

代谢酶基因单核苷酸多态性两对引物-聚合酶链反应技术方法的建立及初步应用

傅晶 杨亦荣 倪晓洁 潘晓东 郑建建 郑少玲 林刃舆 蔡明 陈必成

【摘要】 目的 采用相对的两对引物-聚合酶链反应技术(PCR-CTPP),建立简单、准确、快速、经济、大规模检测代谢酶基因单核苷酸多态性(SNPs)的方法。方法 针对 I 相代谢酶 CYP1A1(A4889G)和 II 相代谢酶 EPHX1(A416G)、NQO1(C609T) SNPs 设计 PCR-CTPP 引物,优化 PCR 反应条件,将其基因分型结果与 DNA 测序结果进行比对,验证准确性。用该 PCR-CTPP 检测方法对随机选取的 183 名汉族健康人进行上述 SNPs 检测,并与其他健康人群进行比较。结果 通过条件优化,PCR-CTPP 检测方法可快速清晰地区分 CYP1A1(A4889G)、EPHX1(A416G)和 NQO1(C609T) 的基因型,并与 DNA 测序结果相符合。183 名汉族健康人中,CYP1A1(A4889G):A 纯合子 103 例(56.3%),G 纯合子 8 例(4.4%),A/G 杂合子 72 例(39.3%);EPHX1(A416G):A 纯合子 142 例(77.6%),G 纯合子 4 例(2.2%),A/G 杂合子 37 例(20.2%);NQO1(C609T):C 纯合子 60 例(32.8%),T 纯合子 32 例(17.5%),C/T 杂合子 91 例(49.7%)。基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$),且存在种族差异($P<0.05$)。结论 PCR-CTPP 检测方法可简单、准确、快速、经济、大规模地检测代谢酶基因 SNPs,可用于临床和流行病学大样本筛选。

【关键词】 单核苷酸多态性;两对引物-聚合酶链反应技术;细胞色素 P450 酶;环氧化物水解酶;醌氧化还原酶

Establishment and preliminary application of polymerase chain reaction with confronting two-pair primers for the single nucleotide polymorphisms of metabolic enzymes FU Jing*, YANG Yi-rong, NI Xiao-jie, PAN Xiao-dong, ZHENG Jian-jian, ZHENG Shao-ling, LIN Ren-yu, CAI Ming, CHEN Bi-cheng. *Transplant Center, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China

Corresponding author: CHEN Bi-cheng, Email: CBC@HOSP1.AC.CN

【Abstract】 Objective To develop a simple, accurate, rapid, economic, large-scale detection method for the detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs) metabolic enzymes, using polymerase chain reaction with confronting two-pair primers (PCR-CTPP). **Methods** The primers of CYP1A1 (A4889G), EPHX1 (A416G) and NQO1 (C609T) were designed for PCR-CTPP, and the PCR conditions were optimized. The results of genotyping were verified by DNA sequencing. The above SNPs were detected by the PCR-CTPP detection method in a randomly selected 183 healthy individuals of Han ethnicity. The genotype frequencies were analyzed and compared with people from other ethnicities. **Results** The allele-specific bands of CYP1A1 (A4889G), EPHX1 (A416G) and NQO1 (C609T) were successfully amplified by PCR-CTPP under the optimal conditions and the results of genotyping were consistent with DNA sequencing. Among 183 healthy Han individuals, the genotypic distributions of CYP1A1 (A4889G), EPHX1 (A416G) and NQO1 (C609T) showed that the wild-type, homozygous variants, and heterozygotes were 103 (56.3%), 8 (4.4%), 72 (39.3%) and 142 (77.6%), 4 (2.2%), 37 (20.2%), 60 (32.8%), 32 (17.5%), 91 (49.7%) respectively. The distributions of genotypes were all in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium ($P>0.05$), with statistical differences and with other ethnic populations ($P<0.05$). **Conclusion** The SNPs of metabolic enzymes can be detected by PCR-CTPP method which is simple, accurate, rapid, economic and with large scale. PCR-CTPP can be used for large scale clinical and epidemiological screening.

【Key words】 Polymorphism, single nucleotide; Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers; Cytochrome P450; Epoxide hydrolase; Quinone oxidoreductase

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.01.018

作者单位: 325000 温州医学院附属第一医院移植中心(傅晶、杨亦荣、倪晓洁、潘晓东、郑建建、郑少玲、林刃舆、陈必成);解放军总医院第二附属医院器官移植中心(蔡明)

通信作者: 陈必成, Email: CBC@HOSP1.AC.CN

进入人体的绝大部分环境化学致癌物通过 I 相代谢酶催化的氧化反应激活,而为 II 相代谢酶所解毒。研究发现,许多代谢酶都具有单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs), 其表达产物蛋白酶活性不同, 催化致癌物的氧化和解毒能力存在差异。近年来, 有关代谢酶基因 SNPs 与肿瘤遗传易感性的分子流行病学方面的研究已成为热点^[1]。但目前缺少可简单、准确、快速、经济、大规模地检测代谢酶基因 SNPs 的方法。本研究旨在通过采用相对的两对引物-聚合酶链反应技术 (polymerase chain reaction with confronting two-pair primers, PCR-CTPP)^[2], 以 I 相代谢酶细胞色素 P450 1A1 (cytochrome P450 1A1, CYP1A1) 和 II 相代谢酶环氧化物水解酶 (epoxide hydrolase, EPHX1)、醌氧化还原酶 [NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1, NQO1] 基因 SNPs 为检测代表, 探讨上述方法的建立。

材料与方 法

1. 主要试剂及仪器: Puregene DNA 提取试剂盒购于美国 Gentra 公司; dNTP 和 TaqDNA 聚合酶购于立陶宛 MBI 公司; 琼脂糖购于美国 Promega 公司。Anke TDL80-2B 型飞鸽牌离心机 (上海安亭科学仪器厂), GeneAmp PCR System 9600 PCR 仪 (美国 PerkinElmer 公司), DYY-III 2 型电泳仪 (北京六一仪器厂), UV-2102C 紫外可见分光光度计 (美国 Unico 公司) 和 Gel Doc 2000 凝胶电泳成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2. 研究对象: 均来自温州地区无血缘关系、汉族健康个体, 共采集标本 183 份 (男 111 份、女 72 份)。抽取静脉血液 2 ml, 乙二胺四乙酸二钾 (EDTA-K₂) 抗凝, 4℃ 保存。标本采集遵循知情同意原则, 签订知情同意书。

3. DNA 的提取: 采用 Puregene DNA 提取试剂盒提取 DNA, 具体操作参照其说明书。DNA 提取后用紫外可见分光光度计检测纯度和浓度, -20℃ 保存。

4. 引物设计: 根据 GenBank 数据库登录的 CYP1A1、EPHX1、NQO1 基因序列, 应用 Oligo 6.0 软件设计引物, 经 BLAST 软件分析后, 最终确定 12 条引物 (表 1)。全部引物由上海 Invitrogen 生物技术有限公司合成。

5. PCR-CTPP 扩增及优化: 在 96 孔反应板中加入反应体系 10 μl, 最初包含 DNA 模板 1.0 μl (30 ~ 100 ng/μl), dNTP 0.1 mmol/L、TaqDNA 聚合酶

0.4 U、10 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.3, 25℃)、50 mmol/L KCl、2 mmol/L MgCl₂、50 g/L 甘油、每一引物 0.1 μl (10 pmol/μl)。最初 PCR 反应条件: 94℃, 10 min; 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。在此基础上对反应温度、反应时间、引物浓度、缓冲液浓度进行优化, 达到通过凝胶电泳成像系统可获得较为均一、清晰的条带的结果。

表 1 CYP1A1 (A4889G)、EPHX1 (A416G) 和 NQO1 (C609T) 引物序列

基因	引物 ^a	引物序列 (5'→3')	Tm ^b	扩增长度 (bp)
CYP1A1 (A4889G)	FA1	GACCTCCCAGCGGGCCAT	60.8	239
	RG1	CGGAAGTGTATCGGTGAGATCG	56.9	362
	R1	GCCTGTCCCTCTATCCTTTGGG	56.1	562
	F1	AGGCAAGTCCAGGGTAGGG	57.0	—
EPHX1 (A416G)	FA2	CAGCTGCCCGCAGGCGAT	62.6	226
	RG2	GCAAGGGCGTCGGGGTG	60.5	458
	R2	GGGGCAGTTATGGAACCTCTAGCA	59.5	650
NQO1 (C609T)	F2	GGCTTTCTCCCTACCTCCAGAT	59.0	—
	FT3	ATTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGTAT	56.1	223
	RC3	CCCAATGTCTAATATGCAGTTGCCG	58.1	477
	R3	AATTTCTTGTTTTCTCCTCATCCTG	54.1	650
	F3	GACGACCGAGCGAGACTCT	57.7	—

注: ^aF 表示上游引物, R 表示下游引物; ^b 为解链温度 (℃)

6. PCR-CTPP 产物分析: 取 10 μl PCR 反应产物加入 2% 琼脂糖凝胶板的加样孔中, 以溴化乙锭 (0.5 μg/ml) 为染色剂, 在 100 V 电压下电泳 20 ~ 25 min, 最后通过凝胶电泳成像系统成像分析。

7. DNA 测序验证: 根据 PCR-CTPP 产物分析结果, 随机选取 CYP1A1 基因型分别为 AA、AG 和 GG 的 DNA 各 10、7 和 3 例, EPHX1 基因型分别为 AA、AG 和 GG 的 DNA 各 10、5 和 3 例, NQO1 基因型分别为 CC、CT 和 TT 的 DNA 各 6、9 和 3 例, 进行测序验证。由上海 Invitrogen 生物技术有限公司进行 DNA 测序。

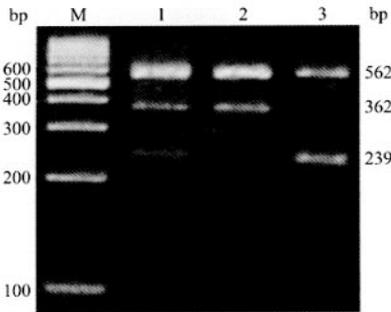
8. 统计学分析: 基因型分布与 Hardy-Weinberg 平衡的符合检验采用上海交通大学 Bio-X 中心的 SHEsis 分析平台进行处理^[3], 另应用 SPSS 13.0 软件完成基因型分布与欧美及其他亚洲人群比较的 χ² 检验。P < 0.05 具有统计学意义, 统计检验为双侧概率检验。

结 果

1. PCR-CTPP 优化: CYP1A1 (A4889G)、NQO1 (C609T) 反应条件优化为: 94℃, 3 min; 94℃ 10 s, 63℃ 1 min, 72℃ 30 s, 10 个循环; 94℃ 10 s, 61℃

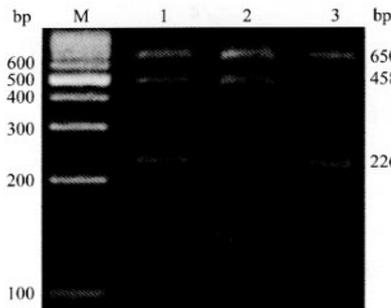
20 s, 72℃ 30 s, 20个循环; 72℃, 10 min。KCl浓度40.0 mmol/L; 引物浓度FA1: 4.3 pmol/μl、RG1: 6.4 pmol/μl、R1: 10.6 pmol/μl、F1: 21.3 pmol/μl、FT3: 10 pmol/μl、RC3: 8 pmol/μl、R3: 5 pmol/μl、F3: 4 pmol/μl。EPHX1(A416G)优化为: 94℃, 3 min; 94℃ 10 s, 63℃ 1 min, 72℃ 30 s, 10个循环; 94℃ 10 s, 61℃ 35 s, 72℃ 45 s, 20个循环; 72℃, 10 min。引物浓度FA2: 6 pmol/μl、RG2: 20 pmol/μl、R2: 4 pmol/μl、F2: 4 pmol/μl; KCl浓度亦40.0 mmol/L。在上述情况下可获得最为均一、清晰的条带, 总反应时间均在1.5 h内。

2. PCR-CTPP分型: 在上述优化条件下, PCR-CTPP检测方法可快速、清楚地区分CYP1A1(A4889G)、EPHX1(A416G)和NQO1(C609T)的基因型(图1~3)。



注: M: DNA分子质量标准; 1: AG基因型; 2: GG基因型; 3: AA基因型

图1 CYP1A1(A4889G)的PCR-CTPP扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

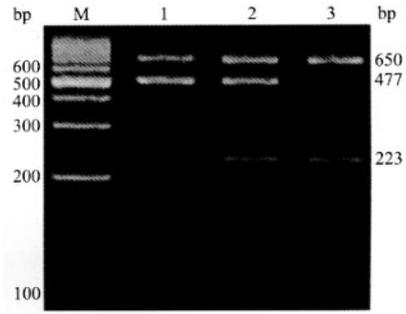


注: 同图1

图2 EPHX1(A416G)的PCR-CTPP扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

3. DNA测序验证: 成功测序出上述SNPs的基因型, 随机选取的样本基因型测序验证准确率达100%(图4~6)。

4. 等位基因及基因型分布: 见表2。基因型分布均符合Hardy-Weinberg平衡($P>0.05$)。



注: M: DNA分子质量标准; 1: CC基因型; 2: TC基因型; 3: TT基因型

图3 NQO1(C609T)的PCR-CTPP扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

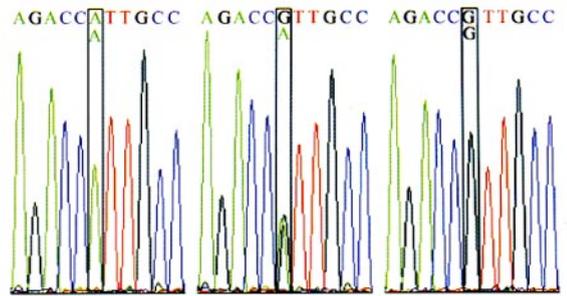


图4 CYP1A1(A4889G)的A纯合子、A/G杂合子、G纯合子DNA测序结果

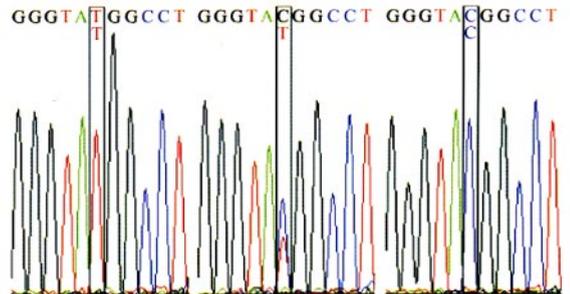


图5 EPHX1(A416G)的A纯合子、A/G杂合子、G纯合子DNA测序结果

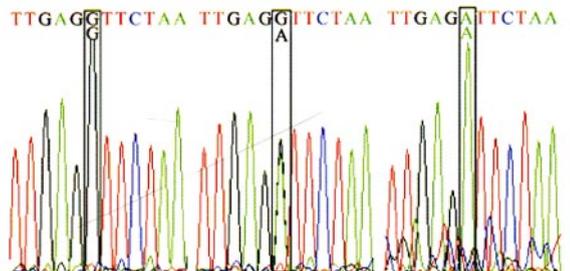


图6 NQO1(C609T)的C纯合子、C/T杂合子、T纯合子DNA测序结果

5. 与其他健康人群比较: CYP1A1基因型分布

表 2 183 名汉族健康人中 CYP1A1、EPHX1 和 NQO1 等位基因及基因型分布情况

基因	等位基因	等位基因频率 (%)	基因型	基因型频率 (%)	Hardy-Weinberg 平衡*	
					χ^2 值	P 值
CYP1A1 (A4889G)	A	278(76.0)	AA	103(56.3)	1.090	0.296
	G	88(24.0)	AG	72(39.3)		
			GG	8(4.4)		
EPHX1 (A416G)	A	321(87.7)	AA	142(77.6)	0.715	0.398
	G	45(12.3)	AG	37(20.2)		
			GG	4(2.2)		
NQO1 (C609T)	C	211(57.7)	CC	60(32.8)	0.062	0.804
	T	155(42.3)	CT	91(49.7)		
			TT	32(17.5)		

注: * Hardy-Weinberg 平衡符合度检验, SHEsis 分析平台处理, $P < 0.05$ 差异具有统计学意义

与美籍高加索人^[4]、美籍非洲人^[4]、欧洲人^[5]比较差异均具有统计学意义 ($\chi^2 = 65.590, P = 0.000; \chi^2 = 57.405, P = 0.000; \chi^2 = 201.893, P = 0.000; P < 0.05$), 而与韩国人^[6]比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 5.916, P = 0.052, P > 0.05$); EPHX1 基因型分布与美籍非洲人^[7]、欧洲人^[5]比较差异均具有统计学意义 ($\chi^2 = 21.950, P = 0.000; \chi^2 = 10.915, P = 0.004, P < 0.05$), 而与美籍墨西哥人^[7]、日本人^[8]比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 4.457, P = 0.095; \chi^2 = 4.983, P = 0.083; P > 0.05$); NQO1 基因型分布与美籍非西班牙裔高加索人^[9]、瑞典人^[10]比较差异均具有统计学意义 ($\chi^2 = 113.137, P = 0.000; \chi^2 = 50.205, P = 0.000; P < 0.05$), 而与日本人^[11]比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.902, P = 0.637; P > 0.05$)。

讨 论

大量分子流行病学研究已经表明, 人群中肿瘤遗传易感性除 1% ~ 2% 是显性的遗传缺陷综合征所致外, 绝大部分与低危险的遗传性代谢酶基因多态性相关, 其中与第三代遗传标志 SNPs 的关系尤为密

切^[1]。但目前缺少既具有经济性, 又具有实验性的代谢酶基因 SNPs 的检测方法。

PCR-CTPP 作为 SNPs 检测的新技术, 其原理是根据 SNPs 位点不同的等位基因 (X, Y) 设计相对的两对引物^[2] (图 7), 引物 1F 和 1R 扩增包含 X, 长度为 a bp 的片段, X 的互补核苷酸 X' 位于 1R 的 3' 末端; 引物 2F 和 2R 扩增包含 Y, 长度为 b bp 的片段, Y 位于 2F 的 3' 末端; 而引物 1F 和 2R 扩增的片段为共同片段, 长度为 c bp。 $c = a + b - (d - 1)$, d 是引物 2F 和 1R 长度的和。对于 XX、YY 纯合子, 仅能扩增出 a bp 和 c bp 或 b bp 和 c bp 两片段; 而 XY 杂合子能扩增出 a bp、b bp 和 c bp 三片段。为了能清楚的分辨, a、b 和 c 需满足至少相差 100 bp。c 也不宜太长, 否则不利其片段扩增。

PCR-CTPP 技术是在序列特异性聚合酶链反应技术 (polymerase chain reaction with sequence specific primers, PCR-SSP) 和多重 PCR 技术基础上建立的。PCR-CTPP 技术除具有 PCR-SSP 技术较高的特异性、灵敏度和稳定性, 及操作简单、快速、实验结果容易判断等的优点外, 因其所有引物都放在一个反应体系中, 既节省了反应体系的配置时间, 又可一次扩增更多的样本, 不但加快了样本处理速度, 还减少了成本。PCR-CTPP 与多重 PCR 技术都可一次扩增多个等位基因, 具有高效性, 但 PCR-CTPP 技术对引物设计及反应条件的要求更高^[12]。其 4 条引物不但需符合前述的设计原理, 还要求具有相近的解链温度, 以防止因竞争性扩增而造成纯合型的假阳性结果; 反应中也需合适的退火温度, 以避免因非特异性扩增而造成杂合型的假阳性结果。这些严格的要求也使其比多重 PCR 技术具有更高的特异性。

目前研究 SNPs 应用最广泛的是 PCR-RFLP 技术。PCR-CTPP 技术与之比较, 其优势为①更简便、快速和经济。PCR-CTPP 技术只需一个反应体系, 从 DNA 提取、PCR 扩增到结果分析整个过程不

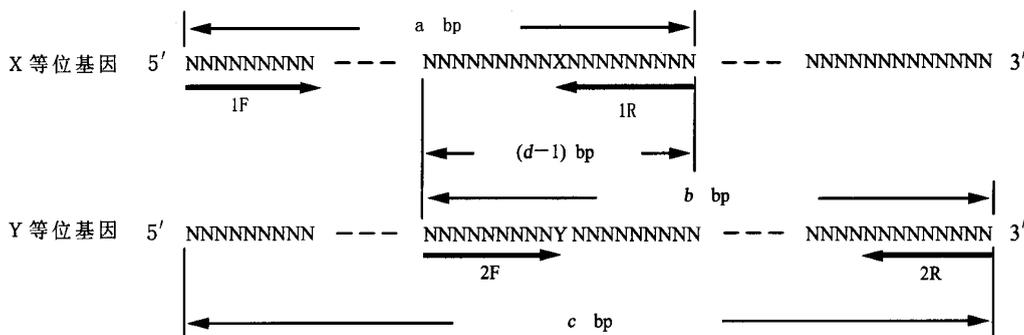


图 7 PCR-CTPP 技术原理示意图

到2.5 h,省去了限制性内切酶所需的消化时间及较高的费用。②具有更广阔的检测范围。PCR-CTPP技术不仅可应用于SNPs,亦可应用于因碱基插入或缺失所致的多态性,也可应用于无适当限制性内切酶的多态性,避免了待检等位基因必须有相应酶切位点的局限。③更稳定、准确。PCR-CTPP技术引物3'端作为引发延伸的起点,具有较高的稳定性,一旦发生碱基错配,在恰当的PCR条件下,扩增便不能有效进行,所形成的共同片段,作为内对照,有效排除了假阴性,避免了内切酶不能充分消化扩增产物的可能,从而降低了出错率。④更便于大规模检测、易于推广。PCR-CTPP技术因具有简便、快速、经济的特点及96孔板的应用使其更便于大规模检测,其在具备常规PCR条件的任何实验室都可以开展,易于推广。然而,PCR-CTPP技术也有其局限性,如引物设计受到SNPs位点两侧核苷酸的限制;4条引物须有相近的解链温度增加了引物设计的难度;和其他PCR技术一样,重复序列和假基因等的存在亦可使引物设计变得困难。

本研究采用PCR-CTPP技术检测了I相代谢酶CYP1A1(A4889G)和II相代谢酶EPHX1(A416G)、NQO1(C609T)SNPs。研究结果显示用该方法所获得的基因型与DNA测序结果一致,基因型分布均符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律。CYP1A1(A4889G)、EPHX1(A416G)和NQO1(C609T)的基因型分布与高加索人群、非洲人群差异均具有统计学意义,与亚洲人群差异则均无统计学意义,与其存在种族差异相一致。

综上所述,PCR-CTPP检测方法为可简单、准确、快速、经济、大规模地检测代谢酶基因SNPs的较好方法,其建立和使用将有助于临床和流行病学大样本肿瘤易感基因的筛选,对肿瘤的发生机制研究,致癌物暴露所引发肿瘤风险的评估,做到真正个体化的肿瘤防治都将起到积极作用。

参 考 文 献

- [1] 王永良,贺智敏,陈主初. 药物代谢酶基因多态性与肿瘤易感性. 国外医学遗传学分册,2001,24(3):161-165.
- [2] Hamajima N. PCR-CTPP: a new genotyping technique in the era of genetic epidemiology. *Expert Rev Mol Diagn*, 2001, 1(1): 119-123.
- [3] Shi YY, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res*, 2005, 15(2): 97-98.
- [4] Cote ML, Wenzlaff AS, Bock CH, et al. Combinations of cytochrome P-450 genotypes and risk of early-onset lung cancer in Caucasians and African Americans: a population-based study. *Lung Cancer*, 2007, 55(3): 255-262.
- [5] Agudo A, Sala N, Pera G, et al. Polymorphisms in metabolic genes related to tobacco smoke and the risk of gastric cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15(12): 2427-2434.
- [6] Park DW, Jin B, Jang D, et al. Genetic polymorphisms of CYP1A1 in a Korean population. *Arch Toxicol*, 2004, 78(6): 306-308.
- [7] Wu X, Gwyn K, Amos CI, et al. The association of microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk in African-Americans and Mexican-Americans. *Carcinogenesis*, 2001, 22(6):923-928.
- [8] Takeyabu K, Yamaguchi E, Suzuki I, et al. Gene polymorphism for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema in a Japanese population. *Eur Respir J*, 2000, 15(5): 891-894.
- [9] Hou L, Chatterjee N, Huang WY, et al. CYP1A1 Val₄₈₈ and NQO1 Ser₆₀₉ polymorphisms, cigarette use, and risk for colorectal adenoma. *Carcinogenesis*, 2005, 26(6):1122-1128.
- [10] Broberg K, Paulsson K, Albin M, et al. Constitutional short telomeres are strong genetic susceptibility markers for bladder cancer. *Carcinogenesis*, 2005, 26(7):1263-1271.
- [11] Kiffmeyer WR, Langer E, Davies SM, et al. Genetic polymorphisms in the Hmong population. *Cancer*, 2004, 10(2): 411-417.
- [12] Hamajima N, Saito T, Matsuo K, et al. Competitive amplification and unspecific amplification in polymerase chain reaction with confronting two-pair primers. *J Mol Diagn*, 2002, 2(4):103-107.

(收稿日期:2008-08-04)

(本文编辑:张林东)