

连接酶反应技术检测冠心病三个相关基因的单核苷酸多态性

缪应新 甘洁民 施泓 陈洁 周晓倩 赵虎

作者单位:200040 上海市,复旦大学附属华东医院检验科

【摘要】 目的 利用聚合酶链反应-连接酶反应(polymorphism chain reaction-ligase detection reaction, PCR-LDR)技术检测瘦素受体基因 Lys109Arg(A/G)、Gln223Arg(A/G)、脂联素基因 G276T、T45G、护骨素基因 T950C、G1181C 六个多态性位点的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)。**方法** 参照待测多态性位点所在 DNA 序列设计并合成一对引物及 3 条探针,先通过 PCR 反应获得含有待检测突变位点的基因片段,再进行 LDR,根据测序电泳结果所显示的含荧光标记的 LDR 产物的片段长度来判断基因型别。**结果** 采用 PCR 技术成功扩增出包含瘦素受体基因(110 bp, 130 bp)、脂联素基因(400 bp)、护骨素基因(118 bp, 163 bp)多态性位点的基因片段。根据 LDR 产物片段长度不同进行基因分型,纯合子只有一种片段长度,杂合子包含两种纯合子的片段长度,如瘦素受体基因 SNP Lys109Arg(A/G)的 PCR 产物长度为 110 bp, LDR 产物片段的长度为 110 bp 时则判断为 AA 基因型, 112 bp 则判断为 GG 基因型, AG 基因型则具有 110 bp、112 bp 两种片段长度。PCR-LDR 基因分型结果与 DNA 测序技术的检测结果一致(Kappa=1, P=0.00)。**结论** PCR-LDR 技术简单、快速、准确、成本低,适用于大批量 SNP 检测。

【关键词】 聚合酶链反应;连接酶反应;单核苷酸多态性;瘦素受体基因;脂联素基因;护骨素基因

The ligase detection reaction for detecting single-nucleotide polymorphism of three gene correlated with coronary heart disease

MIAO Ying-xin, GAN Jie-min, SHI Hong, et al. Department of Clinical Laboratory, Hua Dong Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

【Abstract】 Objective To develop a method based on the polymorphase chain reaction-ligase detection reaction (PCR-LDR) for detection of single-nucleotide polymorphism (SNP) of leptin receptor gene Lys109Arg, Gln223Arg, adiponectin gene G276T, T45G and osteoprotegerin gene T950C, G1181C. **Methods** Primers and probes were designed according to target DNA sequence. The LDR test was performed after PCR amplification and the results were analyzed according to the length of fragments of LDR products on a sequencer. **Results** The fragments containing polymorphism sites of leptin receptor gene (110 bp, 130 bp), adiponectin gene (400 bp) and osteoprotegerin gene (118 bp, 163 bp) were amplified successfully by PCR. The genotype was detected by the length and number of LDR products. There was only one kind fragment in homozygote, and two kinds fragments in heterozygote. For example, the length of PCR product of leptin receptor gene SNP Lys109Arg was 110 bp. The appearance of 110 bp fragment of LDR product means genotype AA, 112 bp for GG. The LDR product of genotype AG included 110 bp and 112 bp fragments. DNA sequencing analysis validated that PCR-LDR technique could provide unbiased genotyping results(Kappa=1, P=0.00). **Conclusion** The PCR-LDR technique is simple, fast, accurate, economic and suitable for large-scale SNP studies.

【Key words】 Polymorphase chain reaction; Ligase detection reaction; Single nucleotide polymorphism; Leptin receptor gene; Adiponectin gene; Osteoprotegerin gene

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)作为第三代遗传标记,分布广泛,数目多且相对稳定地存在于人类染色体上,是决定个体差异的最主要的遗传基础。SNP 的检测在致病基因和/或易感基因与遗传性疾病的相关性研究以及个

体对药物治疗的反应性研究中日益受到重视。本文研究建立了一种利用高温连接酶实现对基因多态性位点识别的连接酶反应(ligase detection reaction, LDR),并将该技术用于检测瘦素受体基因 Lys109Arg(A/G)、Gln223Arg(A/G),脂联素基因

G276T、T45G 和护骨素基因 T950C、G1181C 六个多态性位点。近年研究^[1,2]表明这六个多态性位点 SNP 与冠心病(coronary heart disease, CHD)的发生发展存在着一定的相关关系。本文研究采用 PCR-LDR 技术对上述 3 个相关基因的 6 个多态性位点进行检测,为进一步研究其与 CHD 的关系奠定基础。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2009 年 1 月至 2011 年 5 月在我院心内科行选择性冠状动脉造影且无血缘关系的患者 400 例,所有受检者术前空腹 4 h 以上,手术开始时抽取股动脉血 1 ml,置乙二胺四乙酸二钾抗凝管中,-80℃保存。其中 CHD 患者(一支及一支以上主要血管直径狭窄 $\geq 50\%$)250 例,平均年龄(70.10 $\pm$ 6.93)岁;健康者 150 例,平均年龄(71.22 $\pm$ 7.23)岁。有以下情况之一予以剔除:心肌病、瓣膜病、全身免疫性疾病、肿瘤、严重肝、肾功能不全。

1.2 仪器与试剂 UNIQ-10 柱式血液基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物工程有限公司);热启动 Taq 酶(Qiagen 公司);dNTP(promega 公司);DNA 连接酶体系(NEB 公司),引物和探针由上海生工生物工程有限公司合成。基因扩增 PCR 系统 9600 (PERKIN ELMER);PRISM 377DNA 测序仪(ABI 公司);JY600*电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);生物电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 抽提 抗凝全血用红细胞裂解液裂解后用蛋白酶 K(20 mg/mL)消化,与无水乙醇混匀后转移至 UNIQ-10 柱中,用洗液冲洗两次后用洗脱液(pH=8.5)洗脱,保存在-20℃备用。

1.3.2 PCR 扩增 包含 SNP 位点片段 用生物学软件 primer3 设计引物和探针,具体序列见表 1,PCR

表 1 引物和探针序列

基因	多态性位点	名称	序列
脂联素	T45G	上游引物	5'-GTCTCTCCATGGCTGACAGTG-3'
		下游引物	5'-AATCACTTCAGGTTGCTTATGGTTA-3'
		通用探针	P-CCGGGAGAGCTAATAGCAGTAGAATTTTTTTTTTTTTTTT-FAM
		特异探针 T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGTCGTGGTTTCCTGGACATGA
		特异探针 G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGTCGTGGTTTCCTGGACATGC
	G276T	上游引物	5'-GTCTCTCCATGGCTGACAGTG-3'
		下游引物	5'-AATCACTTCAGGTTGCTTATGGTTA-3'
		通用探针	P-CTTCATATAGTTTATATCAGTGTAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTT-FAM
		特异探针 G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTAGGCCTTAGTAAATAATCAATGC
		特异探针 T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTAGGCCTTAGTAAATAATCAATGA
护骨素	T950C	上游引物	5'-CTCCCTGGGGGATCCTTT-3'
		下游引物	5'-TGGACCAAACCTTGCACCTT-3'
		通用探针	P-TTAACGCTTTCAGGGCTGGGGCGGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-FAM
		特异探针 C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCGGCTGTGCAGAAAGCTCCAGGG
		特异探针 T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGGGCTGTGCAGAAAGCTCCAGGA
	G1181C	上游引物	5'-CAAGCCCTGAGCTTTC-3'
		下游引物	5'-GAGCGACTGGAGCCTTCTC-3'
		通用探针	P-TTGTTTCATGTGTCCTCCCGGAAACCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-FAM
		特异探针 C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACCACGAGCGCGCAGCACAGCAAG
		特异探针 G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACCACGAGCGCGCAGCACAGCAAC
瘦素受体	Lys109Arg	上游引物	5'-TCGGAGTGAGCAAGATAGAAA-3'
		下游引物	5'-GCTAATGCTTACCTATTTGTTGAAA-3'
		通用探针	P-TTCCTTCAATGTTGCTGCACATAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-FAM
		特异探针 A	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAATTTACTGTGAAACAAATGTCT
		特异探针 T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAATTTACTGTGAAACAAATGTCC
	Gln223Arg	上游引物	5'-GAATGTTGTAATGTCTTGTGC-3'
		下游引物	5'-CCATATTTATGGGCTGAAGTGA-3'
		通用探针	P-GGAAAATTACTCCACCAGATGTGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-FAM
		特异探针 A	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTGAAGTACATTAGAGGTGACT
		特异探针 G	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTGAAGTACATTAGAGGTGACC

表 2 PCR 反应体系

	模板	Buffer	Mg ²⁺	dNTP	Taq 酶	H ₂ O	Q-solution	Primer
起始浓度	50 ng/μL	10×	100 mM	20 mM/each	5 U/μL	—	5×	5 pM
终浓度	50 ng/μL	1×	3 mM	2 mM/each	1 U	—	1×	0.2 pM
体积	1 μl	2 μl	0.6 μl	2 μl	0.2 μl	9.8 μl	4 μl	0.4 μl

反应体系见表 2, PCR 反应程序: 95 °C 15 min 预变性, 并激活热启动 Taq 酶; 然后 94 °C 30 s, 59 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 7 min; 而脂联素基因扩增时的退火温度为 60 °C 1 min 30 s。反应结束后, 取 2 μl PCR 反应产物在 3% 琼脂糖凝胶上电泳, 检测反应是否成功, 剩余产物保存于 -20 °C。

1.3.3 PCR 产物的 LDR 按照表 3 在基因扩增 PCR 系统 9600 上进行 LDR, 反应程序为: 95 °C 预变性 2 min, 再 94 °C 30 s, 60 °C 2 min, 共 35 个循环。

表 3 LDR 反应体系

	Buffer	Probe Mix	连接酶	H ₂ O	PCR 产物
起始浓度	10×	0.50 mM/each	40 U/μL	—	—
终浓度	1×	0.05 mM/each	2 U	—	100 ng/μL
体积	1 μl	1 μl	0.05 μl	6.95 μl	1 μl

1.3.4 LDR 产物的检测 各取 1 μl LDR 连接产物与 1 μl ABI GS-500ROX 荧光标记相对分子质量标准 和 1 μl 去离子甲酰胺上样液混合, 95 °C 加热变性 2 min, 冰中骤冷, 于 5% 聚丙烯酰胺和 5 mol/L 尿素中 3000 V 电泳 2.5 h, 应用 GENESCAN™672 软件进行数据收集、泳道线校正、迁移片段大小测量和校正内在分子量标准, 应用 Genemapper 软件进行数据分析和基因分型。

1.3.5 DNA 测序 随机选取 PCR-LDR 检测的瘦素受体基因 SNP Lys109Arg (A/G) 中 AA 纯合子 3 份, AT 杂合子 3 份, TT 纯合子 3 份, 将他们的 PCR 产物送上海生工生物工程有限公司进行 DNA 测序。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物 包含瘦素受体基因 Lys109Arg (A/G) 多态性位点的 PCR 产物长度为 110 bp, 包含瘦素受体基因 Gln223Arg (A/G) 多态性位点的 PCR 产物长度为 130 bp; 包含脂联素基因 G276T/T45G 两个多态性位点的 PCR 产物长度为 400 bp; 包含护骨素基因 T950C 多态性位点的 PCR 产物长度为 118 bp, 包含护骨素基因 G1181C 多态性位点的 PCR 产物长度为 163 bp; PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱见图 1。

2.2 SNP 各种基因表型结果 根据 LDR 反应产物测序电泳结果的片段长度判断各基因型, 纯合子只

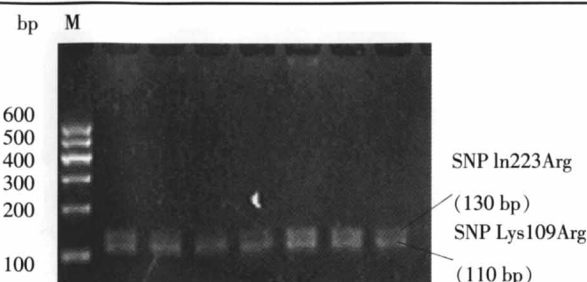


图 1a 瘦素受体基因 PCR 产物 3% 琼脂糖凝胶电泳图谱

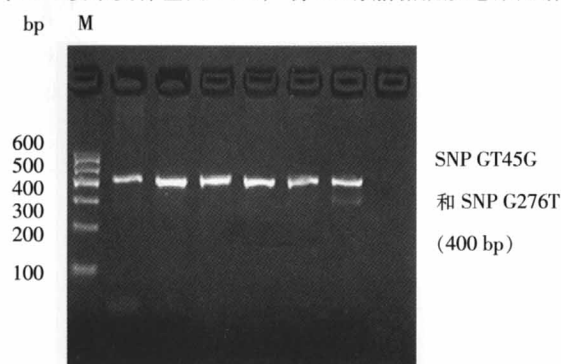


图 1b 脂联素基因 PCR 产物 3% 琼脂糖凝胶电泳图谱

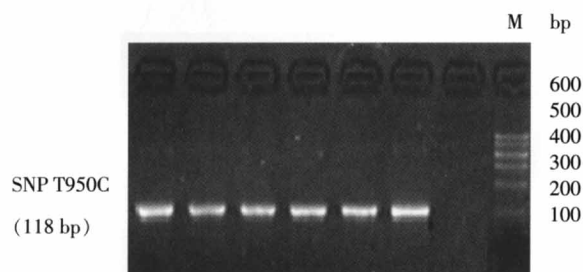


图 1c 护骨素基因 PCR 产物 3% 琼脂糖凝胶电泳图谱

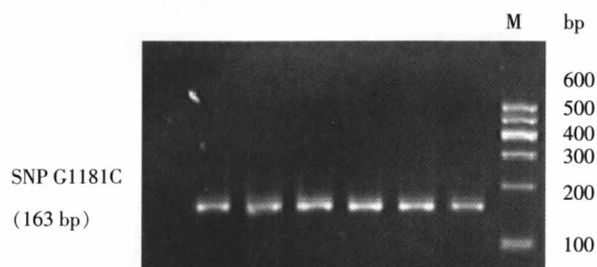


图 1d 护骨素基因 PCR 产物 3% 琼脂糖凝胶电泳图谱

图 1 各基因 PCR 产物 3% 琼脂糖凝胶电泳图谱

注: M 为相对分子质量 100~1000 bp Marker

有一种片段长度, 杂合子包含两种纯合子的片段长度。三个基因的六个多态性位点的各种基因型的 PCR 产物和 LDR 产物的片段大小详见表 4。图 2 以脂联素基因 G276T 多态性位点为例显示了 LDR 产物经测序仪电泳的峰型图。当脂联素基因为纯合子

表 4 各多态性位点基因型判断

基因	多态性位点	PCR 产物长度 (bp)	基因型	LDR 产物长度 (bp)
脂联素	T45G	400	TT	82
			TG	82, 85
			GG	85
	G276T	400	GG	88
			GT	88, 91
			TT	91
护骨素	T950C	118	TT	108
			TC	106, 108
			CC	106
	G1181C	163	GG	112
			GC	112, 110
			CC	110
瘦素受体	Lys109Arg	110	AA	110
			AG	110, 112
			GG	112
	Gln223Arg	130	AA	114
			AG	114, 116
			GG	116

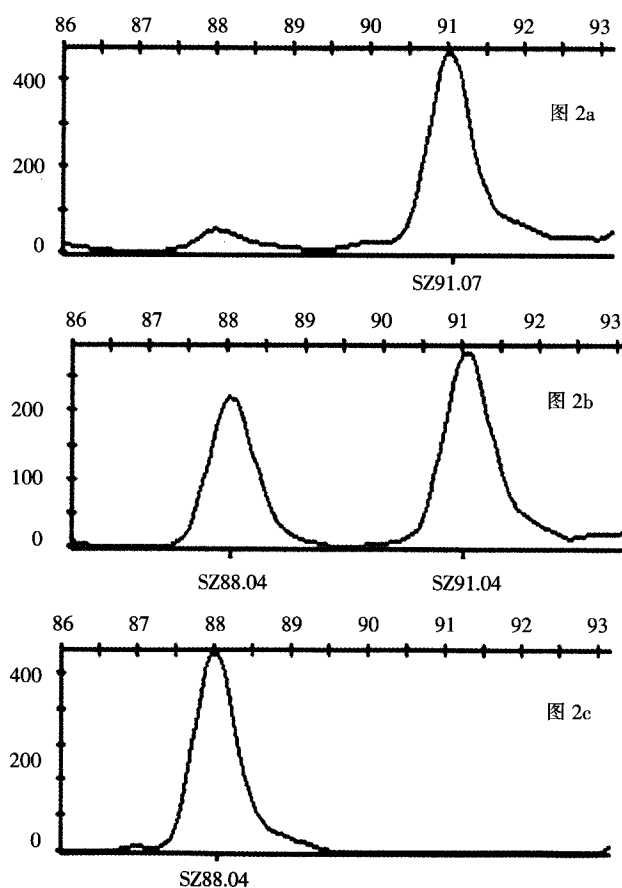


图 2 脂联素基因 G276T TT 型(图 2a)、GT 型(图 2b)、GG 型(图 2c)三种基因型的测序电泳峰型图

GG 型时,经测序仪测得长度为 88 bp 的片断,当脂联素基因为杂合子 GT 型时,测得 88 bp 和 91 bp 的

两个片段,如为纯合子 TT 型,则测得 91 bp 的片断。

2.3 DNA 测序结果 选取的瘦素受体基因 SNP Lys109Arg (A/G) 中 AA 纯合子 3 份,AG 杂合子 3 份,GG 纯合子 3 份共九份的 PCR-LDR 检测结果与 DNA 测序结果一致,符合率 100% (Kappa = 1, $P = 0.00$)。

3 讨论

CHD 是一种临床常见的心血管疾病,也是一种受多种遗传因素、环境因素及其之间相互作用影响的复杂性多基因疾病,严重危害人类健康。全基因组扫描新策略对筛查 CHD 致病和易感基因具有突破性意义,通过联合分析和重复验证,定位了一些 CHD 易感基因^[3,4]。脂联素与 CHD 发生发展关系密切,编码脂联素的基因位于人染色体 3q27 区域,是 CHD、糖尿病、代谢综合征的易感位点^[5]。瘦素通过与其受体结合而发挥作用,调节食欲,平衡能量代谢和体重,调节胰岛素分泌及其作用,调节脂肪细胞和骨骼肌的能量代谢;瘦素受体基因多态性与代谢综合征、心肌缺血性心脏病存在相关关系^[6,7]。护骨素在动脉的平滑肌细胞和内皮细胞均有合成,其血清浓度的增高与心血管病有相关关系;护骨素基因多态性与 CHD 的发生有一定相关性^[8]。这三种基因对 CHD 的发生和发展均有一定的作用,通常这些基因的 SNP 性在健康和患病人群中都存在,但频率不同。

SNP 是指基因组序列中的单核苷酸 (A、T、C 或 G) 改变时发生的 DNA 序列多态性,它是人类可遗传变异中最常见的一种,占有已知多态性的 90% 以上^[9]。SNP 检测技术发展很快,方法很多。经典而常用的限制性片段长度多态性分析和凝胶迁移率变动分析法易受靶序列变异位点的限制,且操作繁琐,所需检测时间长;作为金标准的测序法成本高,灵敏度低,不能进行高通量检测;Taqman 探针技术需要用不同颜色的荧光基团标记两条不同的探针均较难于大批量 SNP 研究。本文研究所用的 SNP 检测方法是先通过 PCR 反应获得含有待检测突变位点的基因片段,然后对 PCR 扩增产物进行多重 LDR,故对 DNA 样本浓度要求低;最后通过测序仪电泳读取检测结果,简单易判定,结果准确。近来也有报道^[9,10] LDR 用于检测 PIP5K2A 基因多态性和 HBV 拉米夫定耐药突变株的检测。

LDR 是利用高温连接酶实现对基因多态性位点的识别。根据突变位点附近的碱基序列设计三条寡核苷酸探针,一条为通用探针,3'-端标记 6-羧基荧光素,5'-端用磷酸基团封闭;另两条特异探针的

3'-端碱基序列一样,只是5'-端的第一个碱基突变位点不同而不同,也就是说突变位点存在于通用探针和特异探针接头处。为了有所区分,这两个特异探针的长度有所不同。PCR产物高温变性后作为模板,如果探针与之匹配,则通用探针的磷酸化5'-端与另一匹配探针的5'-端在高温连接酶作用下连接,从而形成含荧光标记的LDR产物;高温连接酶一旦检测到DNA模板与互补的两条寡核苷酸接头对应处存在着基因点突变类型的碱基错配,则连接反应就不能进行。最后根据测序仪的电泳峰型图来区分基因类型,两个峰的为杂合子,只有一个峰的为纯合子,不同的片段长度对应不同的纯合子。

本文研究首先根据所要扩增基因的序列设计引物,PCR扩增产物不要太长,一般在200 bp之内,因为脂联素基因的两个多态性位点距离较近,因此设计成在一次PCR扩增中包含两个位点,故PCR产物较长。根据突变位点附近的碱基序列设计探针,并人为在通用探针5'-端和特异探针3'-端增加了T碱基,其目的有二:(1)可以控制连接产物的长度,两条特异探针的长度相差2~3个碱基T,这样两种纯合子的连接产物长度也就相差2~3个碱基,足以能通过电泳区分;(2)连接产物的两端都是多聚T,电泳结果比较平滑理想。

本文研究利用PCR-LDR检测到脂联素基因SNP G276T GG型、GT型、TT型的片段长度分别为88 bp、88/91 bp、91 bp,脂联素基因SNP T45G的TT型、TG型、GG型的片段长度分别为82 bp、82/85 bp、85 bp,与国内研究^[1]结果一致。护骨素基因SNP T950C的TT型、TC型、CC型的片段长度分别为108 bp、106/108 bp、106 bp,护骨素基因SNP G1181C的GG型、GC型、CC型的片段长度分别为112 bp、112/110 bp、110 bp,与德国Soufi^[12]的研究结果相近。瘦素受体基因SNP Lys109Arg的AA型、AG型、GG型的片段长度分别为110 bp、110/112 bp、112 bp,瘦素受体基因SNP Gln223Arg的GG型、AG型、AA型的片段长度分别为116 bp、114/116 bp、114 bp,与韩国Park^[13]的研究结果一致。这6个位点的单核苷酸多态性经Hardy-Weinberg平衡法检验各基因频率分布均具有群体代表性。将瘦素受体基因SNP Lys109Arg检测结果经DNA测序法验证,100%相符合,说明此方法特异好,准确度高。整个实验可在450 min内完成,技术简单快速,条件易控制,适合于大批量SNP研究,并为进一步研究三种基因与CHD的相关性奠定了基础。

4 参考文献

- 1 Sun YM, Wang LF, Li J, et al. The 223 A/G polymorphism of the leptin receptor gene and lipid-lowering efficacy of simvastatin in Chinese patients with coronary heart disease. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009, 65: 157-161.
- 2 Soufi M, Schoppet M, Sattler AM, et al. Osteoprotegerin Gene Polymorphisms in Men with Coronary Artery Disease. *J Clin Endocrin Metab*, 2004, 89: 3764-3768.
- 3 Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*, 2007, 316: 1491-1493.
- 4 Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med*, 2007, 357: 443-453.
- 5 Matsuda M, Shimomura I, Sata M, et al. Role of adiponectin preventing vascular stenosis: the missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem*, 2002, 277: 37487-37491.
- 6 Gottlieb MG, Bodanese LC, Leite LE, et al. Association between the Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor and metabolic syndrome in free-living community elderly. *Metab Syndr Relat Disord*, 2009, 7: 341-348.
- 7 Bienertova-Vasku JA, Spinarova L, Bienert P, et al. Association between variants in the genes for leptin, leptin receptor, and proopiomelanocortin with chronic heart failure in the Czech population. *Heart Vessels*, 2009, 24: 131-137.
- 8 Cooper DN, Smith BA, Cooke HJ, et al. An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome. *Hum Genet*, 1985, 69: 201-205.
- 9 He Z, Li Z, Shi Y, et al. The PIP5K2A gene and schizophrenia in the Chinese population - A case-control study. *Schizophrenia Res*, 2007, 94: 359-365.
- 10 Xiao Z, Xiao J, Jiang Y, et al. A novel method based on ligase detection reaction for low abundant YIDD mutants detection in hepatitis B virus. *Hepatol Res*, 2006, 34: 150-155.
- 11 汝颖, 马猛, 马腾, 等. 脂联素基因SNPs多态性与冠心病及胰岛素敏感性的相关性. *中国循环杂志*, 2005, 20: 332-335.
- 12 Soufi M, Schoppet M, Sattler AM, et al. Osteoprotegerin gene polymorphisms in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89: 3764-3768.
- 13 Park KS, Shin HD, Park BL, et al. Polymorphisms in the leptin receptor (LEPR)—putative association with obesity and T2DM. *Journal of Human Genetics*, 2006, 232: 1434-1435.

(收稿日期: 2011-09-14)

(本文编辑: 陈淑莲)