

论著·基础研究

高分辨熔解曲线分析技术检测 ALDH2 和 ADH1B 基因多态性*

姜树朋, 童永清, 赵 锐, 李 艳[△]
(武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

摘要:目的 建立高分辨率熔解曲线分析体系检测乙醛脱氢酶-2(ALDH2)和乙醇脱氢酶-1B (ADH1B) 基因多态性。方法 针对 ALDH2 和 ADH1B 基因序列设计短片段引物,在核酸扩增后,使用 Eva Green 染料分析不同聚合酶链反应(PCR)产物,并与 Sanger 测序法相比较。结果 采用高分辨熔解曲线(HRM)法在同一程序下,90 min 内即可成功检测出 ALDH2 rs671 和 ADH1B rs1229984 各种基因型,且其结果与 Sanger 测序一致。结论 采用 HRM 法检测 ALDH2 和 ADH1B 基因多态性快速简单、经济有效,值得推广。

关键词:高分辨熔解曲线; 乙醇脱氢酶-1B; 乙醛脱氢酶-2; 单核苷酸多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.13.001 **中图法分类号:**R735

文章编号:1673-4130(2018)13-1537-03 **文献标识码:**A

High resolution melting analysis for detection of ALDH2 and ADH1B gene polymorphisms*

JIANG Shupeng, TONG Yongqing, ZHAO Rui, LI Yan[△]

(Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

Abstract: Objective To establish the system of high resolution melting for detection of aldehyde dehydrogenase 2(ALDH2) and alcohol dehydrogenase-1B (ADH1B) gene polymorphisms. **Methods** The short primers were designed for ALDH2 and ADH1B gene. Different PCR products were analyzed using Eva Green dyes after amplification, which were confirmed by Sanger sequencing. **Results** The genotypes of ALDH2 rs671 and ADH1B rs1229984 were successfully detected in the same procedure by HRM within 90min, and the results were consistent with Sanger sequencing. **Conclusion** The assay of HRM is simple, rapid, cost-effective, and reliable for the detection of ALDH2 and ADH1B polymorphism and it is worthy to be popularized.

Key words: high-resolution melting; alcohol dehydrogenase-1B; aldehyde dehydrogenase 2; single nucleotide polymorphism

单核苷酸多态性(SNP)作为第三代 DNA 遗传标记,是指在基因组水平上由单个碱基的变异所引起的 DNA 序列多态性,包括单个碱基的转换或颠换和单个碱基的插入或缺失。SNP 在群体中的发生频率不小于 1%,占有已知多态性的 90%以上。SNP 标记可用于高危群体的发现、疾病相关基因的鉴定、药物的设计和测试等,是人类基因组计划走向应用的重要步骤。乙醇脱氢酶-1B (ADH1B) 和乙醛脱氢酶-2 (ALDH2) 是编码酒精代谢相关酶基因中的关键基因,其主要单核苷酸多态性分别 rs1229984、rs671^[1], 对应这变异为 ADH1B c. 1510G>A 和 ALDH2 c. 143A>G。SNP 检测方法众多,如限制性片段长度多态性-聚合酶链反应(PCR-RFLP)、等位基因特异性 PCR(AS-PCR)、高分辨熔解曲线(HRM)分析、Taq-Man 探针技术、Sanger 测序等。本研究拟建立 HRM

法检测 ADH1B rs1229984、ALDH2 rs671 基因多态性。

1 材料与方法

1.1 材料 采集 58 例健康人群者外周血 2 mL, 乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂) 抗凝,保存于-20℃冰箱备用。

1.2 仪器与试剂 本研究使用所用主要试剂为外周血 DNA 提取试剂盒(上海星耀医学公司),EvaGreen 试剂盒(北京天根公司);主要仪器为 Smart LabAssist-32 核酸提取仪(上海星耀医学公司),NanoDrop 2000C 超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司),LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 按照上海星耀医学公司外周血

* 基金项目:国家重点临床专科建设项目(财社【2010】305号)。

作者简介:姜树朋,男,技师,主要从事临床分子诊断技术研究。△ 通信作者,E-mail:yanlitf1120@163.com。

本文引用格式:姜树朋,童永清,赵锐,等.高分辨熔解曲线分析技术检测 ALDH2 和 ADH1B 基因多态性[J].国际检验医学杂志,2018,39

DNA 提取试剂盒说明书进行 DNA 提取, 并使用 NanoDrop 2000C 超微量分光光度计测定患者样本 DNA 浓度和 OD_{260/280} 值, 确保 DNA 提取质量。

1.3.2 扩增原理 不同 DNA 分子的片段长度、GC 含量、碱基分布等是不同的, 任何双链 DNA 分子在加热变性时都会有其相对独特的熔解曲线形状和熔解温度^[2]。HRM 技术的基本原理就是在 PCR 反应之前加入饱和染料, 在 PCR 反应之后进行升温变性, 随着温度的升高, DNA 溶解, 插入 DNA 双链中的染料被释放, 荧光信号下降, 根据熔解曲线的不同来鉴别

不同标本基因型, 由于较高的温度均一性(即孔间差异小于 0.1 ℃)和温度分辨率(即每步最小升温幅度 0.02 ℃)使分辨精度可以达到对单个碱基差异的区分, 可有效检测单核苷酸多态性^[3]。

1.3.3 引物设计 根据 NCBI GenBank 收录的 ALDH2 r671 和 ADH1B rs1229984 序列, 采用 Prime3.0 设计短序列引物, 并于在线工具 Primer Blast 验证引物, 由大连宝生物工程公司合成的引物, 引物序列见表 1。

表 1 ALDH2 rs671 与 ADH1B rs1229984 HRM 基因分型引物序列

引物名称	引物序列		熔链温度(℃)	产物大小(bp)
ALDH2 rs671	前引物	5'-GGA GTT GGG CGA GTA CGG-3'	59.75	62
	后引物	5'-CAG GTC CCA CAC TCA CAG TTT-3'	60.13	
ADH1B rs1229984	前引物	5'-GGG ATT AGT AGC AAA ACC CTC AAA-3'	58.99	176
	后引物	5'-CAC CAG GTT GCC ACT AAC CAC-3'	61.42	

1.3.4 检测体系 经条件优化本研究扩增体系确定如下: Eva Green Mix 10.0 μL, 无核酶水 7.6 μL, DNA 1.0 μL(约 30 ng), 前引物和后引物均为 0.7 μL(10 μmol/L)。将上述体系 LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪中进行扩增, 条件为 95 ℃ 变性 5 min 后进行 PCR 循环, PCR 循环参数为 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 10 s, 72 ℃ 10 s, 共 45 个循环; 扩增结束后进入 HRM 程序: 95 ℃ 1 min, 40 ℃ 1 min, 65 ℃ 以 0.02 ℃/s 温度速率升至 95 ℃, 最后 40 ℃ 冷却 10 s。

1.3.5 验证 Sanger 测序法通常作为检测基因多态性的金标准, 以本研究建立的 HRM 法和测序法平行检测 58 例样本, 比较 ALDH2、ADH1B 基因型的结果进行正确性验证。

2 结 果

2.1 ALDH2 和 ADH1B 分型结果 当 LightCycler 480 PCR 仪程序运行结束后, 采用 LightCycler® 480 Scanning Module 软件中的 Gene Scanning 模块分析, ALDH2、ADH1B 基因多态性分型结果的原始曲线与导数曲线见图 1~4。

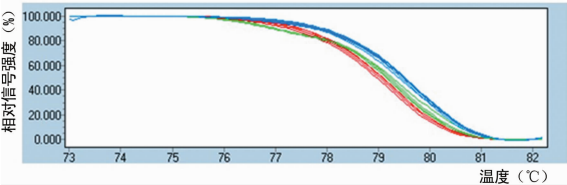
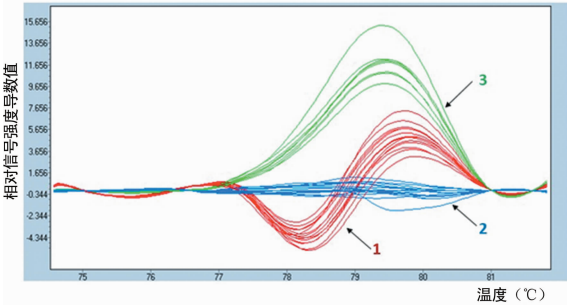


图 1 ALDH2 基因多态性分型结果的原始曲线

2.2 ALDH2 和 ADH1B 分型验证 在 58 例样本中, HRM 法检测出 ALDH2 GG 型 30 例, AG 型 24 例, AA 型 4 例; ADH1B AA 型 29 例, AG 型 26 例, GG 型 3 例, 与 DNA 测序法完全符合。采用已建立 HRM 法重复 3 次测定各种型别同一浓度的模板

DNA, 检测结果均相同。证实本研究建立的 HRM 法可用于检测 ALDH2、ADH1B 基因多态性。



注: 曲线 1 为 ALDH2 杂合子 AG 型, 曲线 2 为 ALDH2 野生纯合子 GG 型, 曲线 3 为 ALDH2 突变纯合子 AA 型

图 2 ALDH2 基因多态性分型结果的导数曲线

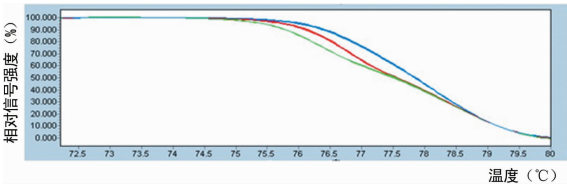
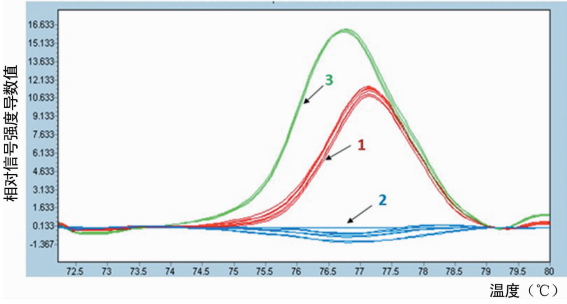


图 3 ADH1B 基因多态性分型结果的原始曲线



注: 曲线 1 为 ADH1B 杂合子 AG 型, 曲线 2 为 ADH1B 突变纯合子 AA 型, 曲线 3 为 ADH1B 野生纯合子 GG 型

图 4 ADH1B 基因多态性分型结果的导数曲线

3 讨 论

乙醇及其代谢产物乙醛可以通过多种途径损害肝脏正常的结构与功能,引起酒精性肝炎、酒精性肝硬化甚至肝癌^[4-5]。乙醇脱氢酶(ADH)介导的氧化途径是乙醇代谢为乙醛的主要途径,在肝脏中 I 型 ADH 活性最高,对乙醇氧化起着主要作用^[6]。当其 β -亚基编码基因 ADH1B 发生变异,即 ADH1B * 1 等位基因发生 c. 143G>A 变异,形成 ADH1B * 2 等位基因,乙醇脱氢酶活性增高,导致乙醇代谢为乙醛的进程加快。ADH1B 基因位于染色体 4q21-23 处,第 3 号外显子 rs1229984(c. 143G>A)是其最常见的遗传变异。在东亚人群中,ADH1B * 2 等位基因(即 A 等位基因)比例特别高,在我国浙江地区 ADH1B * 2 等位基因频率可达 98.5%^[7]。乙醛脱氢酶(ALDH)是机体内源性或外源性乙醛氧化的关键酶,最常见的 ALDH 有 4 种,即 ALDH1~ALDH4,其中只有 ALDH2 位于肝细胞的线粒体中,对乙醛氧化的 K_m 值最小^[8-9]。ALDH2 由 ALDH2 基因编码,当其编码基因发生变异,即 ALDH2 * 1 等位基因发生 c. 1510G>A 变异,形成 ALDH2 * 2 等位基因,乙醛脱氢酶活性降低,导致乙醛代谢减慢,造成乙醛在体内堆积,从而发生亚洲人脸红综合征^[9-10]。ALDH2 基因位于染色体 12q24.2 处,第 12 外显子 rs671 是最重要的遗传变异。在东亚人群中,ALDH2 * 2 等位基因(即 A 等位基因)可达 40%以上^[8]。

在本研究中采用 HRM 法在同一程序下,90 min 内即可成功检测出 ALDH2 rs671 和 ADH1B rs1229984 各种基因型,且其结果与 Sanger 测序一致。HRM 能够区分 DNA 序列中单个碱基变化(除了第三类 SNP, G/C 或者 A/T),采用相对廉价的饱和染料 EvaGreen 在 PCR 反应结束后就可以直接进行熔解曲线反应分析,全程闭管检测,与 TaqMan 探针法相比节约了大量检测费用^[11],是一种经济省时高效的基因多态性检测方法。但是 HRM 仍有应用局限性,只有 PCR 产物为小片段时,HRM 检测的敏感性和特异性才能达到 100%,因此对 HRM 引物设计要求比普通 PCR 相对较高。HRM 检测精确性受不同 DNA 浓度的影响^[12],所以必须要求起始模板量一致,同时 HRM 分析依赖饱和染料和具有精密控温能力的仪器才能实现准确检测。当待研究 DNA 序列的目标 SNP 位点由于受到同一扩增片段中的相邻突变位点或者 SNP 位点的干扰时,可能会导致 HRM 分型的失败。因此,采用高灵敏的 HRM 技术检测时,必须了解待研究 DNA 序列的目标 SNP 和附近可能存在突变位点或其他 SNP 位点具体情况。

4 结 论

本研究中采用 HRM 法检测 ALDH2 和 ADH1B 基因多态性快速简单、经济有效,为 HRM 技术的临床应用及大规模筛选 ALDH2 和 ADH1B 相关疾病易

感人群奠定基础。

参考文献

- [1] LI H, BORINSKAYA S, YOSHIMURA K, et al. Refined geographic distribution of the oriental ALDH2 * 504Lys (nee 487Lys) variant[J]. Ann Hum Gene, 2009, 73(3): 335-345.
- [2] MEHROTRA M, PATEL K P. High-resolution melt curve analysis in cancer mutation screen[J]. Meth Mole Bio, 2016, 1392(1): 63-69.
- [3] VOSSEN R H, ATEN E, ROOS A, et al. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening[J]. Hum Muta, 2009, 30(6): 860-866.
- [4] SORENSEN T I, ORHOLM M, BENTSEN K D, et al. Prospective evaluation of alcohol abuse and alcoholic liver injury in men as predictors of development of cirrhosis. [J]. Lancet, 1984, 2(8397): 241-244.
- [5] CHANG I C, HUANG S F, CHEN P J, et al. The hepatitis viral status in patients with hepatocellular carcinoma: a study of 3843 patients from Taiwan liver cancer network [J]. Medicine, 2016, 95(15): 3284.
- [6] GROPPA A, BEGUERET J, IRON A. Improved methods for genotype determination of human alcohol dehydrogenase (ADH) at ADH 2 and ADH 3 loci by using polymerase chain reaction-directed mutagenesis [J]. Clin Chem, 1990, 36(10): 1765-1768.
- [7] YI P, HONG S, QI X, et al. The ADH1B Arg47His polymorphism in east Asian populations and expansion of rice domestication in history[J]. BMC Bio, 2010, 10(1): 1-8.
- [8] CRABB D W, EDENBERG H J, BOSRON W F, et al. Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. The inactive ALDH2(2) allele is dominant[J]. J Clin Invest, 1989, 83(1): 314-316.
- [9] PENG G S, CHEN Y C, WANG M F, et al. ALDH2 * 2 but not ADH1B * 2 is a causative variant gene allele for Asian alcohol flushing after a low-dose challenge: correlation of the pharmacokinetic and pharmacodynamic findings[J]. Pharm Geno, 2014, 24(12): 607-617.
- [10] ZHAO Y, WANG C. Glu504Lys single nucleotide polymorphism of aldehyde dehydrogenase 2 gene and the risk of human diseases[J]. Bio Med Res Inter, 2015, 20(15): 174050.
- [11] ZHANG L, CUI G, LI Z, et al. Comparison of high-resolution melting analysis, TaqMan Allelic discrimination assay, and sanger sequencing for Clopidogrel efficacy genotyping in routine molecular diagnostics[J]. J Mole Diag, 2013, 15(5): 600-606.
- [12] EBIL I H, ILYAS M. High resolution melt analysis, DNA template quantity disparities and result reliability[J]. Clin Labor, 2015, 61(1/2): 155-159.