

• 论 著 •

阿尔茨海默病患者载脂蛋白 E 3 种分型方法的比较*

王 琪,李 颖,秦 伟,魏一平,曹淑曼,贾建平
首都医科大学宣武医院神经疾病高创中心,北京 100051

摘 要:**目的** 采用竞争性等位基因特异性 PCR(KASP)法、单碱基末端延伸(SNaPshot)法对载脂蛋白 E (APOE)进行分型检测,并与 Sanger 测序法比较,以期获得更为高效、稳定、经济的中、高通量 APOE 分型手段。**方法** 选取既往收集的覆盖全部 6 种常见 APOE 分型的阿尔茨海默病(AD)及轻度认知障碍(MCI)患者全血核酸样本 48 份,根据 KASP 法和 SNaPshot 法技术原理设计实验识别 APOE 2 个关键单核苷酸多态性(SNP)位点 rs429358 和 rs7412,并对样本进行 APOE 分型检测。调整样本顺序重复检测以验证方法的稳定性和可重复性。扩大样本量,收集 AD、MCI 患者全血样本 107 份,采用上述两种方法进行 APOE 分型检测,Sanger 测序法验证。**结果** 采用 KASP 法和 SNaPshot 法对 48 份已知 APOE 分型样本的 2 次检测结果与原分型完全一致。进一步扩大样本量对 107 例样本进行分型检测,与 Sanger 测序法得到的结果完全一致。**结论** 采用 KASP 法和 SNaPshot 法进行 APOE 分型检测具有快速、准确、结果直观等特点,应用中、高通量 APOE 分型检测相对于 Sanger 测序法效率更高、成本更低,具有一定推广应用价值。

关键词:阿尔茨海默病; 载脂蛋白 E; 基因型; 竞争性等位基因特异性 PCR; 单碱基末端延伸

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.02.006 **中图法分类号:**R749.1+6

文章编号:1673-4130(2022)02-0156-05 **文献标志码:**A

Comparative study of three genotyping methods for apolipoprotein E in Alzheimer's disease*
WANG Qi, LI Ying, QIN Wei, WEI Yiping, CAO Shuman, JIA Jianping
High Trauma Center for Neurological Diseases, Xuanwu Hospital of Capital
Medical University, Beijing 100051, China

Abstract:**Objective** To develop a more efficient, stable and economical medium and high throughput method for detecting apolipoprotein E (APOE) genotypes based on kompetitive allele specific PCR (KASP) and SNaPshot methods and with the comparison with Sanger sequencing. **Methods** In this study, a total of 48 whole blood nucleic acid sample of Alzheimer's disease (AD) patients or mild cognitive impairment (MCI) patients with 6 kinds of APOE genotypes were selected. According to the principle of KASP and SNaPshot technology, experiments were designed to identify two key single nucleotide polymorphism (SNP) sites rs429358 and rs7412 of APOE, and APOE genotypes was carried out on the samples. The sample sequence was adjusted and the test was repeated to verify the stability and repeatability of the method. The sample size was expanded, another 107 whole blood samples from patients with AD and MCI were collected, and the above two methods for APOE genotypes were used. The results were validated by Sanger sequencing. **Results** There was complete concordance in the APOE genotypes between the two detection results by KASP and SNaPshot methods in 48 samples. Further on 107 samples, the results were completely consistent with those obtained by Sanger sequencing method. **Conclusion** The KASP and SNaPshot methods for APOE genotypes have the advantages of rapid, accurate, intuitive and so on. Compared to Sanger sequencing, the new methods are more efficient and cost-effective especially for medium or high throughput APOE genotypes, which have certain popularization and application value.

Key words: Alzheimer's disease; apolipoprotein E; genotype; kompetitive allele specific PCR; SNaPshot

阿尔茨海默病(AD)是一种遗传度很高的疾病,而载脂蛋白 E (APOE)是 AD 最为明确的风险基因^[1-2]。APOE 有 3 种主要亚型,分别为 APOEε2、ε3 和 ε4。这 3 种亚型由 APOE 基因两个邻近位点 rs429358 (C > T)和 rs7412 (C > T)的共同多态性导致,对 AD 的发生、发展产生不同影响。APOEε3 是最常见的类型, APOEε4 是 AD 的主要遗传风险因素,而 APOEε2 是 AD 发病的保护因素^[3-5]。

* 基金项目:北京市科学技术委员会课题(Z201100005520016、Z201100005520017)。
作者简介:王琪,女,主管技师,主要从事阿尔茨海默病遗传及发病机制方向的研究。
本文引用格式:王琪,李颖,秦伟,等. 阿尔茨海默病患者载脂蛋白 E 3 种分型方法的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(2): 156-160.

因此,APOE 分型成为 AD 研究中不可或缺的重要手段。目前受到普遍认可并被广泛使用的 APOE 分型方法主要包括 Sanger 测序法、Taqman 探针法等,但分别存在通量低、时效差或价格高昂等缺点^[6]。因此,建立高效、稳定、经济的中、高通量 APOE 分型方法具有极其重要的意义。竞争性等位基因特异性 PCR(KASP)法和单碱基末端延伸(SNaPshot)法都是得到认可的中、高通量单核苷酸多态性(SNP)检测方法,尤其是近年来兴起的 KASP 法,由于通量高、成本低、更具 SNP 位点适用性,已经成为国际上 SNP 分析的主流方法之一,但初期主要应用于植物育种^[7-8],在人类基因分型中尚鲜见应用。本研究旨在建立基于 KASP、SNaPshot 法,更为高效、稳定、经济的中、高通量 APOE 分型方法,为 AD 患者 APOE 分型研究提供更多方法选择。

1 材料与方法

1.1 材料来源 48 份已确定 APOE 分型的 DNA 样本来源于 2017—2019 年于首都医科大学宣武医院进行 APOE 分型检测的 AD 或轻度认知障碍(MCI)患者,该部分样本均采用普通 PCR 联合 Sanger 测序法确定 APOE 分型。为保证新建立检测方法的稳定性和可靠性,选取的 48 份样本覆盖 6 种常见的 APOE 分型,包括 2/2 型 5 份,2/3 型 6 份,2/4 型 6 份,3/3 型 11 份,3/4 型 12 份,4/4 型 8 份。进一步收集 2019 年 10—12 月于首都医科大学宣武医院就诊的 AD、MCI 患者的全血样本共 107 份,对所建立的方法进行扩大样本量验证。本研究获得首都医科大学宣武医院伦理委员会批准,批号为临研审[2017]004 号。

1.2 方法

1.2.1 外周血白细胞基因组 DNA 提取 所有全血样本均采用盐析法提取基因组 DNA,并经紫外分光光度仪定量。

1.2.2 基于 KASP 法的 APOE 分型检测 根据 APOE 变异位点序列信息,使用 Primer5 软件设计能够特异性识别 APOE 基因分型的 2 个关键 SNP 位点 rs429358 和 rs7412 的引物,见表 1。PCR 扩增目的片段,10 μL 体系如下:HiGeno 2X Probe mix(北京嘉程基因技术有限公司)5 μL,Primer mix 1 μL(北京睿博兴科科技有限公司),DNA 1 μL,ddH₂O 3 μL。反应

条件:95 ℃ 10 min;95 ℃ 20 s,61 ℃ → 55 ℃ (−0.6 ℃/cycles)45 s,10 个循环;95 ℃ 20 s,55 ℃ 45 s,35 个循环。ABI7500(ABI)上机采集 FAM 和 VIC 荧光信号,将检测得到的原始数据文件导入到 TaqMan Genotyper Software Version 1.3 分析软件中进行分析。上述引物合成及产物检测由北京睿博兴科科技有限公司完成。

1.2.3 基于 SNaPshot 法的 APOE 分型检测 根据 APOE 变异位点序列信息,使用 Primer5 软件设计引物。预扩增程序为 95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s×35 个循环;72 ℃ 7 min,4 ℃ ∞。30 μL 预扩增体系包括 Ruibio 2×Taq 15 μL,Forward primer(10 μmol/L) 0.5 μL,Reverse primer(10 μmol/L) 0.5 μL,DNA 1 μL,ddH₂O 13 μL,预扩增引物见表 2。预扩增产物纯化回收后延伸。采用 SNaPshot 试剂盒(ABI)对样本延伸,5 μL 延伸体系包括 Ready Reaction Mix 0.4 μL,5×seq Buffer,纯化后 PCR 产物 2.5 μL,检测引物(10 μmol/L)各 0.1 μL,ddH₂O 0.9 μL,检测引物见表 2。延伸程序为 96 ℃ 2 min;96 ℃ 10 s,50 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,共 35 个循环;14 ℃ ∞。Applied Biosystems 3730-XL 测序仪(ABI)上机检测,将检测得到的原始数据文件导入到分析软件中进行分析。上述引物合成及产物检测由北京睿博兴科科技有限公司完成。

1.2.4 普通 PCR 结合 Sanger 测序法进行 APOE 分型验证 使用 Primer5 软件设计引物,上游引物为 5'-AGA CGC GGG CAC GGC TGT CCA AGG A-3',下游引物为 5'-CCC TCG CGG GCC CCG GCC TGG TAC AC-3'。反应体系均为 50 μL,含 100 ng DNA 模板,上下游引物浓度为 0.5 μmol/L,dNTP (TAKARA)终浓度为 200 μmol/L,10×PCR 缓冲液(TAKARA)5 μL,rTaq 酶(TAKARA)终浓度为 50 000 U/L,DMSO 5 μL。扩增条件为:95 ℃ 预变性 5 min,主循环 30 次(变性 95 ℃ 30 s、退火 60 ℃ 30 s、延伸 72 ℃ 30 s),72 ℃ 再延伸 7 min。反应产物 Applied Biosystems 3730-XL 测序仪(ABI)进行测序,Chromas2.23 软件分析测序结果。上述引物合成及产物检测由北京睿博兴科科技有限公司完成。

表 1 基于 KASP 法的 APOE 分型引物序列

位点信息	rs429358	rs7412
Forward primer 1	CGG ACA TGG AGG ACG TGT	GCC GAT GAC CTG CAG AAG C
Forward primer 2	CGG ACA TGG AGG ACG TGC	GCC GAT GAC CTG CAG AAG T
Reverse primer	CGA GCA TGG CCT GCA CCT	GCA CGC GGC CCT GTT CCA CC

1.3 统计学处理 采用特异度和灵敏度评价 KASP、SNaPshot 法判断 APOE 分型的准确性,采用 χ^2 检验检测 3 种 APOE 分型方法有无差异,采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析,统计学检验水准设为 0.05,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基于 KASP 法的 APOE 分型 KASP 法通过对产物中荧光信号的识别,可以很好地进行 APOE 分型,见图 1。图 1A 是位点 rs429358 的分型结果,左上蓝色圆形聚集点为 FAM 荧光信号,识别的是 T 碱

图 2 为 APOE 基因 6 种分型的测序图,其中第 1 个峰为 rs429358 位点,第 2 个峰为 rs7412 位点。对已确定 APOE 分型的全血核酸样本 48 份进行检测及打乱顺序重复检测,其结果与样本已知分型一致,其灵敏度和特异度均为 100%。对 107 例 AD、MCI 患者进行扩大样本检测,与 KASP 法结果一致,差异无

统计学意义($P=1.00$)。

2.3 Sanger 测序法进行 APOE 分型验证 将上述样本用普通 PCR 扩增并 Sanger 测序后分析,结合每个样本 2 个 SNP 位点上的碱基情况得出的 APOE 分型数据与 KASP 法分型结果及 SnaPshot 法分型结果完全一致,差异无统计学意义($P=1.00$)。见图 3。

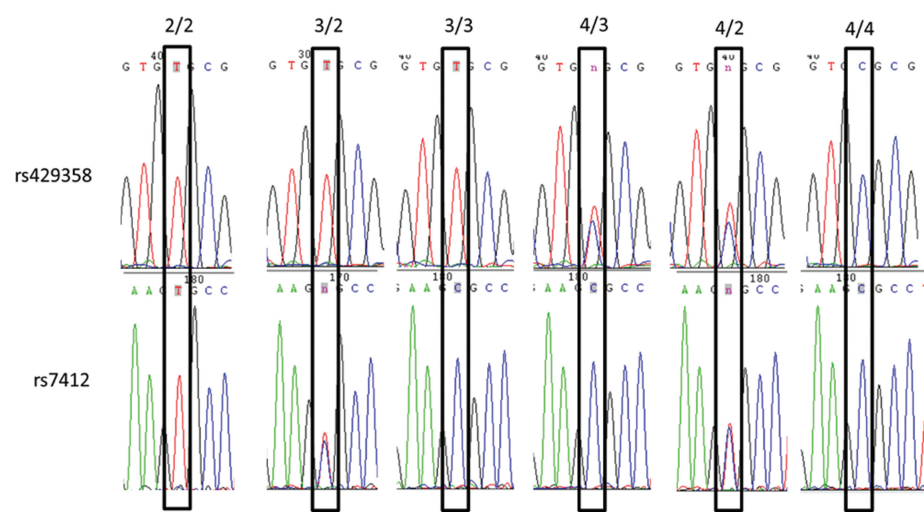


图 3 Sanger 测序法 APOE 分型测序图

3 讨 论

1973 年 HAVEL 等^[9]发现了一种“富含精氨酸”的蛋白质,1975 年 UTERMANN 等^[10]将这种蛋白质被命名为载脂蛋白 E,1982 年 ZANNIS 等^[11]明确了它的 3 种主要亚型,并命名为 APOEε2、ε3 和 ε4。这 3 种亚型在 112 位和 158 位氨基酸的变化,驱动蛋白质中的结构域相互作用,影响其生物学功能。随着 APOEε4 等位基因的数量增加,AD 的患病风险增加,发病年龄减小;随着 APOEε2 等位基因数量的增加,AD 发病风险降低,发病年龄增大^[3-5]。因此, APOE 分型在 AD 的基础或临床研究领域都成为不可或缺的重要手段。

近年来,随着各种新技术的涌现, APOE 分型方法有了越来越多的选择,较为经典的有聚合酶链反应限制性片段多态性(PCR-RFLP)法、Sanger 测序法和 TaqMan 探针法等^[6]。PCR-RFLP 法因所需材料设备简单,在早期得到广泛应用,但步骤烦琐且需对 PCR 产物进行第 2 次操作,现应用减少;Sanger 测序也称一代测序,常作为基因序列检测的“金标准”和 APOE 分型的验证方法,但通量低,成本略高,时效性较差;TaqMan 探针法效率高,耗时短,但由于需合成特异性探针引物,成本高昂。因此,本研究通过建立基于 KASP 法和 SNaPshot 法的 APOE 分型方法,希望能在满足大样本、中高通量 APOE 分型需求的同时降低检测成本。

KASP 法是近年来新兴的一种高通量 SNP 检测技术,是在等位基因特异性 PCR 基础上,再加入通用

荧光探针,通过设计 2 个 SNP PCR 引物,其 3'端各对应一个 SNP 的等位基因,5'端是一段特定的序列,与通用荧光探针序列一致,然后通过直接识别荧光信号来对 SNP 进行双等位基因判断。该技术初期在植物育种方面应用较多,随着技术的发展成熟,现已被应用于医学领域^[12-13]。它与 TaqMan 探针法原理类似,但不需要每个 SNP 位点都合成特异荧光引物,所有位点检测最终都可以使用通用荧光引物进行扩增,大大降低了成本。KASP 法对 DNA 样本的浓度和纯度要求不高,且每天可检测 SNP 及样本数均可达数万以上,具有精度高、灵敏度高、灵活性强、转换速度快、SNP 位点适用性更好的特点,已经成为国际上 SNP 分析的主流方法之一。与 APOE 分型相关的 SNP 位点只有 2 个,因此,在本研究中 KASP 法的优势主要体现在大样本量分型检测时的检测效率和单位成本上。当一次需要检测上千甚至上万的样本时, KASP 法可作为优先选择,比本研究中涉及的其他两种方法更加高效和节约成本。但目前利用 KASP 法进行 APOE 分型检测的研究尚不多见。

SNaPshot 法是基于荧光标记单碱基延伸原理的分型技术,也称小测序,是中等通量 SNP 分型较为适用的一种方法^[14-15]。它不受 SNP 位点多态特性限制,杂合、插入或缺失多态都可一个体系检测,一个反应可检测 1~10 个 SNP 位点,因此适用于检测两个 SNP 位点的 APOE 分型。该方法适合样本数目在几十到 1 000 的项目,相较于 Sanger 测序法可以极大地提高效率、降低成本,并且可以直接得到位点的碱基

组成,结果更加直观,具有一定优势。

使用本研究建立的 APOE 分型的 KASP 法及 SNaPshot 法对已知分型的 48 份样本进行检测及重复试验,其结果完全相符。进一步对新收集的 107 份样本采用 KASP 法、SNaPshot 法、Sanger 测序法检测 APOE 分型,3 种方法所得结果完全一致,共检出 2/3 型 4 份,2/4 型 1 份,3/3 型 59 份,3/4 型 40 份,4/4 型 3 份,其比例亦与中国大陆散发 AD 患者 APOE 分型比例相符^[16]。因此,本研究所建立的方法,不仅被基因序列检测的“金标准”Sanger 测序法验证,同时在 KASP 法和 SNaPshot 法结果之间也得到互相印证,再通过重复实验、分型比例比较等手段,进一步证实了其准确性、可靠性和可重复性。同时,本研究所使用的作为验证“金标准”的 APOE 分型的 Sanger 测序法,巧妙地将两个 SNP 位点设计在一个测序反应内,这也较常规针对两个位点分别扩增的方法简化了步骤,且节约了成本,在样本量不大,时效性要求不太高,或作为其他分型手段的验证时均可优先选择应用。

综上所述,本研究采用 KASP 法及 SNaPshot 法进行 APOE 分型检测,灵敏度和特异度高,与 Sanger 测序法相比,结果更直观和易判读,尤其在检测中、高通量样本时效率更高,成本更低,其中近年来新兴的 KASP 法更适合高通量检测,SNaPshot 法更适合中等通量检测,这为不同的研究需求提供了更优方法选择。

参考文献

[1] BELLOY M E,NAPOLIONI V,GREICIUS M D. A quarter century of APOE and Alzheimer's disease: progress to date and the path forward[J]. *Neuron*,2019,101(5):820-838.

[2] 王俊,郁金泰,谭兰. 寻找阿尔茨海默病的易患基因[J]. *中华神经科杂志*,2014,47(2):128-132.

[3] QIN W,LI W,WANG Q,et al. Race-related association between APOE genotype and Alzheimer's disease:a systematic review and Meta-analysis[J]. *J Alzheimers Dis*, 2021,83(2):897-906.

[4] MICHAEL E B,VALERIO N,MICHAEL D G. A quarter century of APOE and Alzheimer's disease: progress to date and the path forward[J]. *Neuron*,2019,101(5):820-838.

[5] YOUNG W K,ISMAEL A R,AMANDA K,et al. Har-

nessing the paradoxical phenotypes of APOEε2 and APOEε4 to identify genetic modifiers in Alzheimer's disease[J]. *Alzheimer Dement*,2021,17(5):831-846.

[6] 张磊,郑芳. 载脂蛋白 E 基因分型方法学进展及其临床意义[J]. *中华检验医学杂志*,2018,41(12):963-967.

[7] MAKHOUL M,RAMBLA C,VOSS-FELS K P,et al. Overcoming polyploidy pitfalls: a user guide for effective SNP conversion into KASP markers in wheat[J]. *Theor Appl Genet*,2020,133(8):2413-2430.

[8] YANG G,CHEN S,CHEN L,et al. Development of a core SNP arrays based on the KASP method for molecular breeding of rice[J]. *Rice (N Y)*,2019,12(1):21-27.

[9] HAVEL R J,KANE J P. Primary dysbetalipoproteinemia:predominance of a specific apoprotein species in triglyceride-rich lipoproteins[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1973,70(7):2015-2019.

[10] UTERMANN G,JAESCHKE M,MENZEL J. Familial hyperlipoproteinemia type III: deficiency of a specific apolipoprotein (apo E-III) in the very-low-density lipoproteins[J]. *FEBS Lett*,1975,56(2):352-355.

[11] ZANNIS V I,BRESLOW J L,UTERMANN G,et al. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes[J]. *J Lipid Res*,1982,23(6):911-914.

[12] 杨玲焰,王立鹏,荣荣. 恒河猴和食蟹猴 ABO 血型竞争性等位基因 PCR(KASP)检测方法的建立[J]. *中国比较医学杂志*,2019,29(8):31-36.

[13] JUTTADA U,KUMPATLA S,PARVEEN R,et al. TCF7L2 polymorphism a prominent marker among subjects with type-2-diabetes with a positive family history of diabetes[J]. *Int J Biol Macromol*,2020,159:402-405.

[14] ZHANG W,LIAO Q,LIU Y,et al. PTX3 gene polymorphism associated with cryptococcosis in HIV-uninfected Chinese patients[J]. *Mycoses*,2021,64(4):405-411.

[15] JIANG Y Y,LI J L,LIU L Y,et al. Association between polymorphisms in ABO gene and stroke patients with small artery occlusion in southern Chinese Han population[J]. *Gene*,2021,769(2):145211.

[16] JIA L,XU H,CHEN S,et al. The APOE epsilon4 exerts differential effects on familial and other subtypes of Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Dement*, 2020, 16 (12):1613-1623.

(收稿日期:2021-03-28 修回日期:2021-07-29)