

单核苷酸多态性敏感分子开关在基因组单核苷酸多态性检测中的特异性分析

彭翠英^{1,2}, 胡卫民³, 周翠兰¹, 陈琳玲¹, 刘俊², 肖莉¹, 殷宇芳¹, 李凯¹, 廖端芳¹

(南华大学 1. 药物药理研究所, 2. 细胞生物学与遗传学教研室, 湖南省衡阳市 421001;

3. 娄底市中心医院, 湖南省娄底市 417000)

[关键词] 分子生物学; 单核苷酸多态性; DNA 聚合酶; 特异性; 硫化修饰引物

[摘要] 目的 探讨硫化修饰的碱基特异性引物与高保真 DNA 聚合酶所构成的对单核苷酸多态性敏感分子开关系统在基因组单核苷酸多态性检测中的特异性。方法 以人类基因组 DNA 为模板, 采用 3' 末端配对及不配对的 3' 末端硫化修饰引物, 进行不同保真度 DNA 聚合酶介导的引物延伸反应。结果 Taq 酶介导的碱基特异引物延伸反应扩增产物出现非特异性带, 而单核苷酸多态性敏感分子开关介导的引物延伸反应未出现非特异性带。结论 单核苷酸多态性敏感分子开关是一种特异性强, 可靠性高的可用于基因组单核苷酸多态性分析的新方法, 可在单碱基水平对遗传病相关基因进行特异性检测。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

The Specificity Analysis of the on/off Switch in Discriminating Genomic Sites of Single Nucleotide Polymorphism

PENG Cu-Ying^{1,2}, HU Wei-Min³, ZHOU Cui-Lan¹, CHEN Lin-Ling¹, LIU Jun², XIAO Li¹, YIN Yu-Fang¹, LI Kai¹, and LIAO Duan-Fang¹

(1. Department of Pharmacology, 2. Department of Cell Biology and Genetics, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Single Nucleotide Polymorphism; DNA Polymerase; Phosphorothioate Modification; Specificity

[ABSTRACT] **Aim** To analyze the specificity of the on/off switch mediated by high fidelity proofreading DNA polymerases and 3'-phosphorothioate-modified allele-specific primers for screening certain sites of single nucleotide polymorphism (SNP) in genomic DNA. **Methods** The genomic DNA is used as the template. The 3'-phosphorothioate-modified allele-specific primers were evaluated in their effects on primer extension with genomic DNA harboring SNP sites allele. **Results** The products from Taq had many mixed bands, and some of them clearly showed false positives. However, at most of the situations, high fidelity DNA polymerase of Pfu yielded single products. **Conclusion** These data suggest that the "on/off switch" mediated by exo+ polymerase is more reliable as compared to exo- polymerase in SNP assay and the novel "on/off" switch has enormous application in the diagnosis of monogenic diseases.

在后基因组时代, 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 的筛查及检测正成为研究者们广泛关注的焦点^[1-4]。由于不同的缺点, 使得它们不能进入临床大规模的筛查, 因此开发敏感、特异、经济、操作方便的 SNP 分析新方法具有时间上的紧迫性。寡核苷酸合成时引入硫化磷酸修饰, 能达到耐核酸外切酶消化以延长寡核苷酸半衰期的效果。最近, 张佳等通过比较具有 3' → 5' 外切酶活性的高保真 DNA 聚合酶与不具有 3' → 5' 外切酶活性的低保真 DNA 聚合酶介导的 3' 末端不完全配对引

物的延伸反应, 发现高保真 DNA 酶除利用已知的错配修复或校正机制外, 当错配难于及时修复或不能修复时, 可以引发聚合反应非成熟性终止, 即聚合反应的“关”系统^[5-7]。本文分析 3' 末端不配对的硫化修饰引物与高保真 DNA 聚合酶相结合所构成的 SNP 敏感分子开关在基因组 SNP 检测中的特异性。

1 材料与方法

1.1 人基因组 DNA 抽提

从健康志愿者采集外周静脉血 5 mL, 用 3.8% 的枸橼酸钠按 1:6 抗凝, 采用酚-氯仿法抽提白细胞中的基因组 DNA^[8]。

1.2 DNA 聚合酶

本实验所用 DNA 聚合酶为 Taq 酶和 Pfu 酶, 均购于 Sangon 公司, 其中 Pfu 酶为含有 3' → 5' 外切酶

[收稿日期] 2005-01-17 [修回日期] 2005-05-08

[基金项目] 国家自然科学基金 (30171084) 资助; 国家 973 项目 (G2000056905) 部分资助

[作者简介] 彭翠英, 讲师, 硕士研究生, 主要研究方向为原发性高血压易感基因 SNP 的筛查, E-mail 为 pengcy0613@yahoo.com.cn。胡卫民, 主任医师。通讯作者廖端芳, 教授, 博士研究生导师, 联系电话 0734-8281408, E-mail 为 dfliao@hotmail.com。

活性的高保真 DNA 聚合酶;Taq 酶为无 3' → 5' 外切酶活性的低保真 DNA 聚合酶。

1.3 引物设计

根据 Genebank 的数据资料, 进行引物设计, 一个 SNP 位点设计两条正向引物和一条反向引物, 且引物的 3' 末端为 SNP 位点且硫化修饰。引物由 Sangon 公司合成, 序列如下: 内皮素 1 基因 5370G/T 位点的正向引物为 5'-ATC CCA AGC TGA AAG GCA AG-3', 反向引物为 5'-CTC CGT GGA GGC TAT GGC TTC-3', 正向引物为 5'-GAG AAA CAG CGT CAA ATC ATC TTT TCA TGA TCC CAA GCT GAA AGG CAA T-3'; ④血管紧张素转化酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 基因 1987693C/T 位点的正向引物为 5'-AGG AGA GGA GAG AGA CTC AAG CAC-3', 反向引物为 5'-AAGTGACTGTATAGGCAGCAGG-3', 正向引物为 5'-AGGAGA GGA GAG AGA CTC AAG CAT-3'; ④GJB3 基因 C/T 位点野生型的正向引物为 5'-CAA 了 CAT CGT GGA CTG CTA CAT TGC CC-3', 反向引物为 5'-GTG 了 AAG ATT TTC TTC TTG GTA GGT CA-3', 突变型的正向引物为 5'-CAA CAT CGT GGA CTG CTA CAT TGC CT-3'; 纤维瘤三核苷酸缺失突变位点野生型的正向引物为 5'-GGC ACC ATT AAA GAA AAT ATC ATC TTT G-3', 反向引物为 5'-TAA TTC TCT GCT GGC AGA TCA ATG CTC-3', 突变型的正向引物为 5'-GGC ACC ATT AAA GAA AAT ATC ATT G-3'。

1.4 聚合酶链反应

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 的条件: 95℃ 变性 5 min, 然后按照 94℃ 变性 40 s → 56℃ 退火 40 s → 72℃ 延伸 30 s, 循环 30 次后, 再 72℃ 延伸 10 min。PCR 反应在 20 μL 中进行, 反应体系含 40 pg 模板 DNA, 0.2 mmol/L dNTP, 10 ku/L DNA 聚合酶, 10 μmol/L 正向及反向引物, 2 mL 10 × NEB PCR 缓冲液, 反应终浓度含有 10 mmol/L KCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 10 mmol/L [(NH₄)₂SO₄, 2 mmol/L MgSO₄, 0.1% Triton X-100。PCR 产物采用预含溴化乙锭的 2.5% 琼脂糖凝胶在 10 V/cm 的电场下电泳分离, 电泳液为 0.5 × 的 TBE 缓冲液。

2 结果

2.1 血管紧张素转化酶基因 1987693C/T 和内皮素 5370G/T 位点的检测结果

Taq 酶介导的碱基特异引物延伸反应出现明显非特异性带, 而 SNP 敏感分子开关检测未出现非特异性带 (图 1, Figure 1), 提示 Taq 酶用于 SNP 分析需

要对退火温度进行严格限制且还可能出现假阳性^[9, 10], 而 SNP 敏感分子开关用于 SNP 分析时无需严格控制退火温度, 能够增加引物延伸反应的特异性和敏感性。

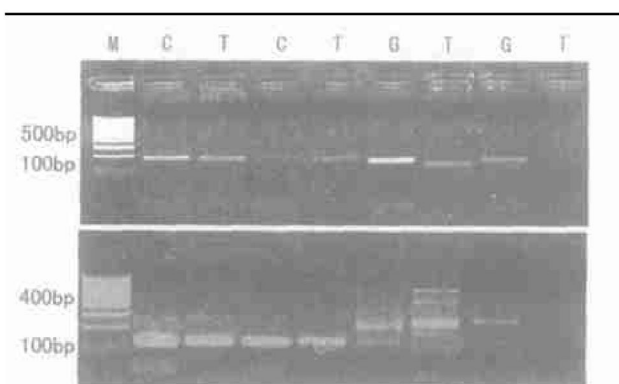


图 1. 引物延伸产物琼脂糖凝胶电泳图 上图为 Pfu 酶介导, 下图为 Taq 酶介导; CTCT 四条带为 ACE1987693C/T, GTGT 四条带为内皮素 5370G/T; 除 Marker 外, 每两条带为一种 DNA 模板, 共用 2 种模板。

Figure 1. The gel electrophoretic map of the produce of specific primers extended by Pfu/ Taq polymerase

2.2 神经性耳聋 GJB3 中 C → T 突变点的检测结果

神经性耳聋 GJB3 中 C → T 突变点在正常人的染色体 DNA 样本中, 此 SNP 位点的基因型为 CC 纯合子, 而耳聋患者染色体 DNA 样本中, 此 SNP 位点的基因型为 CT 杂合子, 本实验以正常人的染色体 DNA 样本为模板。当使用缺乏 3' → 5' 外切酶活性的低保真 DNA 聚合酶 Deep vent 时, 无论引物的 3' 末端硫化修饰是否与 DNA 模板完全配对, 均能得到引物延伸产物, 即检测结果为 CT 杂合子, 出现了假阳性。而使用 SNP 敏感分子开关检测时, 只有 3' 末端配对的引物才得到引物延伸产物, 即检测结果为 CC 纯合子 (图 2, Figure 2)。

2.3 纤维瘤三核苷酸缺失突变位点的检测结果

用 3' 硫化修饰引物与 Pfu 构成的 SNP 敏感分子开关检测时, 只有硫化修饰引物的 3' 末端与模板完全配对时, 才能得到引物的延伸产物, 当引物缺失三个碱基时, 则得不到引物的延伸产物; 而使用无 3' → 5' 外切酶活性的 Taq 酶与 3' 末端硫化修饰引物进行引物延伸反应时, 不管 3' 末端是否与 DNA 模板完全配对, 均能得到引物延伸产物 (图 3, Figure 3)。

3 讨论

人类基因组计划的完成, 有关 SNP 的研究方兴

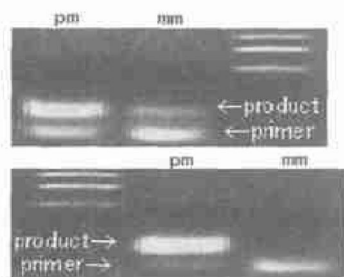


图 2. 引物延伸反应检测神经性耳聋 GJB3 中 C \rightarrow T 突变凝胶电泳图 上图为 Taq 酶介导, 下图为 Pfu 酶介导; pm 为配对引物, mm 为不配对引物。

Figure 2. The gel electrophoretic map of the produce of C \rightarrow T point mutation in the GJB3 of 3'-phosphorothioate modified allele-specific primers extended by Taq/ Pfu polymerase

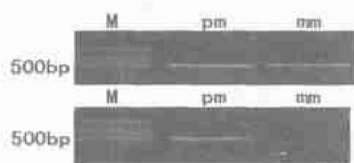


图 3. 引物延伸反应检测纤维瘤三核苷酸缺失突变凝胶电泳图 上图为 Taq 酶介导, 下图为 Pfu 酶介导; pm 为配对引物, mm 为不配对引物。

Figure 3. The gel electrophoretic map of the produce of the deletion mutation in the fibroma of 3'-phosphorothioate modified allele-specific primers extended by Taq/ Pfu polymerase.

未艾, 用于 SNP 分析的基本方法有二十余种^[11, 12]。在 SNP 检测诸多方法中, 假阳性是造成多种人工精心设计的方法无法进入临床应用的障碍^[13, 14]。

本实验分别利用 SNP 敏感分子开关及低保真 DNA 聚合酶, 在 56℃ 的退火温度下, 分析了基因组 DNA 中四个不同的 SNP 位点, 研究 SNP 敏感分子开关对 SNP 位点识别的特异性。此实验结果显示, 在 56℃ 退火温度下, Taq 酶介导的碱基特异引物延伸反应扩增产物中出现非特异性带, Pfu 酶介导的 SNP 敏感分子开关检测结果中无非特异性带出现。同时, 本文以染色体 DNA 为模板, 利用 SNP 敏感分子开关检测了单基因遗传病——神经性耳聋 GJB3 中 C \rightarrow T 突变点与纤维瘤三核苷酸缺失突变。同样发现, 在使用缺乏 3' \rightarrow 5' 外切酶活性的低保真 DNA 聚合酶时, 无论 3' 硫化引物的 3' 末端是否与 DNA 模板完全配对, 均能得到引物延伸产物。然而, 当使用具有 3' \rightarrow 5' 外切酶活性的高保真 DNA 聚合酶时, 仅完全配对的引物能被延伸, 3' 末端不配对的引物则

不能被延伸。这些结果提示, 在进行基因组 SNP 的筛查或单基因遗传病的点突变检测时, Taq 酶用于 SNP 分析特异性较低, 而 SNP 敏感分子开关能够增加引物延伸反应的敏感性和特异性。

因此, SNP 敏感分子开关是一种可靠性高, 特异的 SNP 分析新方法, 可以用于复杂疾病的 SNP 与疾病相关性研究。此外, 此分子开关操作简便且经济高效, 易于与琼脂糖凝胶电泳、适时 PCR 及 DNA 芯片等技术联合使用, 具有自动化和高通量分析的潜能, 有望用于原发性高血压等严重危害人民身体健康的复杂疾病 SNP 大规模筛查的基础研究与临床基因检测, 研究对药物反应表现型相关的基因型, 以便寻找药物靶基因, 为每个个体寻找有新靶点的药物, 推动临床个体化用药。

[参考文献]

- [1] Chen X, PF Sullivan. Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. *Pharmacogenomics J*, 2003, **3** (2): 77-96
- [2] Li SX. Single nucleotide polymorphism and its application in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *中国实验血液学杂志*, 2004, **12** (6): 885-888
- [3] 刘万清, 贺林. SNP——为人类基因组描绘新的蓝图. *遗传*, 1998, **20** (6): 38-40
- [4] 刘艳, 金玮, 姜正文, 张奎星, 盛海辉, 金麟, 等. 血管紧张素原基因启动子区域单核苷酸多态性与心肌梗死的相关性. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (1): 73-76
- [5] Zhang J, Chen LL, Guo ZF, Peng CY, Liao DF, Li K. On/ off switch mediated by Exo+ polymerases: experimental analysis for its physiological and technological implications. *J Biochem Mol Biol*, 2003, **36** (6): 529-532
- [6] 郭紫芬, 陈琳玲, 张佳, 彭翠英, 杨向东, 张旭, 等. 聚合酶 3' 外切活性对 3' 硫化修饰引物聚合反应的影响. *中华医学遗传学杂志*, 2003, **20** (4): 328-390
- [7] Zhang J, Meng B, Liao DF, Zhou L, Zhang X, Chen LL, et al. De novo synthesis of PCR templates for the development of SARS diagnostic assay. *Mol Biotechnol*, 2003, **25** (2): 107-113
- [8] 范海荣, 夏永静, 孙福成, 何青. 四种全血基因组 DNA 提取方法的比较. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (6): 535-536
- [9] Abbas A, Lepelletier M, Lechevalier M, Sichel F. Assessment of DHPLC usefulness in the genotyping of GSTP1 exon 5 SNP: comparison to the PCR-RFLP method. *J Biochem Biophys Methods*, 2004, **59** (2): 121-126
- [10] Sasaki M, Nomoto M, Yonezawa S, Nakagawa M, Sakuragi N, Fujimoto S, et al. Distribution of a single nucleotide polymorphism on codon 211 of the androgen receptor gene and its correlation with human renal cell cancer in Japanese patients. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **321** (2): 468-471
- [11] Chen JF, Long GF, Lin WX, Chen P. Beta-thalassemia mutations and single nucleotide polymorphism at -158 of Ggamma globin gene associated with altered levels of Hb F in beta-thalassemia heterozygotes. *中华医学遗传学杂志*, 2004, **21** (5): 498-501
- [12] Jiang R, Li J, Qu L, Li H, Yang N. A new single nucleotide polymorphism in the chicken pituitary-specific transcription factor (POU1F1) gene associated with growth rate. *Anim Genet*, 2004, **35** (4): 344-346
- [13] 张思仲. 人类基因组的单核苷酸多态性及其医学应用. *中华医学遗传学杂志*, 1999, **16** (2): 119-122
- [14] Kim YJ, Park MH, Park HS. Associations of polymorphisms of the angiotensinogen M235 polymorphism and angiotensin converting enzyme intron 16 insertion/deletion polymorphism with preeclampsia in Korean women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2004, **116** (1): 48-53

(此文编辑 胡必利, 文玉珊)