

# 用多聚酶链反应—限制性片段长度多态性 法检测载脂蛋白 CⅢ 基因多态性

孙续国<sup>①</sup> 周新<sup>②</sup> 哈黛文<sup>②</sup>

<sup>①</sup>华北煤炭医学院,唐山 063000, <sup>②</sup>湖北医科大学第二临床学院,武汉 430071)

**摘要** 载脂蛋白 CⅢ 基因与载脂蛋白 A<sub>1</sub>-IV 形成一个基因族,有三个插入子,四个外显子,基因 3'末端 C-G 对换可产生一个 Sac-I 酶切位点。用多聚酶链反应法扩增载脂蛋白 CⅢ 基因 3'末端非编码区,用限制性片段长度多态性法分析酶切位点的突变,建立了多聚酶链反应-限制性片段长度多态性法来检测载脂蛋白 CⅢ 基因突变,研究武汉地区汉族人 S<sub>2</sub> 基因频率。结果发现正常人为 0.16;冠心病人为 0.176。两组无明显差别,不能做为冠心病的基因诊断标志。

**关键词** 多聚酶链反应; 载脂蛋白 CⅢ; 限制性片段长度多态性

载脂蛋白 CⅢ 基因位于 11 号染色体与载脂蛋白 A<sub>1</sub>-A<sub>IV</sub> 形成一个基因族,它位于载脂蛋白 A<sub>1</sub> 下游,有三个插入子和四个外显子,目前对载脂蛋白 CⅢ 基因 3'末端非编码区 C-G 对换产生一个 Sac-I 酶切位点与冠心病的关系未有定论。用多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增载脂蛋白 CⅢ 基因 3'末端 233 bp,再用 Sac-I 酶切扩增产物 用此种方法可以检测载脂蛋白 CⅢ 基因 3'末端突变与动脉粥样硬化的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 对象

100 名健康人,男 68 名,女 32 名,经有关检查确认无血缘关系,无肝、肾、甲状腺疾病及糖尿病等,均为汉族。冠心病 68 名,男 47 名,女 21 名,均为汉族,诊断标准按 1981 年全国冠心病,高血压普查预防座谈会修订的诊断标准。

### 1.2 模板 DNA 提取

取用 EDTA 抗凝全血 100 μl 加试剂 I (0.32 mol/L 蔗糖, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton-100, 0.01 mol/L

Tris-HCl pH 7.6), 振荡至溶解均匀透明, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀部分加 0.9% NaCl 溶液洗一次, 加预冷试剂 I (75 mmol/L NaCl, 24 mmol/L EDTA) 100 μl, 20% SDS 15 μl, 蛋白酶 K 10 μl (6 g/L) 于 65℃ 水浴 4 h, 加 200 μl 酚和氯仿: 异戊醇 (24:1) 各抽提两次, 上清加无水乙醇 1.0 ml 放置于 -20℃ 2 h, 以 12 kr/min 离心 5 min, 真空干燥后加 50 μl TE 缓冲液溶解, 4℃ 保存备用。

### 1.3 多聚酶链反应<sup>[1]</sup>

Primer 1 GTG ACC GAT GGC TTC AGT TCC CTG, primer 2 GGT AGG AGA GCA CTC AGA ATA CA, 反应总体积为 50 μl, 扩增缓冲液所含物质终浓度为: Tris-HCl, pH 8.3, 67 mmol/L; MgCl<sub>2</sub>, 25 mmol/L; KCl 50 mmol/L; 明胶 0.01%, dNTP 0.2 mmol/L~0.5 μmol/L, 模板约 10 μg, 加 40 μl 液体石蜡 94℃ 预变性 4 min, 加 Tag 聚合酶 1.5 u, 以 93℃ 1 min, 65℃ 1.5 min, 72℃ 1.5 min, 循环 30 次。

### 1.4 扩增产物酶切

取扩增产物 20 μl 加入 NH<sub>4</sub>AC 20 μl, 再加 300 μl 无水乙醇混均置 -20℃ 1 h, 10 000 r/min 离心 7 min 弃上清, 干燥后加 Sac-I 酶 10 u 37℃ 保温 2 h。

### 1.5 扩增产物碱基对分子量测定

采用 GB 公司产 DNA mark, 以已知 DNA 片段 bp 数相对应的电泳迁移距离, 取半对数作图制成标准曲线, 再根据待测扩增产物 DNA 片段移动距离在标准曲线上求出其 bp 数(图 1)。

### 1.6 统计学处理

$\chi^2$  检验

## 2 结果

2.1 扩增产物在 2% 琼脂糖上电泳, 可呈一条荧光度很强的主带, 查标准 DNA mark 绘制曲线在 233 bp 位置, 与设计相符, 经 Sac-I 酶切

有三种结果:①酶切后仍为一条带,电泳迁移率未发生改变,为  $S_1S_1$  纯合子;②酶切后除原始带外又增加了两条带,查标准 DNA mark 曲线在 158 bp 和 75 bp 位置,此为  $S_1S_2$  杂合子;③酶切后原始带消失,出现两条新带,其电泳迁移率与 158 bp 和 75 bp 相同,为  $S_2S_2$  纯合子。 $S_2$  为扩增的基因产物中 C-G 对换增加一个酶切位点(图 2、图 3)。

2.2 正常人与冠心病载脂蛋白 C II 基因突变频率的比较

检查 100 名正常人中有  $S_2$  杂合子 28 名,纯合子 2 名;68 名冠心病人中  $S_2$  杂合子 16 名,纯合子 4 名,它们的频率变化见附表,  $S_2$  基因频率两组间无明显差别,与国内用 RFLP 法检测报道相似。

附表 载脂蛋白 C II 基因 Sac-1 酶切频率表

组别	n	基因型			频率	
		$S_1S_1$	$S_1S_2$	$S_2S_2$	$S_1$	$S_2$
正常人	100	70	28	2	0.84	0.16
冠心病	68	48	16	4	0.82	0.176

$\chi^2=0.079, P>0.05.$

3 讨论

利用 PCR 扩增载脂蛋白 C II 基因 3'非编码区 233 bp,可得一条主要发光区带,小分子发光物可能为剩余引物。扩增产物与标准 DNA mark 相比,查标准曲线在 233 bp 位置,与设计相符,所扩增段 DNA 序列经检索只有 C-G 对换产生一个 Sac-1 酶切位点,我们用 Sac-1 酶切发现也只有一个酶切位点,查 DNA mark 曲线在 158 bp 和 75 bp 位置,这和已知酶切位置发生突变后酶切结果相符,说明扩增为特异性扩增。在 100 名正常人和 68 名冠心病中发现只有已知位点的突变,未发现有 Sac-1 位点的增加。

载脂蛋白 C II 基因位于载脂蛋白 A1 基因下 2.5 kb 处,5'末端远离 A1 基因,表明载脂蛋白 C II 基因转录方向与载脂蛋白 A1 相反,基因长度为 3 000 bp,有三个插入子和四个外显子,本文扩增片段基因序列为如图 4 所示<sup>[2]</sup>。

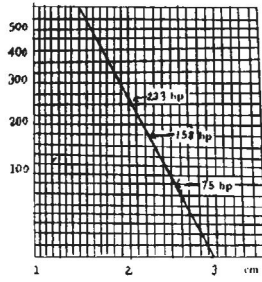


图 1 DNA 分子量测定曲线图

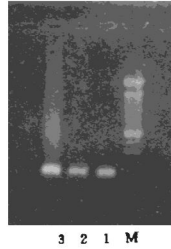


图 2 载脂蛋白 C II 基因产物的琼脂糖凝胶电泳。

M 为标准 DNA Mark,1,2,3 为扩增的载脂蛋白 C II 基因产物,电泳位置相当于 233 bp。

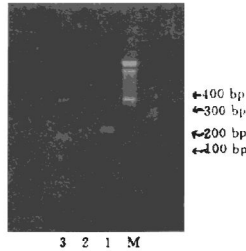


图 3 载脂蛋白 C II 扩增产物经 Sac-1 酶切 RFLP 分析, M 为标准 DNA mark,1 为  $S_1S_1$  纯合子,2 为  $S_1S_2$  杂合子,3 为  $S_2S_2$  纯合子。

---	GTG	ACC	GAT	GGC	TTC
	AGT	TCC	CTG	AAA	GAC
	TAC	TGG	AGG	ACC	CTT
	AAG	GAC	AAG	TTC	TCT
	GAC	TTC	TGG	GAT	TTG
	CAG	CCT	GAG	GTC	AGA
	CCA	ACT	TCA	GCC	GTC
	GCT	GCC	TGA	GAC	CTC
	AAT	ACC	CCA	AGT	CCA
	CCT	GCC	TAT	CCA	TCC
		Sac-1			
	TGC	GAG	CTC	CTT	GGG
		C			
	TCC	TGC	AAT	CTC	CAG
	GGG	TGC	CCC	TGT	AGG
	TTG	CTT	AAA	AGG	GAC
	AGT	ATT	CTC	AGT	GCT
	CTC	CTA	CC---		

图4 扩增DNA片段基因序列

有报道载脂蛋白 C<sub>III</sub> 基因 3' 端多态性与冠心病有关系, 基因多态性频率在不同种族人群中存在差别<sup>[3]</sup>, 同时检测这些人群时所用的方法不同, 以往都是利用限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 法来分析载脂蛋白 C<sub>III</sub> 基因多态性, 这对多态性是否有影响还有待于进一步研究。实验证明用 PCR-RFLP 法检测载脂蛋白 C<sub>III</sub> 基

因多态性特异、快速。

我们利用 PCR-RFLP 法对武汉地区汉族, 正常人 100 名、冠心病病人 68 名作了分析, 结果是 S<sub>2</sub> 频率正常人为 0.16, 冠心病病人 0.176, 经  $\chi^2$  检验两组无明显差别, 冠心病病人略高于正常人, 与孟祥文等<sup>[4]</sup>用 RFLP 法报道相似, 但 S<sub>2</sub> 频率冠心病病人高于正常人相反。因此 S<sub>2</sub> 频率不能做为冠心病基因诊断标志。由于载脂蛋白 C<sub>III</sub> 基因多态性以前都是利用 RFLP 法, 用 PCR-RFLP 法分析还未见有报道, 我们所作例数有限, 在不同种族人群其频率和冠心病的关系还有待于研究。

#### 参考文献

- Hixson JE, Vernier DT, Powers PK. Detection of Sac-1 restriction site polymorphism human Apo C<sub>3</sub> by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19** (1): 196.
- Sotirios K, Karathanasis, Vassilis I, et al. Isolation and characterization of cDNA clones corresponding to two different human apo C<sub>III</sub> alleles. *J Lipid Res*, 1985, **26**: 451.
- Shoulders CC, Harry PJ, Lagrost L. Variation at the Apo A<sub>1</sub>/C<sub>III</sub>/A<sub>IV</sub> gene complex is associated with elevated plasma levels of apo C<sub>III</sub>. *Atherosclerosis*, 1991, **87** (2~3): 219.
- 孟祥文, 张贵寅, 李璞, 等. 载脂蛋白 A<sub>1</sub>-C<sub>III</sub> 基因区域 DNA 多态性及单倍型与冠心病. *遗传学报*, 1990, **17** (6): 411.