词:分枝杆菌; 结核; 生物蛋白芯片

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.029

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)05-0597-03

结核病是由结核分枝杆菌引起的呼吸道传染病,其疫情呈现全球性的回升。快速、廉价、简单易用的结核病诊断技术,对诊断、治疗及控制预防结核病的发展均有重要意义。结核病的细菌学诊断是结核病诊断的“金标准”^[1]。但是传统的结核分枝杆菌培养操作复杂、耗时太长^[2]。用 BD-960 结核分枝杆菌培养仪培养费用较高。痰涂片找抗酸杆菌的阳性率较低,经过实验表明,用结核生物蛋白芯片技术对结核分枝杆菌的 16 kD (16 kD Protein)、38 kD (38 kD Protein)、脂阿拉伯甘露糖 (lipoarabinomannan, LAM) 抗原相对应的 3 种抗体进行联合检测,对结核病的临床诊断有较高的参考价值。对控制结核病的发展起到积极作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选取陕西省结核病防治院 2008 年 12 月至 2009 年 11 月间住院及门诊患者 3 448 例的血清标本,还选取了 40 例经过胸透、乙型肝炎等健康体检结果正常者。

1.2 仪器与试剂 结核生物蛋白芯片阅读仪由南京大渊生物技术工程有限责任公司提供,型号: PBT-X2; 批号: 苏药管械经

营许 20020059(更号)。结核分枝杆菌抗体检测蛋白芯片试剂盒,由南京大渊生物技术工程有限责任公司提供。

1.3 生物蛋白芯片检测原理 以微孔滤膜为载体,利用微阵列技术将纯化的 LAM、基因工程提纯并纯化的结核分枝杆菌蛋白 16 kD 和 38 kD 等 3 种抗原固相于同一膜上,并利用微孔滤膜的渗透浓缩、凝集作用,使抗原抗体反应在固相膜上快速进行,再以免金作为标记物直接在膜上显色。显色后的芯片放入芯片识别仪,在专门软件的支持下对不同抗原点阵的灰度值进行分析,与临界灰度值比较,大于或等于临界灰度值为阳性。

1.4.1 结核菌细菌学涂片镜检 操作方法参考《结核病诊断细菌学检验规程》^[3]。

1.4.2 生物蛋白芯片检测 先在芯片上标记样本编号,在芯片盒窗口内滴加 200 μ L 试剂 A,使膜表面全浸湿,待完全渗入后,室温放置 1 min,加待检血清 100 μ L,待血清完全渗入后,及时滴加 300 μ L 试剂 B,待试剂 B 完全深入后,滴加 50 μ L 试剂 C,待试剂 C 完全渗入后,最后滴加 300 μ L 试剂 D,反应完