

应用 CRS-RFLP 技术检测 *hOGG1c.326* 位点的单核苷酸多态性

张忠彬, 朱 人, 夏昭林

(复旦大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 上海 200032)

摘要: 目的 探讨创造酶切位点的限制性片段长度多态检测技术 (CRS-RFLP) 检测单核苷酸多态性的方法及其应用。方法 应用 CRS-RFLP 检测技术, 检测 *hOGG1c.326* 位点的单核苷酸多态性, 并与未引入错配位点时的限制性片段长度多态检测结果进行比较。结果 CRS-RFLP 的检测方法与未引入错配位点时的限制性片段长度多态的检测方法一致。结论 CRS-RFLP 检测技术适用于已知单核苷酸多态位点的检测, 具有较好的应用前景。

关键词: 限制性片段长度多态; 创造酶切位点; 单核苷酸多态性

中图分类号: R394 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2004)05-0293-04

Genotype identifying of *hOGG1c.326* with method of CRS-RFLP

ZHANG Zhong-bin, ZHU Ren, XIA Zhao-lin

(Department of Occupational Health, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: **Objective** To explore strategy for identifying single nucleotide polymorphism with technique of introducing mismatched bases to create restriction site combined with restriction fragment length polymorphism (CRS-RFLP) and its applying. **Method** With method of CRS-RFLP, the genotype of *hOGG1c.326* was identified, and the results were compared with these of RFLP not introducing mismatched bases in primer. **Result** The results were easily recognized and consistent with these of not introducing mismatched bases in the primer. **Conclusion** It suggested that this method is good for identifying found single nucleotide polymorphism extensively existing in sequence of genes.

Key words: Restriction fragment length polymorphism; Created restriction site; Single nucleotide polymorphism

人类疾病的发生是遗传因素和环境因素共同作用的结果, 影响个体遗传易感性的基因多态性与疾病的发生、发展和预后有着密切的关系, 阐明这些多态性与疾病的关系, 对探讨疾病的发病机制, 筛检易感人群等都具有重要意义^[1]。随着人类基因组测序的完成, 以及美国和环境基因组计划 (environmental genomic project, EGP) 的先后启动, 如何有效检测广泛存在于基因序列上的突变位点尤其是作为第三代遗传标记的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 也成为新的研究热点。限制性片段长度多态 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 检测技术具有操作简单、特异性高、重复性好等优点, 而且可以直接确定突变的部位和性质, 特别适用于一些小样本已知突变位点的检测^[2]。但是, 并不是所有突变位点都与其邻近碱基构成酶切序列, 而内切酶价格的过于昂贵也会大大增加其检测成本, RFLP 的应用因此受到一些限制。此时, 可以应用引入错配

碱基创造酶切位点的限制性片段长度多态 (created restriction site-RFLP, CRS-RFLP) 的检测方法对已知突变位点进行检测。应用 CRS-RFLP 和 RFLP 检测方法, 本研究检测了与慢性苯中毒发生关系密切的 *hOGG1* 基因 *c.326* 位点的多态, 并对 CRS-RFLP 应用时的一些问题进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 研究对象

为来自上海、杭州、马鞍山和广州的接触苯而未发生中毒的工人 152 名, 其中男性 57 名, 女性 95 名。经同意采集研究对象的外周血 3 ml, 酚-氯仿抽提法提取 DNA。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 试剂 2×PCR mix (MBI 公司), 限制性内切酶 *MspI* (MBI 公司)、*Fnu4HI* (NEB 公司), 琼脂糖 (BBI 公司), 引物由 Sangon 合成。

1.2.2 仪器 9600 型 PCR 仪 (PE 公司), 微型电泳槽 (Pharmacia Biotech, EPS1000), Gel Doc 2000 凝胶成像仪 (Bio-RAD 公司)。

1.3 方法

收稿日期: 2004-04-23; 修回日期: 2004-07-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30271113)

作者简介: 张忠彬 (1976-), 男, 山东泰安人, 博士研究生。

CRS 是根据引物碱基错配技术设计的检测单碱基突变的方法。其原理是根据单碱基突变位点的碱基替代情况设计引物, 其中一条引物根据突变位点邻近序列设计, 人为引入错配碱基, 使得引物 3' 端和单碱基突变的一种突变型在 PCR 扩增后形成一个酶切位点, 然后应用相应的内切酶进行酶切鉴定^[3]。

1.4 序列查找及引物设计

在 NCBI 网站查找 *hOGGI* 的基因序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>), 根据 SNP 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Snps>) 确定

c.326 位点发生 C→G 突变的碱基, 利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计引入和未引入错配碱基的引物并确定创造的酶切位点。

1.5 PCR 扩增及酶切鉴定

取 50 ng 的基因组 DNA, 每个引物 0.2 μmol/L, 1 × PCR mix, ddH₂O 组成 25 μl 反应体系。PCR 反应及酶切电泳条件见表 1。PCR 扩增后, 分别取 PCR 产物, 加入 8 U 内切酶和 1 μl 10× 酶切缓冲液组成 10 μl 反应体系, 37 °C 水浴中酶切 16 h, 电泳后于凝胶成像仪紫外灯下观察成像。

2 结果

表 1 引物及扩增、酶切条件

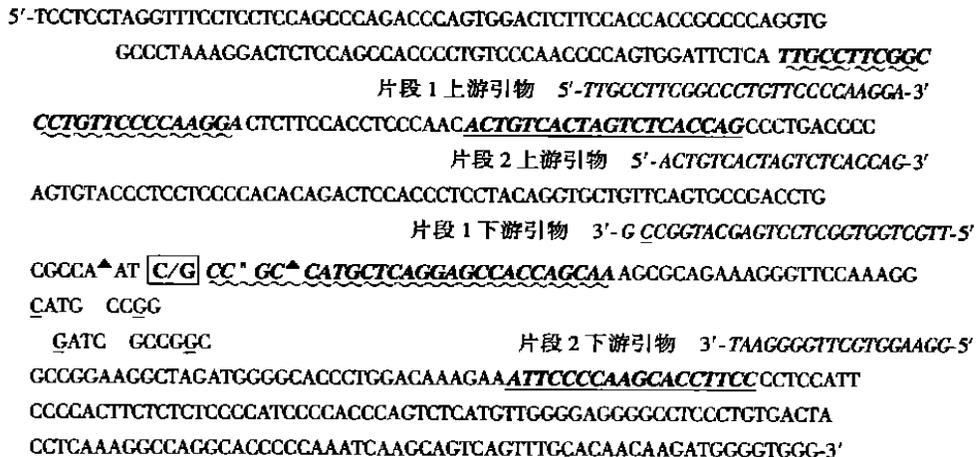
	片段 1 (引入错配位点)	片段 2 (未引入错配位点)
引物 F:	5'-TIGCTTTCGGCCCTGTTCCTCCCAAGGA-3'	5'-ACTGTCACTAGTCTCACCAG-3'
R:	5'-TIGCTGGTGGCTCTGAGCATGGCC*G-3'	5'-GGAAGGTGCTTGGGAAT-3'
PCR 条件	94 °C 5 min → 94 °C 40 s 65 5 °C 40 s 72 °C 35 s, 35 cycles → 72 °C 延伸 10 min	94 °C 5 min → 94 °C 40 s 55 °C 40 s 72 °C 35 s, 35 cycles → 72 °C 延伸 10 min
片段大小	168 bp	200 bp
内切酶	MspI	Fnu 4 HI
酶切条件	37 °C, 16 h	37 °C, 16 h
电泳条件	3% 琼脂糖, 100 V, 1 h	2% 琼脂糖, 100 V, 40 min

注: 下画线碱基为引入的错配碱基, 以在目的片段中创造一酶切位点。

2.1 引物设计

查找 NCBI 的 SNP 数据库, 获取含 *hOGGI c.326* 突变位点的基因序列。*hOGGI* 基因 *c.326* 位点 C→G 的突变使编码氨基酸由 Ser 替换为 Cys。突变后形成的碱基 G 与邻近碱基构成 Fnu 4 HI 能识别的酶切序列 (G CNGC), 应用引物设计软件得到片段 2 的引物。根据突变碱基邻近序列的情况 (CCAAT C/G CCGC), 引入错配碱基以使其与邻近碱基构成可以酶切的序列。在突变位点前的第三个碱基 A 分别用

碱基 C 或 G 替换, 则使原来的 A-T 配对分别形成 C-T 或 G-T 的错配, 此时, 则可分别使用 Nla III (CATG) 或 Bsp143 I (Mbo I; GATC) 对扩增产物进行酶切。相类似的, 用碱基 G 替换突变位点后第二或第四个碱基 C 后设计相应的引物, 则可使原来 C-G 配对形成 C-C 错配, 此时, 可以分别使用 MspI (CCGG) 或 TspI (GCCGGC) 对扩增产物进行酶切, 见图 1。根据内切酶的价格及能否设计出合适的引物等情况, 我们选择引入 MspI 酶切位点的引物。

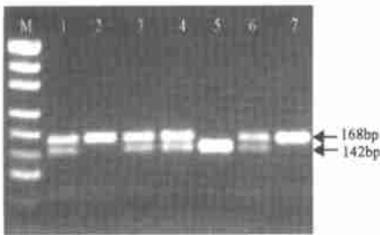


注: C/G——突变碱基, C→G; C——引入的错配碱基; [▲]——以该碱基位点为错配位点; ^{*}——本次研究中引入错配碱基的位点

图 1 引入错配碱基创造酶切位点示意图

2.2 *hOGG1 c. 326* 基因型的判断

片段 1 经 *MspI* 酶切后可出现 168 bp、142 bp 和 26 bp 3 个片段 (26 bp 片段过小而不能分辨), 其中, 野生纯合型 (*Ser/Ser; CC*) 为 142 bp 和 26 bp 2 个片段; 突变纯合型 (*Cys/Cys; GG*) 为 168 bp 1 个片段; 杂合型 (*Ser/Cys; CG*) 为 168 bp、142 bp 和 26 bp 3 个片段 (见图 2)。片段 2 经 *Fnu4HI* 酶切后可出现 200 bp 和 100 bp 2 个片段, 其中, 野生纯合型 (*Ser/Ser; CC*) 为 200 bp 1 个片段; 突变纯合型 (*Cys/Cys; GG*) 为 100 bp 1 个片段; 杂合型 (*Ser/Cys; CG*) 为 200 bp 和 100 bp 2 个片段 (见图 3)。可以看出, 2 条片段经不同的内切酶酶切以后, 都可以进行基因型的判定, 而且结果一致, 说明引入错配碱基创造酶切位点的 RFLP 方法可以有效检测基因的单碱基突变。



M: Puc 19 DNA/*MspI* Marker; 1, 3, 4, 6 为 *Ser/Ser* 基因型; 2, 7 为 *Cys/Cys* 基因型; 5 为 *Ser/Cys* 基因型; 下同。

图 2 *MspI* 酶切后的琼脂糖凝胶电泳图像

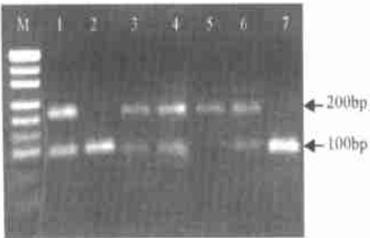


图 3 *Fnu4HI* 酶切后的琼脂糖凝胶电泳图像

2.3 *hOGG1 c. 326* 基因型的分布情况

hOGG1 c. 326 各基因型的分布情况见表 2, 经检验 $P > 0.50$, 说明该基因型的分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡规律。

表 2 *hOGG1 c. 326* 基因型的分布情况及 Hardy-Weinberg 遗传平衡吻合度检验

基因型	实际分布 频数(人)	实际分布 频率(%)	理论分布 频率(%)	$\sum \chi^2$ 值	<i>P</i> 值
<i>CC (Ser/Ser)</i>	18	13.24	12.71	0.05	> 0.50
<i>CG (Ser/Cys)</i>	61	44.85	45.89		
<i>GG (Cys/Cys)</i>	57	41.91	41.40		
<i>C</i>	97	35.66			
<i>G</i>	175	64.34			

注: 由于在 PCR 扩增过程中有些样本失败, 导致扩增出样本数 (136) 小于样本总数 (152)。

3 讨论

近年来, 人们发展了许多用于检测基因多态性的方法, 较常见的有单链构象多态技术 (SSCG)、直接测序技术、变性-高压液相色谱 (DHPLC)、动态等位基因特异杂交技术 (DASH)、TaqMan 技术和基因芯片技术等^[4-6], 其中很多方法在进行高通量检测方面有着非常明显的优势。但由于仪器昂贵, 要求有相应的技术平台支持, 检测成本相对也较高, 并不适用于小样本已知位点的突变检测, 由 Kan 和 Dozy 于 1978 年创建的 RFLP 方法还有其实际应用意义。

RFLP 方法是应用特定的内切酶, 识别并切割包含突变位点的序列, 根据切割后片段大小的差异来判断待检测位点的突变情况。但是, 有时突变位点的碱基并不能与其邻近碱基构成酶切序列, 通过设计相应的包含错配碱基的引物, 就可以在 PCR 扩增后进行基因多态的检测。在引物设计和扩增电泳时, 应当注意以下问题: (1) 引物的长度, 一般 PCR 反应的引物在 15 ~ 30 bp 之间, 但应用该方法时, 在保证引物质量的前提下, 可以尽量设计长一些的引物, 这样 PCR 产物酶切电泳后的分离效果要好一些, 因而也易于判断。(2) 目的片段的长度, PCR 产物酶切后产生的 2 个相邻长片段相差仅 20 左右个碱基, 为使酶切产物能进行有效地电泳分离, 一般以目的片段为 100 bp 左右不超过 200 bp 为宜。(3) 引物的选择, 有时突变位点前后几个碱基都可以作为错配位点来创造酶切序列, 因此在设计引物时就存在多种选择情况, 此时, 要根据引物序列的评分、碱基的错配以及内切酶的价格和是否方便购买等情况综合判断。有研究认为, PCR 扩增效率因引入碱基的错配类型而不同, 依次为 C-G > T-G > G-G > A-G^[7], 在引物 3' 端序列与模板出现 G-A、A-G 和 C-C 的碱基错配情况时对 PCR 的扩增效率有显著的影响, 甚至会影响到引物的延伸^[8,9]; 本次研究中虽然也为 C-C 的碱基错配, 但仍然顺利扩增出了目的片段, 国外研究中也有类似情况^[10], 因此是否要一定避开这些碱基错配情况需要结合具体情况来定。(4) 引入的错配碱基的个数, 这方面研究报道还较少, 但是当 3' 端的错配碱基数目增加时, 将严重影响到 PCR 的扩增效率甚至中止引物的延伸, 因此应避免过多引入错配碱基。(5) 扩增和电泳, 由于设计引物时引入错配碱基的引物序列相对固定, 可选择的引物较少, 目的片段扩增时杂带的产生有时不可避免, 此时可以通过升高退火温度或者调整 PCR 反应体系来提高扩增的特异性。在电泳鉴定

时, 由于目的片段酶切后相邻片段大小相差较少, 为达到较好的检测效果, 一方面可以增加常用的琼脂糖凝胶的浓度 (3.0% ~ 3.5%) 和电泳时间, 另一方面也可以选择高分辨率的凝胶 (如聚丙烯酰胺) 进行电泳。

本次研究结果表明, CRS-RFLP 是检测基因 SNP 的一种简便易行的有效方法, 国外最早曾应用该方法进行 Kirsten 鼠癌基因的突变检测^[1], 以后又用于苯丙酮尿症及地中海贫血等疾病的基因突变检测。该方法大大拓宽了 RFLP 的适用范围, 在实际应用中具有很大的灵活性, 同时又很好地保持了 RFLP 方法的一些优点, 具有较好的应用前景, 特别适合于基层单位开展已知位点 SNP 的检测。应用高通量检测技术对已知位点的 SNP 进行检测时, 如果样本量过少 (检测成本将增加), 也可以考虑应用该方法。随着人们对疾病认识的不断深入, 对发病群体和易感人群进行基因多态性的检测也日益广泛。在公共卫生领域, 通过检测相关基因如毒物代谢酶基因、DNA 损伤修复基因以及细胞周期调控基因、免疫因子基因等的多态性, 一方面可以深入研究有关环境暴露因素所致疾病的具体发病机制, 另一方面也可筛检易感人群来开展有效的健康监护工作。而对其他一些与遗传关系密切的疾病, 如果能明确基因突变的具体情况, 则也可应用该方法进行疾病的检测及辅助诊断工作。在开展这些工作的基层单位, 一些高通量的现代检测技术由于仪器以及检测成本昂贵, 需要相应的技术平台支持等原因还较少推广应用, 此时, 仅需要 PCR 扩增仪、电泳仪和成像仪等设备就可开展工作的 RFLP 技术仍然具有较强的实际应用意义, 利用 CRS-RFLP 技术进

行已知位点 SNP 检测方法的应用, 无疑将对基层的疾病预防控制工作产生良好的促进作用。

参考文献:

- [1] 张志彬, 夏昭林. 基因多态性与化学物致病风险 [J]. 卫生研究, 2003, 32 (4): 402-405.
- [2] 杨卫华, 李稻. 扩增基础上的已知点突变的检测 [J]. 国外医学分子生物学分册, 2002, 24 (2): 121-125.
- [3] 赵春江, 李宁, 邓雪梅. 应用创造酶切位点法检测单碱基突变 [J]. 遗传, 2003, 25 (3): 327-329.
- [4] Liu W, Smith DI, Reetzige KJ, et al. Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations [J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26 (6): 1396-1400.
- [5] Howell WM, Jobs M, Gyllensten U, et al. Dynamic allele-specific hybridization. A new method for scoring single nucleotide polymorphisms [J]. Nat Biotechnol, 1999, 17 (1): 87-88.
- [6] Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay [J]. Genet Anal, 1999, 14 (5-6): 143-149.
- [7] Nassal M, Rieger A. PCR-based site-directed mutagenesis using primers with mismatched 3'-ends [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18 (10): 3077-3078.
- [8] Kwok S, Kellogg DE, McKinney N, et al. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18 (4): 999-1005.
- [9] Lien S, Alestrom P, Klungland H, et al. Detection of multiple beta-casein (CASB) alleles by amplification created restriction sites (ACRS) [J]. Anim Genet, 1992, 23 (4): 333-338.
- [10] Matullo G, Palli D, Peluso M, et al. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects [J]. Carcinogenesis, 2001, 22 (9): 1437-1445.
- [11] Haliassos A, Chomel JC, Tesson L, et al. Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17 (9): 3606.
- [12] Sweeney G, Nazar-Stewart V, Stapleton PL, et al. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and survival among lung cancer patients [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003, 12 (6): 527-533.
- [13] Gilliland FD, Li YF, Saxon A, Diaz-Sanchez D. Effect of glutathione S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: randomised, placebo-controlled crossover study [J]. Lancet, 2004, 363(9403): 119-125.
- [14] Nazar-Stewart V, Vaughan TL, Stapleton P, et al. A population-based study of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 genotypes and risk for lung cancer [J]. Lung Cancer, 2003, 40(3): 247-258.
- [15] Hung RJ, Boffetta P, Brockmoller J, et al. CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis [J]. Carcinogenesis, 2003, 24(5): 875-882.
- [16] Choi SC, Yun KJ, Kim TH, et al. Prognostic potential of glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes for gastric cancer progression [J]. Cancer Lett, 2003, 10, 195(2): 169-175.
- [17] Chen C, Nirunskun W. Decreased expression of glutathione S-transferase M1 in HPV16-transfected human cervical keratinocytes in culture [J]. Carcinogenesis, 1999, 20(4): 699-703.
- [18] Sundberg K, Dreib K, Seidel A, et al. Glutathione conjugation and DNA adduct formation of dibenz[*a,h*] pyrene and berz[*a,h*] pyrene diol epoxides in V79 cells stably expressing different human glutathione transferases [J]. Chem Res Toxicol, 2002, 15(2): 170-179.
- [19] Geroni C, Marchini S, Cozzi P, et al. Brostallicin, a novel anticancer agent whose activity is enhanced upon binding to glutathione [J]. Cancer Res, 2002, 15, 62(8): 2332-2336.

(上接第 292 页)