

低密度脂蛋白受体相关蛋白四核苷酸重复序列基因型检测

尹志农¹, 周新², 高纯³, 刘晓燕¹

(1. 北京市垂杨柳医院, 北京 100022; 2. 武汉大学医学院第二临床学院; 3. 苏州医学院第一医院)

[关键词] 受体, 脂蛋白; 四核苷酸重复序列; DNA 序列分析

[摘要] 为建立一种直接、准确的人低密度脂蛋白受体相关蛋白四核苷酸串联重复序列(TTTC)_n 基因型检测方法, 应用聚合酶链反应和 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测人低密度脂蛋白受体相关蛋白的基因型, 同时用聚合酶链反应产物直接进行测序。应用该法检测人低密度脂蛋白受体相关蛋白四核苷酸串联重复序列(TTTC)_n 基因型, 共检出 5/6、6/6、5/5 型三种基因型和 5、6 两种等位基因, 其判定结果与测序结果完全一致。该方法可直接、准确地确定低密度脂蛋白受体相关蛋白的基因型, 是大规模人群调查和心脑血管性疾病研究的有力工具。

[中图分类号] Q349.53

[文献标识码] A

Detection on Tetranucleotide Repeat Sequence Genotype of Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein

YIN Zhi-Nong, ZHOU Xin, GAO Chun, and LIU Xiao-Yan

(Department of Laboratory, Beijing Chui-Yangliu Hospital, Beijing 100022, China)

MeSH Receptors, LDL; Tetranucleotide Repeat Sequence; Sequence Analysis

ABSTRACT **Aim** To establish a direct, accurate method for detecting the tetranucleotide repeat genotype of human low density lipoprotein receptor related protein(LRP). **Methods** LRP was amplified by using polymerase chain reaction (PCR).

The PCR products were subjected to electrophoresis on 6% denature polyacrylamide gels. Sequences of LRP were analysed by direct sequencing of PCR products. **Results** Using this method, we detected the LRP genotypes: 5/6, 6/6, 5/5 and two allelic genes 5, 6. The results were in agreement with sequence analysis. **Conclusion** LRP genotype can be determined directly and accurately. It is a tool for the investigation of large scale population and study of cardio-cerebro vascular diseases (CCVD).

低密度脂蛋白受体相关蛋白(low density lipoprotein receptor related protein, LRP) 是 Herz 等于 1998 年发现的, 根据 cDNA 序列分析, 它含有与低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL) 受体相关的重复序列, 故称 LRP。它介导许多分子的内在化, 如介导富含极低密度脂蛋白(very LDL, vLDL)、乳糜微粒(CM) 和 CM 残粒的摄取, 在许多脂质代谢失调的心脑血管性疾病中均可发挥作用。人的低密度脂蛋白受体相关蛋白基因定位于 12q 13~14, 长 90 kb。目前已发现在该基因 Alu 顺序的 3' 末端存在一微卫星 DNA 序列^[1], 即四核苷酸重复序列(TTTC)_n。本文采用聚合酶链反应和 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及 AgNO₃ 染色技术, 建立一种快速、准确检测低密度脂蛋白受体相关蛋白基因型的方法, 并用聚合

酶链反应产物直接进行序列分析。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

DNA 扩增仪(PE2400 型)、高速台式离心机(TGL-16G 型)、冷冻式高速离心机(Hema 公司、珠海 TGL-18R)、电泳仪及电泳槽(美国 Bio-Rad 公司)、紫外透射、反射分析仪(WP-I 型)、DNA 测序仪(ABI PRISM310 型基因分析仪)。试剂均购自 Pharmacia 公司。

1.2 标本采集

180 例样本均为 EDTA-Na₂ 抗凝的门诊体检无血缘关系个体。用 NaI 法^[2] 提取 DNA, TE 溶解, 4℃ 冰箱保存。

1.3 模板 DNA 的制备

取抗凝血 100 μL, 混匀, 加入 6 mol/L NaI 200 μL, 反复混匀 20 s, 再加入 400 μL 氯仿/异戊醇(24/

[基金资助] 湖北省重点科技攻关课题(编号 96192002)

[作者简介] 尹志农, 女, 1963 年出生, 湖南邵阳人, 硕士。周新, 男, 博士研究生导师。

1) 振荡 20 s, 1 500 r/min 离心 10 min, 取上清, 加 0.6 倍体积异丙醇, 混匀, 室温静置 15 min, 离心, 弃上清, 加入 1 mL 70% 乙醇, 15 000 r/min 离心, 室温干燥后溶于 30 μ L TE 液 (pH 8.0), 置 -20 $^{\circ}$ C 储存。

1.4 聚合酶链反应

引物参照文献 [2] 设计, 其序列为 P1: 5'-TGTCTGTAAGGTGAGAGAATGCATA-3', P2: 5'-TGGGCAACAAGAGTGC AACTCCATC-3'。扩增反应体系总体积 50 μ L, 其中 5 μ L 10 \times buffer, 25 mmol/L Mg-Cl₂ 3 μ L, 1.25 μ L Taq DNA 聚合酶, 引物 20 pmol, dNTP 200 μ mol/L, 模板 DNA 5 μ L, 最后用蒸馏水定容至 50 μ L。95 $^{\circ}$ C 预变性 8 min, 然后按 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 68 $^{\circ}$ C 退火至延伸 2 min, 循环 30 次。

1.5 电泳

聚合酶链反应产物与 pBR322/Hae Ⅳ Marker、pBR322/MspI Marker 同时用 80 g/L 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳条件为: 400 V 预电泳 20 min, 1 000 V 电泳 2 h。

1.6 确定反应产物片段长度

将聚合酶链反应产物进行 DNA 银染。银染步骤为: 10% 乙醇固定 5 min \rightarrow 1% HNO₃ 氧化 3 min \rightarrow 重蒸馏水洗两次, 每次 30 秒 \rightarrow 0.012 mol/L AgNO₃ 作用 20 min \rightarrow 重蒸馏水洗两次, 每次 30 秒 \rightarrow 加还原液至电泳带清晰为止 \rightarrow 随即用 10% HAc 固定 5 min \rightarrow 重蒸水浸洗 2 min 以上。片段长度的确认, 参照两个 Markers (pBR 322DNA/Hae Ⅳ Marker 和 pBR322DNA/Msp I Marker), 并用回归法计算出 DNA 片段的大小。

1.7 等位基因梯阶标准的构建

取经 DNA 测序已确证基因型的 5/5、5/6、6/6 标本各 2.0 μ L, 加 4.0 μ L 上样缓冲液, 混匀, 再取 pBR322 Marker 和 Hae Ⅳ Marker 各 0.5 μ L, 加上样缓冲液 5.5 μ L, 混匀, 同时电泳, 电泳条件同上。

1.8 DNA 序列测定

反应试剂为 Big Dye 末端终止法测序盒 (Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Perkin Elmer), 使用 ABI PrismTM 310DNA 测序仪完成。

2 结果

利用该法检测 180 名低密度脂蛋白受体相关蛋白四核苷酸重复序列 (TTTC)_n, 共检出了 2 种等位基因, 扩增片段的长度分别为 91 bp、95 bp, 其中所包含的 (TTTC)_n 重复次数分别为 5 和 6; 检出的 3 种

基因型为 5/5、5/6 和 6/6 型 (图 1, Figure 1); 等位基因和基因型频率见表 1 (Table 1)。

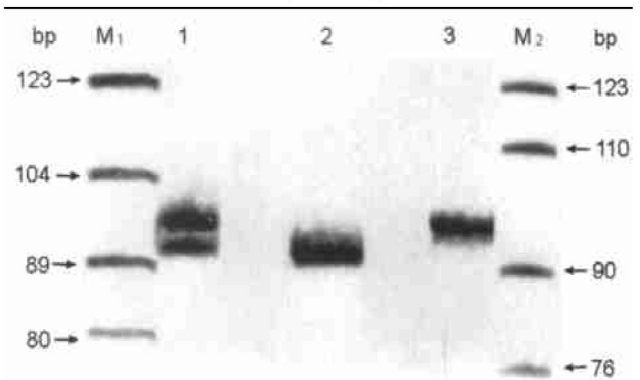


图 1. 人低密度脂蛋白受体相关蛋白 (TTTC)_n 基因型凝胶电泳图谱. M₁: pBR 322/Hae Ⅳ 1~3 分别为 5/6、6/6 和 5/5 型; M₂: pBR 322/Msp I Marker

Figure 1. Genotype agar electrophoretogram of human low density lipoprotein receptor related protein (TTTC)_n

表 1. 人低密度脂蛋白受体相关蛋白四核苷酸重复序列 (TTTC)_n 等位基因和基因型频率

Table 1. Allelic genes and genotype rate of tetranucleotide repeat sequence of low density lipoprotein receptor related protein (TTTC)_n

Genotype	n	Frequency
5/5	16	0.089
5/6	51	0.283
6/6	113	0.628
Allely		
5	83	0.231
6	277	0.769

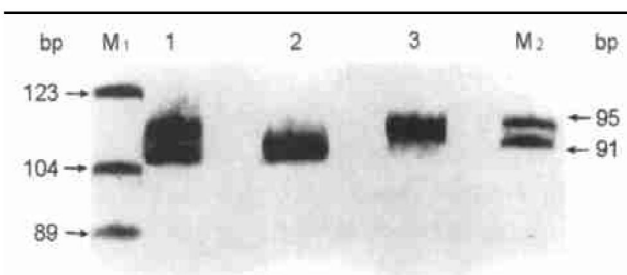


图 2. 人低密度脂蛋白受体相关蛋白 (TTTC)_n 等位梯阶图谱. M₁: pBR322/Hae Ⅳ Marker; 1~3 分别为 5/6、6/6、5/5 型; M₂: 等位梯阶标准

Figure 2. Allelic trapezoidal diagram of human low density lipoprotein receptor related protein (TTTC)_n

为相对准确地判定不同的基因型, 本文构建等

位基因梯阶标准,将 5/6 型标本按上述条件扩增,其产物即为含有 2 个等位基因的等位梯阶标准(图 2, Figure 2)。

为进一步证实其基因序列的准确性,将聚合酶

链反应产物于 ABI PRISM310 型基因分析仪上进行 DNA 序列分析,使用的是上游引物。该图 TTTC 的串联重复次数为 5 次(图 3, Figure 3)。

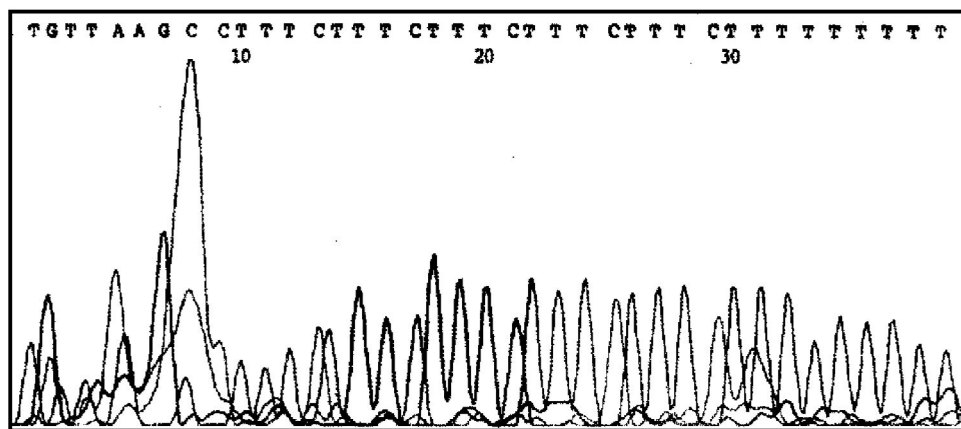


图 3. 人低密度脂蛋白受体相关蛋白(TTTC)_n 重复序列测序结果

Figure 3. The results of repeat sequence detection of human low density lipoprotein receptor related protein (TTTC)_n

3 讨论

微卫星 (Microsatellite) 是指以少数几个核苷酸 (多数为 2~5 个) 为单位多次串联重复的 DNA 序列,人们也称为短串联重复 (short tandem repeats, STRs)。由于 STRs 具有种类多、顺序化、分布广、高度多态性等特点,在人群中表现高度特异性。因此,作为一种遗传标记它具有独特的优势。由于微卫星在同一物种的基因型差异很大^[3],于是,这一技术很快发展为一种分子标记。

本文采用聚合酶链反应-变性聚丙烯酰胺凝胶电泳-银染技术检测了人低密度脂蛋白受体相关蛋白四核苷酸重复序列(TTTC)_n 基因型。同时,由于常规使用的 Marker 呈非梯度变化,难以准确判定相差几个碱基的序列,回归法费时而不准确。构建等位梯阶标准,可相对准确的判定不同的基因型,并进一步通过对扩增产物进行测序确认其基因型判定的正确性。结果表明,这是一种快速、准确的检测低密度脂蛋白受体相关蛋白四核苷酸重复序列(TTTC)_n 基因型的方法。

研究表明,低密度脂蛋白受体相关蛋白直接关系到载脂蛋白 E 的代谢,而载脂蛋白 E 是 AD 病的

主要危险因子;同时动脉粥样硬化病变部位低密度脂蛋白受体相关蛋白是唯一脂蛋白受体^[4],故它与动脉粥样硬化、冠心病等心脑血管性疾病的病因有关。所以,检测人低密度脂蛋白受体相关蛋白四核苷酸重复序列(TTTC)_n 基因型,不仅对大规模的人群调查,而且对心脑血管性疾病的遗传学因素研究均有重要的意义。

参考文献

- [1] Fass D, Blacklow S, Kim PS, et al. Molecular basis of familial hypercholesterolemia from structure of LDL receptor [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1997, **388**: 691-693
- [2] Cui S, Verroust PJ, Moestrup SK, et al. Megalin mediates uptake of albumin in renal proximal tubules [J]. *American Journal of Physiology*, 1996, **271**: F900-F907
- [3] Herz J, Willnow TE. Lipoprotein and receptor interactions in vivo [J]. *Current Opinion in Lipidology*, 1995, **16**: 97-103
- [4] Kang DE, Saitoh T, Chen X. Genetic association of the low density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late onset Alzheimer's disease [J]. *Neurology*, 1997, **49**: 56-61

(此文 2001-03-07 收到, 2001-08-03 修回)

(此文编辑 朱雯霞)