

• 检验技术与方法 •

人 CISH 基因结核杆菌易感相关+1320 位点单核苷酸多态性检测方法的建立*

焦 杰, 谢玉为, 鄢 兰, 杜同信, 王自正, 俞 杨[△]

(南京医科大学附属南京医院/南京市第一医院核医学科分子诊断室, 江苏南京 210006)

摘要:目的 建立使用单碱基延伸技术检测人 CISH 基因结核杆菌易感相关+1320 位点单核苷酸多态性的方法。方法 制备人全血基因组 DNA 样本, 使用自行设计的引物扩增包含人 CISH 基因结核杆菌易感相关+1320 位点的片段并纯化, 通过单碱基延伸反应制备 CISH+1320 的样本, 采用毛细管电泳检测 CISH+1320 的单核苷酸多态性, 并使用 DNA 测序方法验证单碱基延伸方法的准确性。结果 7 例样本的单碱基延伸法检测结果与 DNA 测序结果完全符合。结论 单碱基延伸法可以用于人 CISH 基因结核杆菌易感相关+1320 位点单核苷酸多态性的检测, 结果准确可靠。

关键词:单碱基延伸; 结核分枝杆菌; 单核苷酸多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.031

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)11-1416-02

细胞因子可诱导的 SRC 同源区 2 结构域蛋白(CISH)是一种细胞因子信号转导的抑制物, 它可以调节 IL-2 的信号转导。Khor 等^[1]通过病例对照研究发现, CISH 编码基因特定的基因型与细菌、病毒、结核杆菌和疟疾的易感性相关, 其中+1320 位点的单核苷酸多态性(SNP)与结核杆菌的易感相关性最强。因此, 检测+1320 位点的 SNP 对于评价人群对结核杆菌的易感性有一定价值。本实验拟建立 PCR-荧光标记单碱基-毛细管电泳分离检测技术检测人 CISH 编码基因中+1320 位点基因型的方法, 以便于对其在结核杆菌感染预防与控制中的作用进行研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 7 例标本来源于南京市第一医院门诊患者。采集受试者静脉血 2 mL 入 EDTA 抗凝管中, 混匀后提取基因组 DNA。本研究符合南京医科大学伦理委员会伦理审查标准并取得患者的知情同意。

1.2 仪器 使用 Bio-rad S1000TM Thermal Cycler PCR 扩增仪进行 PCR 反应, Bio-rad Gel DOCTM EZ Imager 成像仪进行电泳后成像分析, 单碱基延伸产物分析使用 Beckman CEQTM 8000 遗传分析仪。

1.3 核酸提取 使用 QIAamp DNA Blood Mini kit 提取全血标本基因组核酸, 按说明书操作。

1.4 引物设计 根据 NCBI GenBank 所示 CISH 基因核酸序列自行设计引物, 委托上海 Invitrogen 公司合成, 采用 HPLC 纯化。引物 Hcish2F: 5'-CAT TCC GGG GTC CCA TAGC-3'; 引物 Hcish2R: 5'-TCC AGA TAG CTT AGC CGG TC-3'; 延伸引物 Hcish1320F: 5'-CAA AGT TTT AGA CTG CTG CGC TCCA-3'。

1.5 PCR 反应 试剂来源于 Takara 生物公司。反应体系 50 μ L: ddH₂O 27 μ L, 10 \times PCR 缓冲液(不包含 Mg²⁺) 5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ L, dNTP(10 μ mol/L) 2 μ L, 上游引物 Hcish2F(10 μ mol/L) 1 μ L, 下游引物 Hcish2R(10 μ mol/L) 1 μ L, rTaq 酶 5 U, 基因组 DNA 10 μ L。在 PCR 仪上运行如下程序: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 64 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循

环。PCR 产物采用 Axygen PCR clean up 试剂盒纯化, 30 μ L 洗脱。

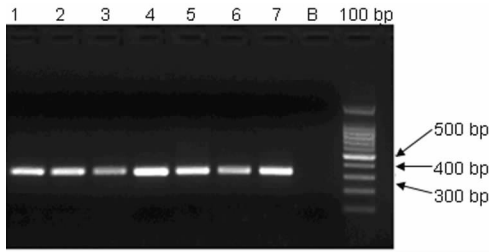
1.6 单碱基延伸反应 采用 Beckman Coulter Genome LabTM SNP Start Primer Extension Kit 按下述条件配置反应体系 10 μ L, 加入 0.2 mL PCR 管中: SNP Start 预混反应液 4 μ L, ddH₂O 3 μ L, Hcish1320F(1 μ mol/L) 2 μ L, 纯化的 PCR 产物 1 μ L。在 PCR 仪上运行如下程序: 94 $^{\circ}$ C 10 s, 45 $^{\circ}$ C 20 s, 25 个循环。延伸产物纯化采用 Takara CIAP 酶解过量的 ddNTP, 反应体系 50 μ L: ddH₂O 33 μ L, 10 \times 碱性磷酸酶缓冲液 5 μ L, CIAP 2 μ L, 单碱基延伸产物 10 μ L, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 65 $^{\circ}$ C 灭活 30 min, 瞬时离心, 收集样品。

1.7 单碱基延伸产物分析 采用毛细管电泳检测样本单核苷酸多态性位点。30 μ L 上样体系如下: 纯化的单碱基延伸产物 3 μ L, DNA Size Standard Kit-80 1 μ L, 上样缓冲液(SLS) 26 μ L。采用 Beckman CEQ8000 遗传分析仪检测, 对纯化后的单碱基延伸反应产物进行电泳, 运行 SNP-1 程序, 程序如下: 毛细管温度 50 $^{\circ}$ C, 在 Wait for Temp 一栏选择 Yes; 变性温度 90 $^{\circ}$ C, 持续时间 60 s; 暂停 0 min; 注入电压 2.0 kV, 持续时间 30 s; 分离电压 6.0 kV, 持续时间 16.0 min。SNP-1 程序结束后, 运行 Beckman CEQ8000 遗传分析仪分析软件中的片段分析(Fragments)程序, 根据 GenomeLab SNPStart 引物延伸试剂盒(Beckman; PN A23201)的说明书建立分析, 将默认 SNP 分析参数按说明书重新设置: 斜率阈值设成 30, 相对峰高阈值设成 20, 染料迁移校准选取 SNP ver. 2 程序, 以 DNA 标准品 S80(Beckman; PN 608395)为参照峰, 分析结果。

1.8 PCR 反应产物测序 将 1.5 中纯化后的 PCR 产物送金斯瑞公司进行双向测序, 得到测序结果, 用于单碱基延伸产物分析结果的验证。

2 结 果

2.1 电泳结果 7 例标本经提取基因组和 PCR 扩增后进行琼脂糖电泳后成像, 均可见片段长度约为 300 bp 的特异性条带, 与设计的目标片段长度(318 bp)相符, 空白对照未见扩增(图 1)。



1~7: 样本; B: 空白对照; 100 bp: DNA 标记物。

图 1 扩增靶片段的琼脂糖电泳图

2.2 单核苷酸位点检测正确性的评价 通过单碱基延伸和测序两组实验结果比对, 观察 PCR-单碱基延伸和 DNA 测序的结果符合率。单碱基延伸反应的结果分析中, 正确的峰应落在 S80 的个参照峰(分别为 13 nt 峰和 88 nt 峰)之间, 大小约在 23 nt。7 例标本均可见约 23 nt 的双峰或单峰, 单峰表示 AA 纯合野生型或 CC 纯合突变型; 双峰表示 AC 杂合突变型。DNA 测序结果通过直接分析序列找出相应位点获得。将 PCR-单碱基延伸分析结果与测序结果进行对比: 1 号、7 号标本结果显示为 +1320 位点的 CC 纯合突变, 2 号、3 号、6 号标本结果为 AA 纯合野生, 4 号、5 号标本结果为 AC 杂合突变。每例标本的 PCR-单碱基延伸方法的结果与 DNA 测序结果均完全符合。

3 讨论

结核病是由结核杆菌感染引起的慢性传染病, 结核菌可能侵入人体全身多种器官, 但主要侵犯肺脏, 是严重危害公众健康的呼吸道传染病, 被列为我国重大传染病之一。我国仍是全球 22 个结核病高负担国家之一, 世界卫生组织评估, 目前我国结核病年发病人数约为 130 万, 占全球发病人数的 14%, 位居全球第二位。近年来, 我国每年报告肺结核发病人数约 100 万, 始终位居全国甲乙类传染病的前列; 耐药药肺结核危害日益凸显, 每年新发患者人数约 12 万, 未来数年内可能出现以耐药菌为主的结核病流行态势; 防治工作亟待加强。现有检测多数用于判断是否已经感染结核杆菌、或是判断所感染结核杆菌的亚型等, 而不能从宿主的角度来判断其对结核杆菌的易感性, 因而预防工作受到一定限制^[2]。

CISH 蛋白是细胞因子信号抑制物(SOCS)家族中的一员, 具有调控 IL-2 信号通路的功能, 并和 T 细胞增殖密切相关。CISH 蛋白与细胞因子受体中磷酸化的酪氨酸残基结合, 屏蔽信号转导蛋白与转录激活子 5(STAT5)在细胞质中的停靠位点。因此, CISH 活性的提高阻碍了 STAT5 在细胞质中的停靠并降低了其活性, 从而抑制了下游细胞因子的信号转导。Khor 等研究证实, 人 CISH 编码基因 +1320 位点单核苷酸多态性与多个研究队列中的结核杆菌易感性有密切关系^[1]。+1320 位点位于 2 号外显子未翻译的部分, 其突变影响到 CISH 的转录表达, 最终影响到机体对于结核杆菌的易感性。Periasamy 等^[3]的研究也证实 CISH 有助于结核杆菌感染中 Treg 细胞的发育。

SNP 是后基因组时代的研究重点, 反应的是个体间的遗传差异。这种差异即是在基因组水平上由单个核苷酸的变异

引起的 DNA 序列多态性, 它具有密度高、遗传稳定、易于自动化分析等特点, 被认为是继限制性片段长度多态性、微卫星多态性之后的第三代遗传标记, 可用于基因定位、多态性分析等方面, 是研究疾病易感性、疾病诊断、药物筛选等的常用指标^[4-5]。

SNP 的检测有以下 4 种基本原理: (1) 等位基因特异性杂交; (2) 内切酶酶切技术; (3) 引物延伸法; (4) 寡核苷酸连接反应。引物延伸法是基于引物 3' 端碱基互补性的等位基因特异性延伸法, 是在双脱氧测序法的基础上发展出来的单核苷酸多态性检测方法^[3]。其主要原理是在待测 SNP 位点上游设计一条引物, 引物的 3' 端与待测 SNP 位点距离一个碱基, 通过加入不同荧光标记的 ddNTP 进行延伸反应, 只有当加入的 ddNTP 与 SNP 位点的碱基互补时, 引物才得以延伸, 并且发出荧光信号, 根据延伸反应的信号来确定 SNP 的类型。单碱基延伸法对于已知位点的 SNP 检测^[4,6], 不需要像测序法那样检测较长的无关片段, 只需要产生单个碱基的信号, 避免了无关片段的复杂结构对检测的干扰, 检测周期和成本均显著低于测序法, 结果可读性强; 而且该方法避免了杂交法中探针错配产生的假阳性信号, 显著提高了检测的信噪比, 准确性高。特别是多重引物延伸的方法, 可以同时检测多个位点, 更加快速简便, 节约人力物力, 降低检测时间和检测成本, 广泛应用于各种基因突变的检测^[7-8]。

本研究结果表明, 单碱基延伸法与测序法比较结果判断完全符合, 且更加简便易读, 干扰因素少, 检测周期短, 可用于检测人 CISH 编码基因中结核杆菌易感相关 +1320 位点。

参考文献

- [1] Khor CC, Vannberg FO, Chapman SJ, et al. CISH and susceptibility to infectious diseases[J]. *New Engl J Med*, 2010, 362(22): 2092-2101.
- [2] 肖东楼, 赵明刚, 王宇. 中国结核病防治规划实施工作指南(2008 年版)[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2009.
- [3] Periasamy S, Dhiman R, Barnes PF, et al. Programmed death 1 and cytokine inducible SH2-containing protein dependent expansion of regulatory T cells upon stimulation with *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *J Infect Dis*, 2011, 203(9): 1256-1263.
- [4] 汪维鹏, 倪坤仪, 周国华. 单核苷酸多态性检测方法的研究进展[J]. *遗传*, 2006, 28(1): 117-126.
- [5] 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.
- [6] 郝勇, 缪晓辉, 赵亚刚, 等. 单碱基延伸法检测乙型肝炎病毒 YMDD 基序变异[J]. *肝脏*, 2007, 12(3): 180-182.
- [7] 胡华, 李彩霞, 孙古亚, 等. 多重引物延伸的方法检测 β -地中海贫血[J]. *重庆医学*, 2007, 36(21): 2193-2195.
- [8] Briggs AW. Rapid retrieval of DNA target sequences by primer extension capture[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 772: 145-154.

(收稿日期: 2013-02-20)