

论著·基础研究

亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性荧光 PCR 检测方法的建立与应用

刘秀卿,李延武,李卓成[△]

(深圳市第二人民医院检验科,广东深圳 518035)

摘要:目的 建立检测人亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因多态性荧光 PCR 的检测方法。**方法** 用 Primer Premier 5.0 和 Primer Express 3.0 软件针对人 MTHFR 基因 677 多态性位点分别设计 1 对引物和 2 条 TaqMan-MGB 探针,通过 GenBank 在线比对分析评估引物的特异性,优化建立荧光 PCR 反应体系。以 2 个检测通道的循环阈值(Ct 值)差值判断检测位点的基因型。评价该方法的最低检测限、准确度和精密度。用该方法检测 300 例临床样本,用核酸序列测定法对准确度进行评价。**结果** 建立的荧光 PCR 法对 MTHFR 677 位点检测具有较高的准确度,最低检测限到达 2 ng/反应。300 例临床样本的检测结果与测序法的检测结果的一致性为 100%。**结论** 建立的 MTHFR 基因多态性荧光 PCR 检测方法具有很好的准确度和精密度,适用于临床精准预测脑卒中发生风险和预后及指导孕妇个体化补充叶酸。

关键词: 亚甲基四氢叶酸还原酶; 基因多态性; 荧光 PCR**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.21.005**文章编号:** 1673-4130(2019)21-2576-04**中图法分类号:** R34**文献标识码:** A

Establishment and application of fluorescent PCR for detection of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism

LIU Xiuqing, LI Yanwu, LI Zhuocheng[△]

(Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen, GuangDong 518035, China)

Abstract: Objective To establish a fluorescent PCR method for detecting the polymorphism of human methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR)gene. **Methods** Primer Premier 5.0 and Primer Express 3.0 software were used to design a pair of primers and two TaqMan-MGB probes for the 677 polymorphic locus of human MTHFR gene, respectively. The specificity of the primers was evaluated by GenBank on-line comparison analysis, and the establishment of fluorescent PCR reaction system was optimized. The genotype of the locus was determined by the difference of cycle threshold (CT) values of two detection channels. The minimum detection limit, accuracy and precision of the method were evaluated. A total of 300 clinical samples were detected by this method, and the accuracy was evaluated by nucleic acid sequencing. **Results** The established fluorescent PCR method had high accuracy in detecting MTHFR 677 locus, and the minimum detection limit was 2 ng/response. The consistency between the results of 300 clinical samples and those of sequencing was 100%. **Conclusion** The established fluorescent PCR assay for MTHFR gene polymorphism has good accuracy and precision. It can be used to accurately predict the risk and prognosis of stroke and to guide pregnant women to individualize folic acid supplementation.

Key words: methylenetetrahydrofolate reductase; gene polymorphism; fluorescence polymerase chain reaction

亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)多态性,特别是 677 位点与多种临床疾病相关^[1-2];有研究认为 MTHFR 基因 C677T 多态性和血浆同型半胱氨酸水平、H 型高血压合并冠心病发病有一定相关性^[3];677 位点基因突变可导致酶活性下降,造成叶酸代谢障碍,引发多种新生儿出生缺陷及妊娠期疾病。所以对

该基因的基因型检测在临幊上具有重要意义。临幊上单核苷酸基因多态性的检测方法较多,包括 Taq-Man 荧光 PCR 法、荧光 PCR 溶解探针法、焦磷酸测序法、基因芯片检测方法、磁珠微粒法以及高通量测序法等^[4-9]。溶解曲线探针法容易受到反应实际组分差异的影响,如离子浓度差异导致溶解曲线的轻微变

作者简介: 刘秀卿,女,副主任技师,主要从事分子生物学临幊检测方面的研究。 **△ 通信作者:** E-mail: lizhuocheng@163.com。

本文引用格式: 刘秀卿,李延武,李卓成. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性荧光 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 国际检验医学杂志,2019,40(21):2576-2579.

性导致结果判断受干扰;焦磷酸测序、基因芯片检测操作复杂,流程较长,不适合临床广泛使用;高通量测序方法的检测通量大,但同样操作复杂,而且后续的数据分析复杂,需要专业的生物信息学分析人员分析结果。TaqMan 荧光 PCR 检测方法操作简单、检测速度快、检测通量适中、检测结果易于判断、临床应用广泛,是一种适合单核苷酸多态性检测的方法。本文基于 TaqMan 探针检测方法,期望建立一种适合于临床推广应用的 MTHFR 基因 667 位点快速检测方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2017 年 7—12 月于深圳市第二人民医院就诊患者的已检测标本。女 193 例,男 107 例,年龄 18~86 岁,中位数 43 岁,其中 120 例来至妇产科,为平滑肌瘤、卵巢囊肿及接受人工流产的妇科患者;120 例来至心内科,为胸闷、高血压、心肌梗死和冠状动脉性心脏病患者;另外 60 例来至体检科,为体检健康人员。真空采血管采肘前静脉血 2~3 mL,EDTA-K₂ 抗凝,每个样本均分为 2 管,保存于-70 ℃超低温冰柜,冻融次数不超过 3 次。

1.2 试剂与仪器 10×Taq buffer(Mg²⁺ plus)、dNTP(含 dUTP)、HS-Taq 和 UNG 酶购自日本 Takara 公司;25 mmol/L MgCl₂ 购自中国北京普洛麦格公司;甘油购自美国 Sigma-Aldrich 公司;血液基因组 DNA 提取试剂盒购自中国北京天根生化科技有限公司,货号 DP348;核酸扩增仪购自中国珠海黑马医学仪器有限公司,型号 HeMa9600;荧光 PCR 检测系统购自美国 ABI 公司,型号 7500;离心机购自德国艾本德公司,型号 5417C/R;超微量分光光度计购自德国 Implen 公司,型号 P-330-31。

1.3 方法

1.3.1 引物探针设计 从美国 NCBI 基因库下载人 MTHFR 基因的参考基因序列(NG_013351.1),选定第 4 外显子上的 rs1801133 多态性位点(c. C677>T)前后各 800 个核苷酸,用 Primer Premier 5.0 及 Primer Express 3.0 软件针对 MTHFR677 位点序列设计测序引物和荧光 PCR 引物及 TaqMan-MGB 探针。引物、探针由大连宝生物公司合成,见表 1。

表 1 测序 PCR 引物和荧光 PCR 引物探针

引物名	引物序列(5'-3')
677F1	TTT CAC TAT CTT GGA CCC CTG
677R1	CCA AAG TAC AAC AAA CCC T
677F2	CCG AAG CAG GGA GCT TTG
677R2	CGG TGC ATG CCT TCA CAA
677T	1 [*] FAM-CTG CGG GAG TCG A-MGB3 [*]
677C	2 [*] HEX-CGG GAG CCG ATT T-MGB

注:1^{*} 表示羧基荧光素;2^{*} 表示六氯荧光素;3^{*} 表示小沟结合物

将设计的荧光检测引物在美国国立生物技术信息中心网站比对,共比对到 25 条 MTHFR 基因序列,其中有 1 条序列(EF_026975.1)在 677F2 有 1 碱基突

变,突变后的序列为:CCG AAG CAG GGA TCT TTG。该引物组和序列 AL031594.9 有部分序列错配,其中 677R2 在该序列 97375—97358 位置有错误匹配,匹配序列为 TGC ATG CCT TCA CAA,错配部分的 DNA 的熔解温度(Tm 值)为 46.1 ℃;677R2 在该序列 95681—95698 位置有错误匹配,匹配序列为 CAT GCC TTC ACA A,错配部分的 Tm 值为 34.0 ℃。由于错配引物的 Tm 值和完全匹配的引物 Tm 差异较大,可以通过提升荧光检测 PCR 的退火温度避免引物错配。

1.3.2 普通 PCR 及测序反应 在核酸扩增仪上进行。MTHFR 667 位点的 PCR 总反应体系为 40 μL,包括 10×Taq buffer(Mg²⁺ plus)4 μL,2 U HS-Taq Ex 0.4 μL,25 mmol/L dNTP 0.32 μL,上游引物(667F1)终浓度 0.2 μmol/L,下游引物(667R1)终浓度 0.2 μmol/L;模版 DNA 20 ng,反应 40 μL。PCR 条件:95 ℃ 5 min;95 ℃ 15 s,56 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,循环数 40;72 ℃ 5 min。用正反引物对 PCR 扩增产物进行双向测序。

1.3.3 荧光定量 PCR 反应建立 在荧光 PCR 检测系统上进行。荧光 PCR 检测体系参考 HS-Taq Ex 酶说明书的组分浓度,在 0.2~0.4 μmol/L 范围内优化引物探针浓度,0.2~0.5 mmol/L 范围内优化 Mg²⁺ 浓度,0%~5% 浓度范围内优化甘油浓度。最总选定 PCR 反应总体积为 40 μL,包括终浓度 1×PCR Buffer,0.05 U/μL 的 HS-Taq Ex,UNG 酶 0.2 μL,25 mmol/L dNTP(含 dUTP)0.4 μL,4.5 mmol/L Mg²⁺,3% 甘油,上、下游引物(667F2/667R2)各 0.20 μmol/L,667T 探针、667C 探针各 0.25 μmol/L;模版 DNA 20 ng,ddH₂O 补足至 40 μL。最佳反应条件的优化,主要在 55~62 ℃ 优化退火温度。随着退火温度的提高(至 62 ℃),荧光 PCR 体系可更好检测位点的野生型和突变型。随着退火温度进一步升高,荧光 PCR 检测信号降低。选定荧光 PCR 的退火温度为 62 ℃。对比三步 PCR 方法(95 ℃ 5 min;95 ℃ 15 s,62 ℃ 40 s,72 ℃ 30 s,共 40 个循环)和两步 PCR 方法(95 ℃ 5 min;95 ℃ 15 s,62 ℃ 40 s,共 40 个循环),对相同样本检测的循环阈值(Ct 值)差值(ΔCt)在 1 以内。最终选定循环参数:95 ℃ 5 min;95 ℃ 15 s,62 ℃ 40 s,共 40 个循环,荧光 PCR 检测系统在 62 ℃时收集荧光信号。

结果判读:将每个检测通道的 Ct 值记录为 FAM 通道和 VIC 通道。通过计算 Ct_F 与 Ct_V 差值的绝对值($\Delta Ct = |Ct_F - Ct_V|$)来判断基因型, $\Delta Ct = 3.0$ 为突变型和野生型的临界值。如杂合突变型时则 $\Delta Ct < 3.0$;当 $\Delta Ct > 3.0$ 时会出现两种情况:如纯合野生型则 Ct_F < Ct_V;当而纯合突变型则 Ct_V < Ct_F。当 Ct_F 与 Ct_V 均无 Ct 时为检测失败,需对样本重新检测。

最低检测限确定:用 Sanger 测序法确定 MTH-

FR 667 位点野生型、纯合突变型和杂合型临床样本基因组 DNA。依据高浓度梯度差距大,低浓度梯度逐步降低的原则选定测试浓度,稀释梯度分别为 10、5、2.5 和 2 倍,用缓冲液分别稀释至 50.0、5.0、1.0、0.4 和 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 作为验证灵敏度样本,重复检测每个浓度 10 次。

精密度确定:用 Sanger 测序法确定选定 MTHFR 667 位点野生型、纯合突变型和杂合型临床样本基因组 DNA,用缓冲液稀释至 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 2 个浓度,用 TaqMan 荧光 PCR 试剂对上述样本进行检测,每个样本分别检测 20 次。以 FAM 通道和 VIC 通道 Ct 的变异系数小于 5% 为合格条件,统计 2 个通道的 ΔCt 的结果。

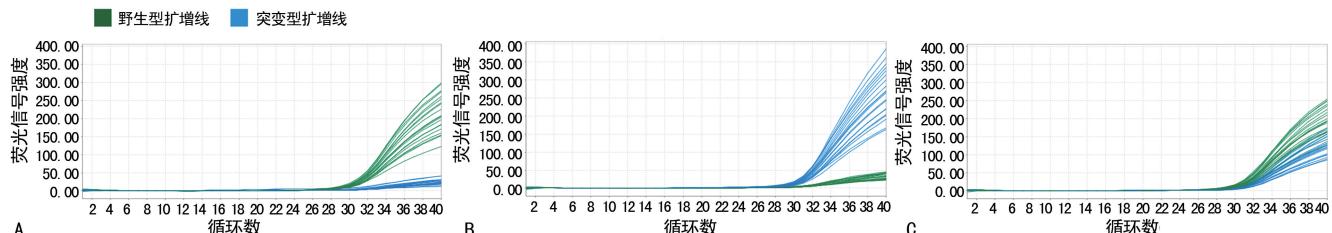
临床验证:根据试验目的,选定 300 例临床样本用于验证本文建立的检测方法。验证流程包括:用外周血基因组 DNA 提取试剂盒提取纯化临床样本,基因组 DNA 浓度和纯度检测(P-330-31 型微量分光光度计测定)。用 TaqMan 荧光 PCR 试剂检测样本基因组 DNA。用 Sanger 测序法作为对照方法验证开发的 TaqMan 荧光 PCR 的检测准确度。

2 结 果

2.1 最低检测限分析 根据实验结果初步选定本检测试剂的灵敏度是 2 $\text{ng}/\text{反应}$ 的人基因组 DNA。对野生型、纯合突变型和杂合突变型三种型别的样本,均稀释至该浓度(0.4 $\text{ng}/\mu\text{L}$)样本,分别重复检测 20 次,确定试剂盒的最低检测限是 2 $\text{ng}/\text{反应}$ 。见图 1。

2.2 精密度分析 FAM 通道和 VIC 通道 2 个通道 Ct 值的变异系数均小于 5%;纯合野生型和纯合突变型的 ΔCt 变异系数较小(<12.00%);杂合突变型的变异系数较大(9.57%~54.55%)。原因是两种纯合型的 2 个通道 ΔCt 较大而杂合突变型的 2 个通道 ΔCt 较小。在检测结果的标准偏差相似的情况下,杂合突变型的 ΔCt 变异系数远远大于纯合型。见表 2。

2.3 准确度分析 用荧光 PCR 方法检测 300 例临床样本的核苷酸类型,以测序结果为金标准,进行对比。荧光 PCR 检测结果如下:MTHFR 677 CC 型 155 例, MTHFR 677 CT 型 96 例, MTHFR 677 TT 型 49 例。与核酸序列测定结果相比较,结果一致性为 100%。见图 2。

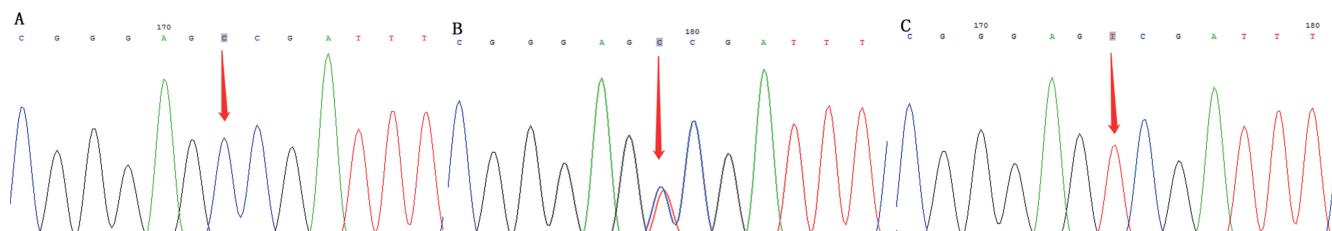


注:A 表示 MTHFR 667 位点野生型样本检测结果;B 表示 MTHFR 667 位点纯合突变型样本检测结果;C 表示 MTHFR 667 位点杂合突变型样本检测结果

图 1 最低检测限浓度样本的检测结果

表 2 MTHFR 667 位点精密度检测结果

样本类型	稀释浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$)	批次 1		批次 2		批次 3		批间差	
		ΔCt 平均值	变异系数 (%)						
纯合野生型	5	12.95	0.72	5.56	12.13	0.61	5.03	10.94	0.53
	1	10.10	1.16	11.49	11.04	0.41	3.71	10.24	0.25
纯合突变型	5	12.58	0.68	5.41	11.58	0.32	2.76	11.27	0.73
	1	9.41	0.01	0.11	9.87	0.12	1.22	10.92	0.12
杂合突变型	5	1.65	0.40	24.24	1.51	0.60	39.74	1.20	0.62
	1	1.20	0.35	29.17	2.09	0.20	9.57	2.63	0.22



注:A 表示 MTHFR 667 位点野生型样本检测结果;B 表示 MTHFR 667 位点纯合突变型样本检测结果;C 表示 MTHFR 667 位点杂合突变型样本检测结果

图 2 MTHFR 677 位点测序结果

3 讨 论

建立一种快速检测 MTHFR 677 位点的 Taq-Man 荧光 PCR 方法。通过设计 1 对针对 MTHFR 677 位点多态性的两种 TaqMan-MGB 探针,用两种荧光染料分别标记两种检测探针,在 1 个 PCR 反应管中同时检测两种基因型。在 PCR 检测结束后,通过计算每个样本两种荧光探针对应的检测通道的 ΔCt 的绝对值,并比较两个检测通道 Ct 值的大小,判定该位点的基因型^[6]。由于检测位点只有 1 个碱基差异,碱基序列差异小,使用 TaqMan-MGB 探针可选择更短的探针,以便 1 个碱基的差异的 T_m 值差异更大,有利于提高检测的特异性。同样是由于两种探针对同 1 种检测靶序列只有 1 个碱基差异,实际上无法做到探针完全无交叉检测,所以本研究采用两种探针对应的检测通道的 ΔCt 的绝对值来判断检测位点的基因型。因为非匹配靶标的探针即使能非特异结合待检测模板,但其匹配效率会远远低于和靶标完全匹配的探针的匹配效率,这就是采用 ΔCt 判断基因型的理论依据。这种方法在肿瘤突变检测也是证实可行的^[7]。

用建立的 MTHFR 677 位点检测方法,对 300 例临床样本进行检测,CT 型(96 例,占比 32%)、TT 型(49 例,占比 16.33%)和 CC 型(155 例,占比 51.67%),与报道不一致^[8],这可能与选取样本的随机性有关。以 Sanger 测序方法为标准方法,用建立的 TaqMan-MGB 荧光 PCR 方法对该 300 例的检测结果和标准方法的结果完全一致。证实了本方法的准确度。

MTHFR 多态性与众多临床疾病有相关性。MTHFR 作为 5,10-亚甲基四氢叶酸的代谢关键酶,与妊娠有着重要的相关性。有研究报道 MTHFR 与自然流产有关,C677T 变突的 MTHFR 将使酶活性明显下降,降低 MTHFR 活力,叶酸代谢发生障碍,导致合成的 5-甲基四氢叶酸减少,阻碍 DNA 甲基化传递,最终由于蛋白质及 DNA 甲基化不能满足胚胎的发育需求而引发流产^[9]。MTHFR C677T 变突与非综合性唇腭裂也有相关性^[10]。张俊等^[11]研究表明 MTHFR C677T 多态性与冠心病合并高血压患者有关联性^[11]。T 基因突变与冠脉病变程度具有相关性,携带 T 突变基因患者同型半胱氨酸水平和冠状动脉病变评分显著高于 CC 基因型的患者。由于 MTHFR C677T 多态性在临床上的应用广泛,众多的检测方法随之出现。TaqMan-MGB 荧光探针法可以在 1 个反应管中检测两种基因型,具有操作简单,检测成本低,准确度高的优点。该检测方法的研究重点在于对两种基因型设计有足够大的退火温度的荧光标记探针,

以便检测两种基因型模板的荧光信号有足够大的差异。同时,本研究使探针的浓度比例得到优化,使纯合型样本 FAM 通道和 VIC 通道的检测 ΔCt 尽可能大,杂合型样本 FAM 通道和 VIC 通道的检测 ΔCt 尽可能小。仍然存在不如人意的地方是 2 个检测通道 ΔCt 的变异系数比较大,还需进一步改进。

4 结 论

建立的 MTHFR 基因多态荧光 PCR 检测方法具有很好的准确度和精密度,适用于临床精准预测脑卒中发生风险和预后及指导孕妇个体化补充叶酸。

参考文献

- [1] 张俊,李妙男,陈斌,等. MTHFR C677T 位点基因多态性和同型半胱氨酸水平在冠心病合并高血压患者中的临床相关性分析[J]. 临床心血管病杂志,2018,3(2):152-156.
- [2] KAKAVAND H A, RADFAR M, AMOLI M M. Association between MTHFR variant and diabetic neuropathy [J]. Pharmacol Rep, 2018, 70(1):1-5.
- [3] 付龙,孙溢晗,张月兰,等. MTHFR 基因 C677T 多态性与 H 型高血压合并冠心病患者 HCY、冠状动脉病变的关系[J]. 中国医科大学学报,2015,44(4):351-356.
- [4] 陈丹,徐婷,张洁心,等. 实时荧光 PCR 用于 CYP2C19 基因多态性检测的性能验证[J]. 检验医学,2017,32(9):801-805.
- [5] 谭建强,黄钧,潘莉珍,等. 广西柳州地区新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症 G6PD 基因多态性检测[J]. 中国儿童保健杂志,2018,26(11):1164-1167.
- [6] 杨楠楠,徐琴,罗振元,等. 焦磷酸测序检测 CYP2C19 基因多态性方法的建立[J]. 中国医药导报,2017,14(29):11-14.
- [7] 许红丽,付文金. 液相芯片技术检测药物基因多态性的应用[J]. 基因组学与应用生物学,2018,37(5):2214-2219.
- [8] 金速速,余坚,陈向南,等. PCR-金磁微粒层析法检测 MTHFR C677T 基因多态性及初步临床应用[J]. 中国卫生检验杂志,2017,27(22):3196-3199.
- [9] ABDOLLAHI-FAKHIM S, ASGHARI E M, VARGHAEI P, et al. Common mutations of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in non-syndromic cleft lips and palates children in north-west of Iran[J]. Iran J Otorhinolaryngol, 2015, 27(78):7-14.
- [10] 秦刚,王秋旭,刘维贤. MTHFR 基因多态性与非综合征性唇腭裂易感性关系 Meta 分析[J]. 中国实用儿科杂志,2013,28(11):830-836.
- [11] 张俊,李妙男,陈斌. MTHFR C677T 位点基因多态性和同型半胱氨酸水平在冠心病合并高血压患者中的临床相关性分析[J]. 临床心血管病杂志,2018,34(2):152-156.

(收稿日期:2019-02-18 修回日期:2019-05-02)