

· 基础研究 ·

优化的多重扩增阻滞突变系统-PCR对载脂蛋白E基因的简易分型

刘 静, 刘建伟, 叶 玲

(解放军总医院老年医学研究所, 北京 100853)

【摘要】 目的 通过改进和优化多重扩增阻滞突变系统-PCR(multi-ARMS-PCR)条件, 建立载脂蛋白E(ApoE)基因的简易分型方法。方法 基于 multi-ARMS-PCR 的原理和特点, 针对文献报道方法中存在的缺陷和错误, 重新设计或改进引物。以外周血白细胞基因组 DNA 为模板, 应用 4 个等位基因特异性寡核苷酸上游引物、1 个通用下游引物和一对内参引物, 分 A, B 两个管同步进行多重 PCR 反应。PCR 扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳分离-EB 染色, 根据电泳带型的差异, 实现对 ApoE 6 种基因型的判定。结果 新引物显著提高了扩增效率和反应特异性, 排除了非特异条带的干扰, 减少了 ApoE 基因分型的错判。结论 采用优化后的 multi-ARMS-PCR 方法对 ApoE 基因型进行鉴定, 具有操作简便、时间短、效率高、成本低的优点, 值得推广。

【关键词】 载脂蛋白 E; 多重扩增阻滞突变系统-PCR; 基因分型

【中图分类号】 R394-33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403(2011)02-0167-05

Apolipoprotein E genotyping by multiplex amplification refractory mutation system PCR with optimized conditions

LIU Jing, LIU Jianwei, YE Ling

(Institute of Geriatrics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】Objective To set up a simple method for apolipoprotein E (ApoE) genotyping by modifying the conditions of multiplex amplification refractory mutation system PCR (multi-ARMS-PCR). **Methods** Based on the principle of multi-ARMS-PCR and considering the faults existed in some published papers, new primers were designed to improve PCR conditions. DNA genome of peripheral white blood cells was used as the template. Four allele-specific oligonucleotide upstream primers, one common downstream primer and a pair of internal positive control primers were constructed. Multi-ARMS-PCR were performed with combination of different primers in 2 reaction tubes synchronously. Amplified multiplex products were electrophoresed on agarose gels containing ethidium bromide. Six ApoE genotypes were distinguished by the band sizes. **Results** Using the new primers, amplification efficiency and specificity were significantly increased and the misclassification was diminished due to removing the interference of non-specific bands. **Conclusion** The optimized multi-ARMS-PCR is an easy, time-saving, efficient and economical method for determination of ApoE genotypes applied in a minimally equipped laboratory.

【Key words】 ApoE; multi-ARMS-PCR; genotyping

This work was supported by Beijing Natural Science Foundation of China (7092097)

载脂蛋白E (apolipoprotein E, ApoE)是一种含有299个氨基酸的单链多肽糖蛋白, 主要存在于乳糜微粒 (chylomicrons, CM)、极低密度脂蛋白胆固醇 (very low-density lipoprotein cholesterol, VLDL-C) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 中。编码ApoE的基因定位于19号染色体长臂, 即19q13.2。ApoE有三个主要等位基因, 即 ϵ_2 , ϵ_3 , ϵ_4 , 构成了6种不同的表型(phenotype): 3种纯合型 (E2/2, E3/3, E4/4) 和三种杂合型(E2/3,

E2/4, E3/4)。 ϵ_3 是最常见的等位基因。一般人群中, ϵ_2 约占8%, ϵ_3 约占78%, ϵ_4 占14%。每个人具有一种基因型 (genotype)。基因频率由高到低的顺序为: ϵ_3/ϵ_3 , ϵ_4/ϵ_3 , ϵ_3/ϵ_2 , ϵ_4/ϵ_4 , ϵ_4/ϵ_2 , ϵ_2/ϵ_2 。基因频率分布因种族和地区的不同略有差异。ApoE的这种多态性是由于其肽链上第112位和158位氨基酸残基发生了置换。ApoE4在这两个位置上都是精氨酸 (Arg/CGC); E2都是半胱氨酸 (Cys/TGC); ApoE3则在112位为Cys、158位为Arg。研究发现, ϵ_4 与阿尔茨海默病(Alzheimer

收稿日期: 2010-09-16; 修回日期: 2010-12-09

基金项目: 北京市自然科学基金(7092097)

通讯作者: 叶 玲, Tel: 010-66876418, E-mail: lye301@yahoo.com.cn

disease, AD)、心脑血管疾病、动脉粥样硬化、脂代谢异常、糖尿病、代谢综合征,甚至人类寿命等密切相关^[1]。Schachter等^[2]曾报道百岁老人普遍携带 ϵ_2 等位基因。高龄老人携带 ϵ_2 数量是年轻人的2倍,携带 ϵ_4 等位基因则反之。由于ApoE遗传多态性的重要生物学作用,对其多态性分型的快速鉴定及方法学上的创新改进成为许多基础实验室关注的重点。本文介绍一种较为简便的多重扩增阻滞突变系统-PCR (multiplex amplification refractory mutation system PCR, multi-ARMS-PCR) 方法^[3],通过实验对比,对反应条件加以优化,并针对国内引用较多的文献^[4]中存在的问题加以探讨。

1 材料与方法

1.1 试剂

HotStart DNA 聚合酶、dNTPs、DL2000 为 TAKARA 生物技术公司产品,引物由 Invitrogen 公司合成,二甲亚砜(DMSO)为 Sigma 公司产品,琼脂糖为 Oxoid 公司产品。

1.2 仪器

Biometra T-gradient 基因扩增仪, Junyi 电泳仪, Liuyi 水平凝胶电泳槽, Tanon 公司 Gis1000 凝胶成像分析系统。

1.3 全血基因组 DNA 的提取

外周静脉血 2 ml, 枸橼酸钠抗凝, 用经典的蛋白酶K-酚/氯仿抽提法提取基因组DNA。DNA经乙醇沉淀纯化后, TE(pH 8.0)溶解。紫外分光光度计测定所提取DNA在 260 nm和 280 nm处的吸光度值, 计算其浓度和纯度。将DNA用水稀释至终浓度为 20 mg/L, -20℃保存备用。

1.4 引物设计

针对 ApoE 第 112 位和 158 位 Arg/Cys 氨基酸

残基的不同, 参照文献^[3]并加以改进, 我们分别设计序列 3'端与 Arg/Cys 密码子 CGC 和 TGC 对应的等位基因特异性上游引物 4 条及 1 条共用的下游引物 (表 1, P1~P4 和 P5)。使得引物与模板序列在 3'端互补时, PCR 扩增反应得以延伸。而当引物 3'端与模板 DNA 发生错配, 则扩增效率降低或扩增反应不能进行。利用这种扩增阻滞, 将 ApoE 在 2 个位点上的多态性区分开来。但引物 3'端单碱基的错配不能完全阻断非特异性扩增, 通常需要在 3'端倒数第 2 和(或)倒数第 3 位插入不匹配碱基来提高扩增的特异性(如 P3 和 P4 中的黑体小写 cg)。另外, 为了监控反应体系的有效性, 本研究设计一对引物 (P6 和 P7) 用以扩增定位于 19 号染色体短臂 19p13.2 的低密度脂蛋白受体 (LDLR) 外显子 18 片段, 作为内参照。

1.5 PCR 反应条件

每个样品分为 A, B 两个反应管, A 管用于扩增 Arg112/158, B 管用于扩增 Cys112/158。引物浓度 10 $\mu\text{mol/L}$, A 管含 P1 和 P3 各 1 μl ; B 管含 P2 和 P4 各 1 μl ; 两管都加入 2 μl P5, 1 μl P6 和 P7; 各管均加入模板 DNA 1 μl , 各管其余组分分别为 dNTPs 200 $\mu\text{mol/L}$, HotStart DNA 聚合酶 0.8 U, 10 $\times$ buffer (含 Mg^{2+} 1.5 mmol/L) 2.5 μl , DMSO 8%, 加双蒸水至 25 μl 。同时置 A 和 B 管于基因扩增仪上, 95℃预变性 5 min, 95℃变性 30 s, 62.5℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共 35 个循环, 终末 72℃延伸 5 min。

1.6 ApoE 基因型判定

PCR 结束后取 10 μl 反应产物与 2 μl 溴酚蓝上样缓冲液混匀, 加样于含 0.5 mg/L 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶, 80 V 电泳 50 min, 在紫外光下通过 Gis1000 凝胶成像系统记录电泳结果, 根据 A, B 管产物扩增的带型, 分析判定 ApoE 基因型。

表 1 ApoE 基因多态性分型 multi-ARMS-PCR 寡核苷酸引物

引物	序列*	等位基因位点	扩增片段大小 (bp)
112位上游引物P1	5'- CGCGGACATGGAGGACGTTC -3'	ϵ_4 (Arg112/CGC)	588
112位上游引物P2	5'- CGCGGACATGGAGGACGTTT -3'	ϵ_3 (Cys112/ TGC) ϵ_2 (Cys112/ TGC)	
158位上游引物P3	5'- ATGCCGATGACCTGCAGAcgC -3'	ϵ_3 (Arg158/CGC)	
158位上游引物P4	5'- ATGCCGATGACCTGCAGAcgT -3'	ϵ_4 (Arg158/CGC) ϵ_2 (Cys158/ TGC)	451
通用下标引物P5	5'- GTTCAGTGATTGTCGCTGGGCA -3'		
内参照上游引物P6	5'- GTGGCACCGAGACCAAACCTC -3'	LDLR外显子18	218
内参照下游引物P7	5'- AGTGCAAGGAGACACGGGA -3'		

注: *大写字母为 3'端等位基因的差异碱基, 小写字母是人为引入的错配碱基

2 结果

2.1 P3, P4 引物的改进

文献[3]中 Arg158 特异等位基因的引物序列为 5'-ATGCCGATGACCTGCAGAATC-3', Cys158 的引物序列为 5'-ATGCCGATGACCTGCAGAATT-3'。即引物 3'端倒数第 2 和第 3 位碱基未引入错配碱基。实验初期我们采用了上述引物, 但发现该引物竞争性不强, 扩增出的 451 bp 条带较弱, 易出现假阴性结果。为了提高扩增效率和特异性, 我们将该引物 3'端倒数第 2 和第 3 位碱基 AT 分别改成 cg(表 1), 人为引入碱基错配, 提高了引物的 T_m 值, 使之与反应体系中其他引物的 T_m 值相近, 从而获得清晰的 451 bp 条带(图 1)。

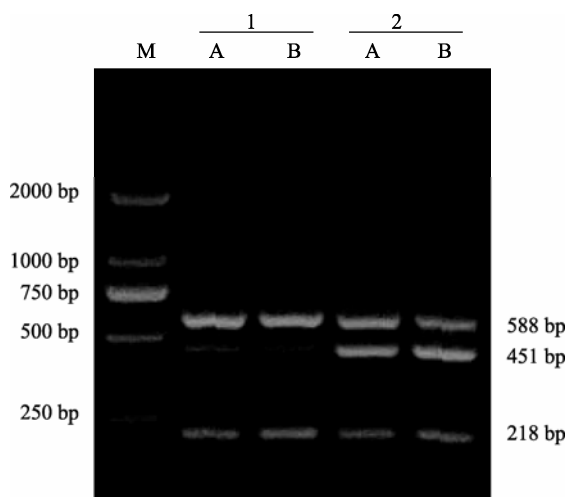


图 1 新旧 P3/ P4 引物扩增效率的比较 (ϵ_4/ϵ_2 基因型)
1: 旧 P3/ P4 引物; 2: 新 P3/P4 引物; M: DL-2000

2.2 内参引物 P6, P7 的改进

文献[3]中内参采用的是与位于第 14 号染色体的 α_1 -抗胰蛋白酶基因序列同源的寡核苷酸引物。文献[4]报道以低密度脂蛋白受体基因(LDLR)外显子 13 片段为内参设计一对引物, 序列分别是 5'-AACAACTGACCCCGCTGCG-3'(P6')和 5'-ATG GCGCTGAGGCCGCGCTC-3'(P7'), 扩增片段大小为 228 bp。但我们在 PCR 过程中采用上述 P6'/P7' 引物扩增的效果很不理想。经过序列比对, 发现该对引物并不与 LDLR 外显子 13 序列同源, 而是分别定位于 *ApoE* 多态性 Arg 112/Cys 112 和 Arg 158/Cys 158 的上下游。理论扩增片段大小应为 292 bp。由于在欲检测的 *ApoE* 多态性位点附近引入这样一对内参引物, 相当于除了 P6'/P7' 扩增产物外, 又额外增加了由 P6'/P5, P1(P2)/ P7', P3(P4)/ P7' 引物对形成的多重 PCR 产物的可能性, 使得 PCR 反应复杂化, 出

现多条非特异带(图 2 第 1, 3 泳道)。为了纠正该错误, 我们设计了以 LDLR 外显子 18 为内参的引物 P6/P7, 并获得非常清晰的 218 bp 片段(图 2 第 2, 4 泳道), 消除了非特异带对基因分型的干扰。

2.3 P1, P2 引物的纠正

文献[4]报道的 Cys/Arg 112 引物为 5'-CGCGG ACATGGACGTTTT-3'/5'-GCGGACATGGACGTTT C-3', 经过核对发现, 该引物缺失了 GGA, 多了一个 T, 如果按照该引物序列进行 PCR 反应, 是无法扩增出 558 bp 的 Cys/Arg 112 片段的(图 3)。采用本研究表 1 所列的 P1, P2 引物, 相同的标本在 A, B 管中检测出应有的 558 bp 特异等位基因条带。

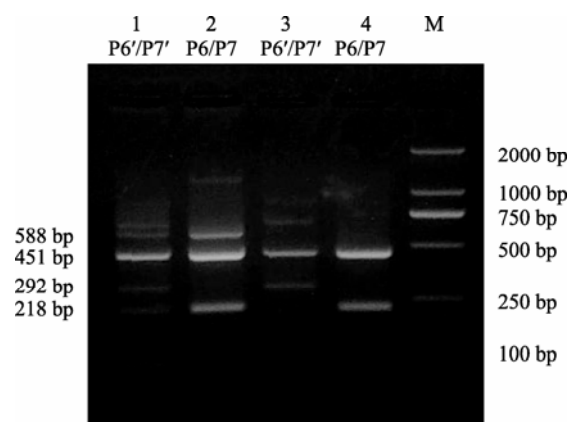


图 2 引物 P6/ P7 与 P6'/P7' PCR 扩增效果的比较
1, 2: 样本 157# (ϵ_4/ϵ_3) A 管 PCR 产物; 3, 4: 样本 237# (ϵ_3/ϵ_2) A 管 PCR 产物; 1, 3: 文献报道的内参引物 P6'/P7'; 2, 4: 本研究设计的内参引物 P6/P7。各反应管中均含 P1, P3 和 P5 引物。M: DL-2000

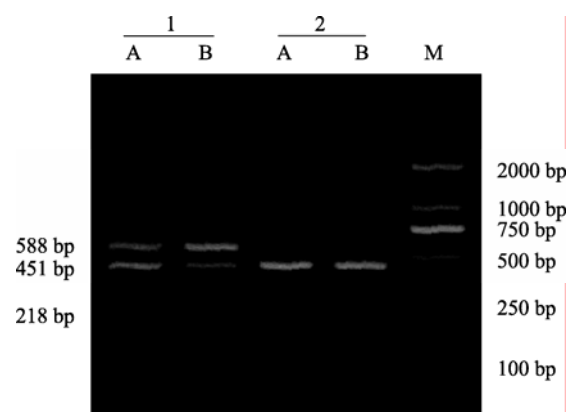


图 3 真伪 P1/ P2 引物扩增效果的比较 (ϵ_4/ϵ_2 基因型)
1: 正确的 P1/ P2 引物扩增产物; 2: 错误的 P1/ P2 引物扩增产物; M: DL-2000

2.4 *ApoE* 基因多态性分型

结合 A, B 两个反应管扩增产物的片段大小和条带数, 可鉴定 6 种基因型(表 2)。除了均具备 218 bp 大小的内参条带外, 纯合子均为 2 条带; 杂合子

ϵ_2/ϵ_3 、 ϵ_3/ϵ_4 均为 3 条带, ϵ_2/ϵ_4 基因型为 4 条带。图 4 为改进后的 P1~P7 引物(表 1)得到的 PCR 扩增产物电泳图谱。

采用 Multi-ARMS-PCR 方法得到的 *ApoE* 基因

多态性分型结果, 与 6 种基因型 PCR 产物的测序分析完全一致。图 5 是测序结果的部分截图, 绿、蓝、红、黑分别代表 DNA 中 A、C、T、G 四种碱基, 杂合型的等位基因峰显示为双峰。

表 2 *ApoE* 基因多态性带型分布

基因型	A 管片段大小(bp)		B 管片段大小(bp)		条带数
	Arg 112/CGC	Arg 158/CGC	Cys 112/TGC	Cys 158/TGC	
ϵ_2/ϵ_2			588	451	2
ϵ_3/ϵ_3		451	588		2
ϵ_4/ϵ_4	588	451			2
ϵ_3/ϵ_2		451	588	451	3
ϵ_3/ϵ_4	588	451	588		3
ϵ_4/ϵ_2	588	451	588	451	4
内参照		218		218	

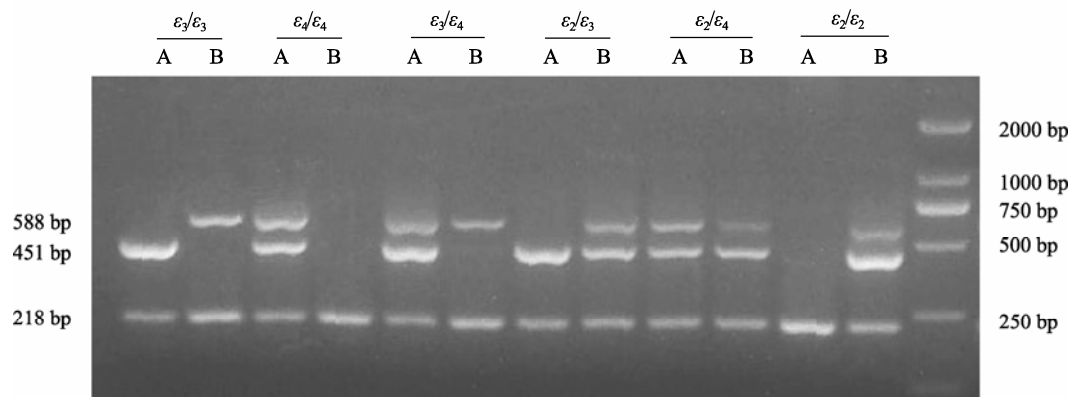


图 4 Multi-ARMS-PCR 方法 *ApoE* 基因多态性分型电泳图
A: Arg112/Arg158 ; B : Cys112/Cys158; M: DL-2000

图 5 部分基因型 PCR 产物测序图谱

A : Cys 112 TGC; B: Arg 158 CGC/Cys158 TGC; C: Cys 112 TGC/Arg 112 CGC; D: Arg 158 CGC

3 讨 论

DNA 测序固然是 *ApoE* 基因分型的最精确检测方法,一般需委托生物技术公司完成,成本相对较高。临床与基础实验室受设备的限制,大多采用聚合酶链式反应限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法进行 *ApoE* 基因多态性测定。该方法需经历 PCR 扩增、*HhaI* 限制性内切酶消化、聚丙烯酰胺凝胶电泳分离酶切产物、银染四个步骤。耗时、操作复杂、且存在酶切不完全或 DNA 降解的现象。Multi-ARMS-PCR 方法通过 A、B 双管的同步多重 PCR 反应和琼脂糖凝胶电泳-EB 染色,即可实现对 *ApoE* 基因型的判定,省去限制性内切酶消化、聚丙烯酰胺凝胶制备、银染的复杂步骤,大大节省了时间,降低了成本,提高了效率。

本研究通过在 P3、P4 引物中人为引入碱基错配,将 3' 端倒数第 2 和第 3 位碱基 AT 分别改成 cg, 提高了扩增效率和特异性,减少错配率。我们还自行设计了以 LDLR 外显子 18 为内参的引物 P6、P7,一方面消除了非特异带对基因分型的干扰,真正发挥了内参作用,另一方面纠正了有关文献报道的内参引物的错误^[5-8]。希望通过本文引起读者对这些关键性引物(也包括 P1、P2 引物)存在问题的认识,以免继续走弯路。

影响多重 PCR 结果的因素较多,如引物设计、引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶来源、反应混合物配比、温度及循环条件等。即使 PCR 参数相同,往往在不同型号的 PCR 仪、同型号的不同 PCR 仪或不同制造商的 PCR 仪上进行的扩增反应结果有明显差异。需要各实验室或研究者自行摸索出最佳的条件。我

们通过比较,发现退火温度对扩增效率及特异性的影响较大,将退火温度由 62.5℃ 提高到 63℃ 和 64℃,可以使少数因 DNA 模板质量不佳造成的基因分型判别困难标本的扩增特异性显著提高,但温度过高,扩增效率下降。需综合考虑,以得到最佳结果。

【参考文献】

- [1] Ang LS, Cruz RP, Hendel A, *et al.* Apolipoprotein E, an important player in longevity and age-related diseases[J]. *Exp Gerontol*, 2008, 43(7): 615-622.
- [2] Schachter F, Fauredelanef L, Guenot F, *et al.* Genetic associations with human longevity at the *ApoE* and *ACE* loci[J]. *Nat Genet*, 1994, 6(1): 29-32.
- [3] Donohoe GG, Salomaki A, Lehtimäki T, *et al.* Rapid identification of apolipoprotein E genotypes by multiplex amplification refractory mutation system PCR and capillary gel electrophoresis[J]. *Clin Chem*, 1999, 45(1): 143-145.
- [4] 郑 芳, 周 新, 叶光明, 等. *ApoE* 基因 multi-ARMS 快速分型法[J]. *基础医学与临床*, 2000, 20(6): 88-90.
- [5] 李冬梅, 王玉明, 刘 华, 等. 多重引物等位特异 PCR 法快速检测 *ApoE* 基因型的研究[J]. *昆明医学院学报*, 2008, 29 (1): 69-72.
- [6] 陈 薇, 胡汉宁, 杨 桂, 等. 高脂血症患者载脂蛋白 E 基因多态性与血脂水平分析[J]. *微循环学杂志*, 2007, 17(1): 38-40.
- [7] 汪春红, 周 新, 周光娣, 等. 冠心病易感基因载脂蛋白 E、低密度脂蛋白受体多态性与烟、酒的交互作用的研究[J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(7): 554-558.
- [8] 夏 勇, 周 新, 郑 芳, 等. 等位基因特异性多重聚合酶链反应技术对载脂蛋白 E 基因多态性检测的评价[J]. *中华检验医学杂志*, 2004, 27(7): 447-448.