

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.16.021

PCR-CTPP 在 DNA 碱基切除修复基因 SNP 分型中的应用

彭 杨,程 焰,杨宇馨,李崇义,李梦侠,张诗珩,王 东[△]

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,重庆 400042)

[摘要] 目的 分析两对引物-聚合酶链式反应(PCR-CTPP)在碱基切除修复(BER)途径基因单核苷酸多态性(SNP)分型中的应用,为发现新的SNP检测方法提供实验依据。方法 采用PCR-CTPP扩增BER途径关键蛋白OGG1、XRCC1及APE1 4个常见SNP位点OGG1 Ser326Cys、XRCC1 Arg399Gln、APE1 Asp148Glu及-141T/G(位于启动子区域)的DNA片段,凝胶电泳显像后判读基因型,同时与DNA测序的方式比对各基因位点的准确性。结果 PCR-CTPP方法基因分型结果与DNA测序得到的基因分型结果完全一致。结论 PCR-CTPP技术可靠、快速,其广泛应用能够有助于基因SNP的分型研究。

[关键词] 多态性,单核苷酸;两对引物-聚合酶链式反应;碱基切除修复途径

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)16-2226-03

The role of polymerase chain reaction with confronting two-pair primers in SNP genotyping of DNA base excision repair genes

Peng Yang, Cheng Yi, Yang Yuxin, Li Chongyi, Li Mengxia, Zhang Shiheng, Wang Dong[△]

(Cancer Research Center of Field Surgery Institute, the Affiliated Daping

Hospital of Third Medical University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective** It is important to precisely determinate the single nucleotide polymorphisms (SNPs) in many genes including genes related with base excision repair (BER) pathway. This research is conducted to evaluate the role of polymerase chain reaction with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) in analyzing the SNPs of BER pathway. **Methods** Four common SNPs of BER pathway (OGG1 Ser326Cys, XRCC1 Arg399Gln, APE1 Asp148Glu and -141T/G in the promoter region) was detected with PCR-CTPP. 10 of the products were sent for genotype sequencing. Compare the results of PCR and sequencing to evaluate the accuracy of PCR-CTPP. **Results** The genotypes were exactly the same as the sequencing. **Conclusion** The PCR-CTPP was a reliable and rapid detective technology for SNPs genotyping. Its broadest application would be great help for gene variant analysis.

[Key words] polymorphism, single nucleotide; polymerase chain reaction with confronting two-pair primers; base excision repair

DNA损伤可被体内外一系列理化因素诱发,是影响细胞生理功能甚至存活的重要过程。精确的DNA修复过程对于维持细胞正常状态及染色体稳定性十分重要^[1]。碱基切除修复(base excision repair,BER)通路是修复DNA损伤的重要途径,其目的是移除和代替受损的核苷酸。这个过程通常由某种底物特异性的DNA糖基化酶启动,糖基化酶可以识别和切除一些经过特定修饰的碱基,所产生的脱嘌呤/脱嘧啶(AP)位点,则是被AP内切酶,即脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶(apurinic/aprimidinic endonuclease, APE1,也称为APEX1或Ref-1)剪切。随后产生的AP位点由DNA连接酶修补^[2]。参与BER途径的关键蛋白主要有3种,8-羟基鸟嘌呤DNA糖苷酶(8-Oxoguanine glycosylase, OGG1),APE1和X线修复交叉互补基因1(X-ray cross complementing group 1,XRCC1)。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)是一种常见的基因变异,研究发现基因的SNP可能通过改变蛋白的结构或活性从而参与众多生物学过程。通过高通量测序、芯片等方式确定功能性SNP的基因型和氨基酸,对于明确其生物学功能,研究其与临床问题间的相关性具有重要意义^[3-4]。DNA修复途径的SNPs被证实可能引起多种肿瘤发病风险的改变^[5-7]。在BER途径的3种关键蛋白中,研究最多的SNP位点包括OGG1 Ser326Cys、APE1 Asp148Glu及XRCC1 Arg399Gln,这些变异位点都位于编码区,可能导致蛋白序列的改变,而非编码区,特别是启动子区域的基因变异可能会导致基因表达的变化,从而产生后续的生物学效应。因

此,确定这些蛋白的基因分型可能具有重要意义。

常用的检测SNP基因分型的方法包括高通量的SNP芯片和采用Taqman探针的PT-PCR,以及低通量的限制片段长度基因分型-PCR(PCR-restriction fragment length polymorphism genotyping, PCR-RFLP)。但目前而言,由于普通实验室及临床应用上难以在短时间内获取大量样本,因此高通量检测的实用性在普通临床检验上受到极大限制;PCR-RFLP是一种常用的廉价检测方式,其原理基于内切酶剪切,关键技术在于选择合适的内切酶及引物,若是存在错配序列的话还需设计专门的错配引物,因此极大的增加了研究难度,导致整体实验时间延长^[8]。因此,新的SNP基因分型方法亟待推广。两对引物-聚合酶链式反应(PCR-confronting two-pair primers, PCR-CTPP)是一种新型的SNP基因分型方法,已有研究报道其已经成功完成了超过30种不同的SNP分型^[9]。本试验以PCR-CTPP方法检测在BER途径3种蛋白的4个SNP位点(OGG1 Ser326Cys、APE1 Asp148Glu、-141T/G及XRCC1 Arg399Gln),并与DNA测序结果进行比较,进一步探讨该方法在基因SNP检测与分析中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究收集了第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心2014年1~6月住院非小细胞肺癌患者的血液样本。所有患者均已经病理学或细胞学确诊。采用EZ-NASE血DNA试剂盒(Omega Bio-tek, Norcross, GA, United States)提取每位患者的基因组DNA,并分装冻存于-80℃。

表 1 4 种 SNPs 的引物序列及扩增片段长度

目的基因	引物序列	对应的等位基因及扩增产物长度
OGG1 Ser326Cys	F1;5'-CAGCCCAGACCCAGTGGACTC-3';R1;5'-TGGCTCTGAGCATGGCGGG-3' F2;5'-CAGTGGCACCTGCGCCAATG-3';R2;5'-GGTAGTCACAGGGAGGCC-3'	C 等位基因(252 bp) G 等位基因(194 bp)
XRCC1 Arg399Gln	F1;5'-TCCCTGCGCCGCTGCAGTTCT-3';R1;5'-TGGCGTGTGAGGCCTTACCTCC-3' F2;5'-TCGGCGGCTGCCCTCCA-3';R2;5'-AGCCCTCTGTGACCTCCCAGGC-3'	G 等位基因(447 bp) A 等位基因(222 bp)
APE1 Asp148Glu	F1;5'-CCTACGGCATAGGTGAGACC-3';R1;5'-TCCTGATCATGCTCCTCC-3' F2;5'-TCTGTTTCATTTCTATAAGCGAT-3';R2;5'-GTCAATTCTTCATGTGCCA-3'	G 等位基因(167 bp) T 等位基因(236 bp)
APE1 启动子-141T/G	F1;5'-CTAACTGCCAGGGACGCCGA-3';R1;5'-ACACTGACTTAAGATTCTAACTA-3' F2;5'-ACTGTTTTTCCCTTGCACAG-3';R2;5'-TGAGCAAAAGAGCAACCCCG-3'	T 等位基因(136 bp) G 等位基因(335 bp)

所提取的标本用于检测以下 DNA 位点: OGG1 (rs1052133; Ser326Cys, C/G 位于 7 号外显子), APE1 (rs1130409; Asp148Glu, T/G 位于 5 号外显子及 rs1760944; -141T/G 位于启动子区), 以及 XRCC1(rs25487; Arg399Gln, G/A 位于 10 号外显子)。试验流程及标本采集过程经大坪医院伦理委员会讨论通过,并已获得每位患者的知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 引物序列 根据 GenBank,结合合适的退火温度等条件设计引物序列,见表 1。

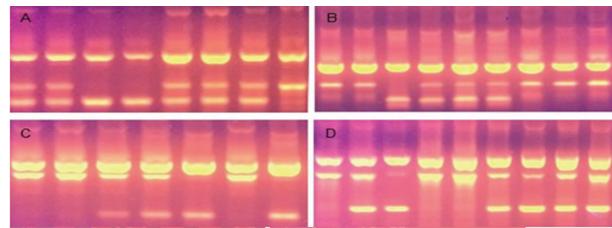
1.2.2 PCR-CTPP 检测与基因型判读 PCR 扩增体系为 25 μ L, 包括 2 μ L 基因组 DNA, 12.5 μ L Go Taq MIX(2x) 及 6.5 μ L dH₂O, 每个体系里都包含有该位点的 4 种引物各 1 μ L。反应条件为 95 °C 变性 10 min; 同样温度下 1 min 为 1 个循环, 共计 30 或 32 个循环; 退火时间为 1 min, 温度分别为 64 °C (OGG1 Ser326Cys), 60 °C (APE1 Asp148Glu), 58 °C (APE1-141T/G) 与 66 °C (XRCC1 Arg399Gln); 最后 72 °C 下延长 1 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后观察条带, 判读基因型。

1.2.3 基因测序 所有样本完成 PCR 扩增后, 将 30 例扩增产物送上海 Sangon 进行测序。

2 结 果

图 1A 为 OGG1 Ser326Cys 琼脂糖电泳结果。结果发现在 3 个位置都出现了条带, 最上的条带位于 446 bp 处, 可称为条带 1; 中间的条带位置在 252 bp 处, 为条带 2; 而最末条带位于 194 bp 处, 称为条带 3。第 1、2、5、6、7 条带 5 个标本条带 1、2、3 皆有, 提示为 C/G 型杂合产物, 而第 3、4 标本只有条带 1 和 3, 提示为 GG 纯合型, 第 8 个标本只有条带 1 和 2, 则为 CC 纯合型。图 1B、图 1C 和图 1D 是其余 3 个基因的琼脂糖电泳结果。根据图 1B 可知第 1、2、7、8、9 条带 5 个标本为条带 1 和条带 2, 判定为 GG 纯合型; 第 3 个标本为条带 1 和条带 3, 判定为 TT 纯合型; 第 4、5、6 条带 3 个标本均有, 判读为 T/G 杂合型。图 1C、D 的判读方法相同, 图 1C 提示第 1、2 和 6 个标本为 TT 纯合型, 第 5 和 7 标本为 GG 纯合型, 剩余为 T/G 杂合型; 图 1D 提示第 1、4 和 5 号标本为 GG 纯合型, 第 3 号标本为 AA 纯合型, 其余标本为 G/A 杂合型。

L1400433 标本同 4 个位点的测序分析结果, 根据比对发现, PCR-CTPP 结果与测序结果完全一致, 证实实验结果准确可靠, 见图 2。



A: OGG1 Ser326Cys; B: APE1 Asp148Glu; C: APE1-141T/G; D: XRCC1 Arg399Gln。

图 1 4 个位点琼脂糖电泳结果

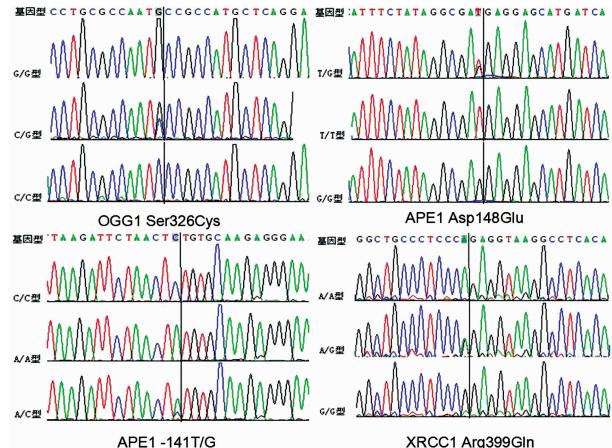


图 2 4 个 SNP 位点的测序结果

3 讨 论

PCR-CTPP 是由 Hamajima 等在 2001 年提出, 它的设计原理是采用等位基因特异的两对引物进行 PCR 扩增。对于一个 SNP 位点的 X 或 Y 碱基而言, X 等位基因的一个引物(如 1R 反义引物)被设计为在 3' 端包含 X', 即 X 等位基因的反义核苷酸; 而它的对向引物(1F 正向引物)则位于其上游 a 个 bp 的位置。同样, Y 等位基因的正义引物包含 Y 等位基因, 其反义引物位于其下游 b 个 bp 的位置。其中两个扩增片段的长短(a 和 b)必须有足够的区分度, 以便于在琼脂糖凝胶电泳的过程中能够分离条带并便于读取。在这种设计下, 另有一段长度为 c 的片段(由 1F 和 2R 扩增得到), c 的长度为 a 与 b 之和去掉由 1R 和 2F 扩增得到的片段长度, 是整个产物中最长的片段^[10]。经过多年应用中的不断改良^[9,11], PCR-CTPP 方法迄今已完成多种基因 SNP 位点的基因分型^[12]。

既往采用的 SNP 分型方法包括直接测序、Taqman 探针和

PCR-RFLP 法。前两种方法是通过直接读取 DNA 序列而得到不同分型,而 PRC-RFLP 则与 CTPP 法类似,也是先通过 PCR 扩增目的基因的方式,不同的是前者采用特异性的限制性内切酶切割扩增产物,从而达到分型效果^[13]。相对 CTPP 法而言,RFLP 法由于酶切反应导致耗时较长,且由于限制性酶切引物的设计限制了其在同一块凝胶上同时观察多个 SNP 位点基因型的能力,因此限制了其在临床检测的广泛应用。而 CTPP 法的分型则是在 PCR 扩增过程中完成,因此能够弥补这两点不足。PCR 退火阶段的温度对于形成特定的 DNA 片段十分重要,由于 PCR-CTPP 方法的 4 种引物存在于同一反应体系中,因此,4 种引物的退火引物必须十分接近,以便在同一退火温度下进行反应。在本研究中所采用的 4 个基因的引物,其退火温度介于 58~66 ℃,符合反应条件,在设定温度下能够使 DNA 片段顺利形成。

本研究发现,PCR 产物中最长的片段与 DNA 的完整性有一定关联,浓度较低或保存较长时间的样本其片段亮度较浓度高、保存时间短的样本低,因此在未特殊设计阴�性对照的条件时,可以参照这一片段情况进行判读。

本研究通过 PCR-CTPP 的方法,与基因测序进行比对,确定了采用成对引物体系对 BER 途径 3 个关键蛋白基因的 4 个 SNP 位点进行基因分型,得到的结果证实了 PCR-CTPP 方法是切实可行的。然而,由于这种方法的引物条件较为苛刻,综合反应体系成分较为复杂,且最终的判读依赖琼脂糖凝胶电泳的条带,因此对于这种技术的进一步优化仍需继续进行。

参考文献

- [1] Czarny P, Pawlowska E, Bialkowska-Warzecha J, et al. Autophagy in DNA damage response[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(2): 2641-2662.
- [2] Maynard S, Schurman SH, Harboe C, et al. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(1): 2-10.
- [3] Schwartz S. Clinical utility of single nucleotide polymorphism arrays[J]. Clin Lab Med, 2011, 31(4): 581-594.
- [4] Carlton VE, Ireland JS, Useche F, et al. Functional single nucleotide polymorphism-based association studies [J]. Hum Genomics, 2006, 2(6): 391-402.
- [5] Li Z, Guan W, Li MX, et al. Genetic polymorphism of

(上接第 2225 页)

- [8] Sahin M, Portakal O, Karagoz T, et al. Diagnostic performance of BNP and NT-ProBNP measurements in children with heart failure based on congenital heart defects and cardiomyopathies [J]. Clin Biochem, 2010, 43 (16/17): 1278-1281.
- [9] Görmüs U, Ozmen D, Ozmen B, et al. Serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-pro-BNP) and homocysteine levels in type 2 diabetic patients with asymptomatic left ventricular diastolic dysfunction [J]. Diabetes research and clinical practice, 2010, 87(1): 51-56.
- [10] 吴蓉洲, 张松跃, 夏天和, 等. 室间隔缺损患儿封堵术前后血浆 N 末端 B 型利钠肽原和左心室 Tei 指数变化的意义 [J]. 中华心血管杂志, 2011, 39(4): 325-328.
- [11] 万继荣, 何敏华, 梁宇珊, 等. 轻度窒息新生儿动态心电图

DNA base-excision repair genes (APE1, OGG1 and XRCC1) and their correlation with risk of lung cancer in a Chinese population [J]. Arch Med Res, 2011, 42(3): 2262-2234.

- [6] Canbay E, Cakmakoglu B, Zeybek U, et al. Association of APE1 and hOGG1 polymorphisms with colorectal cancer risk in a Turkish population [J]. Curr Med Res Opin, 2011, 27(7): 1295-1302.
- [7] Jelonek K, Gdowicz-Klosok A, Pietrowska M, et al. Association between single-nucleotide polymorphisms of selected genes involved in the response to DNA damage and risk of colon, head and neck, and breast cancers in a Polish population [J]. J Appl Genet, 2010, 51(3): 343-352.
- [8] Zhang R, Zhu Z, Zhu H, et al. SNP Cutter: a comprehensive tool for SNP PCR-RFLP assay design [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33 (Web Server Issue): W489-492.
- [9] Yang CH, Cheng YH, Chuang LY, et al. Confronting two-pair primer design for enzymefree SNP genotyping based on a genetic algorithm [J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11 (509): 11.
- [10] Hamajima N. PCR-CTPP: a new genotyping technique in the era of genetic epidemiology [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2001, 1(1): 119-123.
- [11] Yin G, Mitsuda Y, Ezaki T, et al. A new PCR method: one primer amplification of PCR-CTPP products [J]. Mol Biotechnol, 2012, 52(2): 180-183.
- [12] Maruyama C, Suemizu H, Tamamushi S, et al. Genotyping the mouse severe combined immunodeficiency mutation using the polymerase chain reaction with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) [J]. Exp Anim, 2002, 51(4): 391-393.
- [13] Bazakos C, Dulger AO, Uncu AT, et al. A SNP-based PCR-RFLP capillary electrophoresis analysis for the identification of the varietal origin of olive oils [J]. Food Chem, 2012, 134(4): 2411-2418.

(收稿日期:2015-12-22 修回日期:2016-03-01)

及心肌酶变化的临床研究 [J]. 中国新生儿科杂志, 2014, 29(3): 171-174.

- [12] 徐孝华, 黄国英, 陈超, 等. 新生儿窒息后肺动脉高压对心功能影响的研究 [J]. 中国实用儿科杂志, 2008, 23(9): 667-669.
- [13] Heeschen C, Hamm CW, Mitrovic V, et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels for dynamic risk stratification of patients with acute coronary syndromes [J]. Circulation, 2004, 110(20): 3206-3212.
- [14] 苑文雯, 王晗, 耿伟, 等. N 末端脑钠肽前体水平对预测窒息新生儿心肌损害的价值探讨 [J]. 检验医学与临床, 2014, 22(22): 3112-3113.

(收稿日期:2015-12-08 修回日期:2016-02-28)