

TaqMan-MGB 探针检测 GSTP1 外显子 5 SNP 可行性研究*

张薇 单可人 吴昌学 李毅 肖雁 赵艳

齐晓岚 谢渊 何燕 官志忠 任锡麟

(贵州省分子生物学重点实验室 贵阳 550004)

摘要 目的: 评估 TaqMan-MGB 探针基因分型方法检测已知 SNP 的可行性, 并与传统的 PCR-RFLP 方法比较。**方法:** 高通量的 TaqMan-MGB 探针基因分型方法已被用来检测单核苷酸多态性(SNP)。在 321 例样本中, 同时用 TaqMan-MGB 探针基因分型方法和 PCR-RFLP 方法检测 GSTP1 外显子 5 SNP。**结果:** 2 种方法所得结果完全一致。野生型(AA)226 例(70.4%), 杂合子(AG)92 例(28.7%), 纯合突变型 3 例(0.9%)。**结论:** TaqMan-MGB 探针基因分型方法是一种能快速、高度特异性、高度自动化检测 SNP 的方法, 可用于大规模的基因分型。

关键词: TaqMan-MGB 探针; 单核苷酸多态性; GSTP1 基因; PCR-RFLP 方法

中图分类号: R394 **文献标识码:** B

Feasibility Study of TaqMan-MGB Probes in Detection of Genotyping of GSTP1 Exon 5 SNP

ZHANG Wei, SHAN Ke-ren, WU Chang-xue, et al

(The Key Lab of Molecular Biology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate TaqMan-MGB Probes genotyping method feasibility in detecting a well-known SNP, compared with PCR-RFLP. **Methods:** A high-throughput genotyping method has been developed to detect single-nucleotide polymorphisms (SNP). In 321 specimens, GSTP1 exon 5 SNP was analyzed by TaqMan-MGB probes genotyping and PCR-RFLP method. **Results:** The results of the two methods were completely identical: 226 (70.4%) of homozygous wild-type (AA), 92 (28.7%), heterozygote (AG) and 3 (0.9%) homozygous mutant (GG). **Conclusion:** Genotyping method of TaqMan-MGB Probes is a rapid method, with high specificity, to highly automatically detect SNP, which can be applied to the large-scale genotyping.

Key words: TaqMan-MGB Probes; SNP; GSTP1; PCR-RFLP

前言

单核苷酸多态性(SNP)与多种疾病密切相关。虽然测序方法可直接检测单核苷酸多态性, 但在临床诊断和人类学研究中, 需要更简单、快速和高度自动化的方法。与传统的聚合酶链反应及限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法相比, TaqMan-MGB 探针基因分型方法具有更准确、简单、快速、安全的优点。同时, 这一方法所具有高通量的特点, 可适用于大规模的 SNP 筛查。

TaqMan-MGB 探针基因分型方法利用 Taq DNA 聚合酶 5' → 3' 核酸外切酶的活性将荧光探针切断, 使探针的能量传递结构被破坏从而发出荧光来进行基因分型。在该方法中, 扩增子分别与 2 种不同的特异性荧光探针结合, 通过探针发出的特异性荧光颜色来分辨不同的等位基因。TaqMan 探针为一单链寡核苷酸, 两端分别结合一个报告荧光基团(5'端)和一个淬灭荧光基团(3'end)。探针完整时, 报告基团发出的荧光信号被淬灭基团吸收。当探针被酶切降解时, 报告荧光基团(FAM)和淬灭荧光基团分离, 荧光能量传递终止, 报告基团发出的荧光信号可被荧光监测系统接收^[1]。目前, 已出现新一代的 TaqMan-MGB 探针, 该探针的 3'端结合了 MGB (Minor Groove

binder)。MGB 与 DNA 螺旋的小沟(Minor Groove)契合, 通过稳定 DNA 双螺旋结构来提高杂交的准确性和稳定性。这可使探针进一步缩短(不少于 13 个碱基), 使 Tm 值显著提高, 增加了探针的杂交稳定性, 使结果更准确。而且该探针结合的为非荧光淬灭基团(NFQ), 这可大大降低荧光本底, 提高反应的灵敏性。在 PCR 过程中, 探针与正反向引物之间的靶位点区域特异性退火结合, 当新合成链延伸到探针结合位点时, Taq 酶发挥其 5' → 3' 外切酶活性, 将探针酶切降解, 使报告荧光基团和淬灭基团分离(图 1)。从而荧光监测系统可接收到荧光信号。

GSTP1 基因编码谷胱甘肽 S- 转移酶 GST- pi, 位于 11q13.2, 外显子 5 上单核苷酸位点 A → G, 导致氨基酸 105 位的异亮氨酸(Ile)变异为缬氨酸(Val)。这一多态性位点会影响酶的活性, 并与多种癌症的遗传易感性相关^[2,3], 与化疗中药物抗性和药物不良反应相关^[4], 与某些疾病的预后相关^[5]。

1 材料和方法

1.1 研究对象

贵州省少数民族隔离自然人群 321 例。在采样现场, 根据“知情同意”的原则采集外周血。

* 基金项目: 本课题为贵州省科技厅计划基金黔科合(2004)JN055 资助, No.2004JN055

作者简介: 张薇(1979-), 女, 民族, 汉族, 河北人, 硕士,

研究方向: 分子生物学 E-mail: jiesuifanny@yahoo.com.cn

通讯作者: 单可人, E-mail: hikerencn@yahoo.com.cn

(收稿日期: 2006-08-10 接受日期: 2006-09-06)

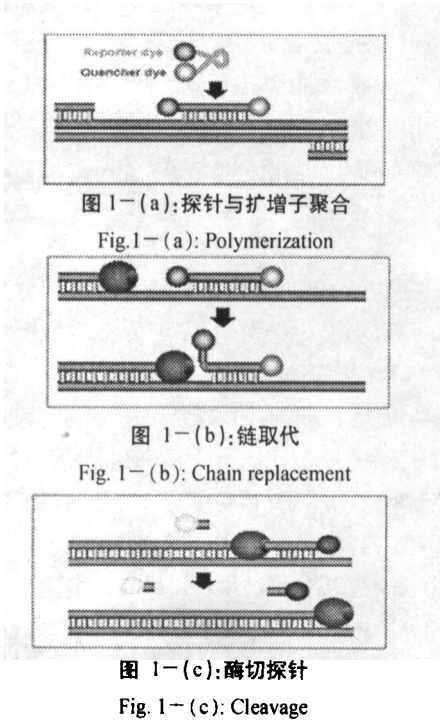


图 1: TaqMan-MGB 探针基因分型方法的 PCR 过程

Fig. 1: The PCR of TaqMan-MGB Probes genotyping method

* 注:(a)探针和引物与扩增子退火结合;(b)新链延伸,聚合酶接触到探针,新链开始取代探针;(c)聚合酶酶切探针,报告荧光基团和淬灭基团分离。

1.2 DNA 提取

经典的酚 / 氯仿抽提法提取 DNA^[6], 稀释成约 100ng/ μ L 的应用液。

1.3 主要研究仪器和试剂

5700 Sequence Detector spectrofluorometric thermal cycler (美国应用生物系统公司)

TaqMan Universal PCR Master Mix 试剂盒(美国应用生物系统公司),TaqMan-MGB 探针及引物(上海基康公司合成)。

1.4 TaqMan-MGB 探针基因分型方法

1.4.1 TaqMan-MGB 探针及引物的设计和合成

TaqMan-MGB 探针的设计需遵循以下要求:①用 VIC 或 FAM 荧光染料标记探针,长度在 15-25 个碱基;②避免单核苷酸序列的连续重复,特别是 G;③探针 5' 末端不能是 G,因为单独和报告荧光基团相连的 G 也会淬灭荧光;④退火温度 T_m 为 65~67℃;⑤要求待检测的 SNP 位点位于探针 2/3 处,并尽量靠近 5' 端。

引物的设计要求如下:①GC 碱基含量在 20~80%;②上下游引物的位置应尽可能靠近探针,但引物与探针片段不能重叠;扩增片段通常在 75-150bp;③避免单核苷酸序列的连续重复,特别是 G;④ T_m 为 58~60℃;⑤引物 3' 端的 5 个单核苷酸中不可以有超过 2 个 G 和 / 或 C。

表 1 TaqMan-MGB 探针及引物序列

Table 1 TaqMan-MGB probe and PCR primer sequences

野生型探针	FATGAGGGAGAT*GTATTGTP
突变型探针	FAGTGAGGGAGAC*GTATTP
上游引物	CCTGGTGGACATGGTGAATG
上游引物	CAACCCTGGTGCAATGCT

* 注:F 代表 FAM 荧光标记,P 代表 MGB 基团,* 为多态性位点。
Notes: F represents FAM fluorophor,P,MGB;*, multimorphological locus.

TaqMan-MGB 探针及引物用 Primer Express® software (ABI)自行设计。其序列见表 1。

1.4.2 Real-time PCR

同一样本平行做两份,一份加入野生型探针,一份加入突变型探针,两份使用共同的引物。每轮 PCR 反应均需带阳性对照。25 μ L 总反应体积中包含 500 nM 野生型探针或突变型探针,各 900 nM 引物,100ng 基因组 DNA,12.5 μ L 2 $\times$ TaqMan? Universal PCR Master Mix。

Real-time PCR 循环条件:50℃ 2min;95℃ 10min,95℃ 15s,62℃ 1min,共 40 个循环。PCR 扩增在 5700 Sequence Detector spectrofluorometric thermal cycler 上完成。

1.4.3 数据分析

Real-time PCR 中获得的数据用 GeneAmp5700 SDS (ABI) 软件分析。

1.5 PCR-RFLP 方法

采用 PCR 扩增 GSTP1 基因有关片段,然后对扩增产物进行限制性片段长度多态性分析。用 PRIMER5 设计引物,其序列如下:上游引物 5' -TTCCACGCACATCCTCTTC -3',下游引物 5' -AGAACTGGCGACAAATCC -3'。引物由上海生工合成,扩增产物 565bp。

PCR 反应体系总体积 25 μ L,包括:10 mmol/L Tris-HCl (pH8.3),50 mmol/L KCl,1.5mmol/L MgCl₂,200 mmol/L dNTPs,0.1 μ mol/L 引物,100ng 模板 DNA 和 1.5 单位的 Taq DNA 聚合酶(北京华美生物工程公司)。

PCR 循环条件:预变性 95℃ 5min;95℃ 变性 40s,59℃ 退火 45s,72℃ 延伸 1.5min,共 30 个循环;终末延伸 72℃ 7min。扩增产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

扩增产物经限制性核酸内切酶 Alw26I 消化,消化反应条件为 37℃ 水浴 16 小时,消化产物用 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、银染鉴定^[7]。野生型 AA 见 465bp 和 100bp 两条带,杂合子 AG 见 465bp、248bp、217bp 和 100bp 四条带,纯合突变型 GG 见 248bp、217bp 和 100bp 三条带。

2 结果

2.1 TaqMan-MGB 探针基因分型结果

Real-time PCR 中获得的荧光信号数据可转化为反应曲线。每一个样本可得到 2 条反应曲线,一条是野生型探针的,另一条是突变型探针的。野生型、杂合子和纯合突变型样本的反应曲线见图 2。野生型样本的反应曲线表现为野生型探针产生的荧光信号增高,而突变型探针无荧光信号或仅有很低的荧光。杂合子样本的反应曲线表现为野生型探针和突变型探针产生的荧光信号均增高。纯合突变型样本的反应曲线表现为突变型探针产生的荧光信号增高,而野生型探针无荧光信号或仅有很低的荧光。

但仅将反应曲线作为基因分型的唯一判断标准是不够充分的,还需分析其 PCR 反应终点的荧光信号值。Rn (normalized reporter) 是标准报告数,反映在 PCR 过程中所检测到的荧光信号水平。设 RnA 代表反应终点时野生型探针的荧光信号

值,RnG 代表反应终点时突变型探针的荧光信号值。每一个样本的 RnA /RnG 比值均可确定。高 Rn A / 低 Rn G (>1.383)说明样本为野生型 AA, 高 Rn A / 高 Rn G 说明样本为杂合子 AG (0.83-1.21), 低 Rn A / 高 Rn G (0-0.71)说明样本为纯合突变型 GG。统计学中将实验观测值的 99% 参考值范围作为其质量控制值(mean±3S), 此处用阳性对照的 Rn A / Rn G 比值的质量控制值 (mean±3S) 来区分三者。共完成 321 例样本的 TaqMan-MGB 探针基因分型, 结果见表 2。

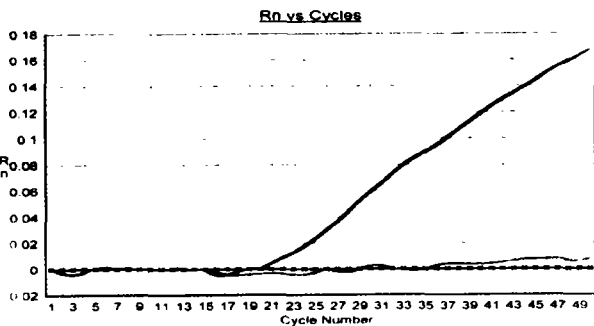


图 2-(a)野生型
Fig.2-(a)Homozygous wild type

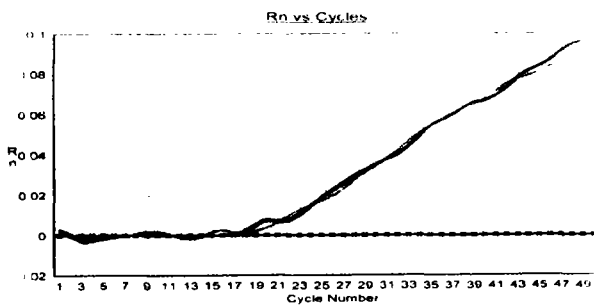


图 2-(b)杂合子
Fig.2-(b)Heterozygote

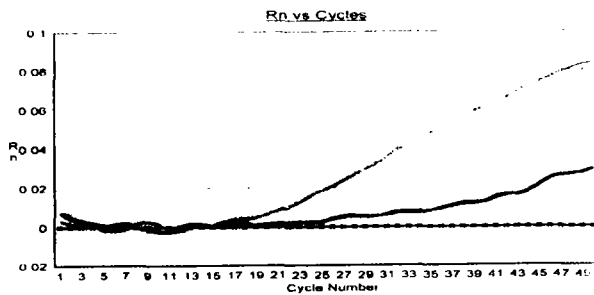


图 2-(c)纯合突变型
Fig.2-(c)Homozygous Mutant
图 2: TaqMan-MGB 探针基因分型结果反应曲线

Fig. 2: Results of genotyping with TaqMan-MGB probes.

* 注:野生型探针产生的荧光信号为红色,突变型探针产生的荧光信号为绿色。

表 2 TaqMan-MGB 探针基因分型结果

Table 2	TaqMan-MGB genotyping results for GSTP1		
	野生型	杂合子	纯合突变型
mean±3S	1.79±0.41	1.02±0.19	0.30±0.41
Rn A	0.12~0.25	0.06~0.16	0.01~0.04
Rn G	0~0.07	0.07~0.16	0.06~0.09
N	226	92	3

2.2 PCR-RFLP 方法基因分型结果

已用 TaqMan-MGB 基因分型方法检测的 321 例样本和阳性对照, 均用 PCR-RFLP 方法再次进行分析。该方法基因分型结果与 TaqMan-MGB 基因分型结果完全一致。

3 讨论

本研究成功完成用 TaqMan-MGB 探针基因分型方法分析 GSTP1 基因外显子 5 SNP(A→G)。与传统方法相比, 它不需要电泳分离 PCR 产物、Southern 印迹和放射性标记探针, 避免了放射性污染, 缩短了工作时间, 减少了劳动强度。而且该方法从 PCR 扩增开始直到分析完成, 自始至终在封闭的管内进行, 在计算机控制下完成, 因此避免了交叉污染和假阳性结果的出现, 具有更准确、简单、快速、安全的优点。本研究中 TaqMan-MGB 探针基因分型结果均用经典的 PCR-RFLP 方法验证, 其结果完全相符。同时, 这一方法所具有高通量的特点, 可适用于大规模的 SNP 筛查。

TaqMan-MGB 探针基因分型方法需注意以下几点: (1) 探针及引物的设计、合成质量和反应浓度; (2) 非特异性扩增的影响; (3) 模板质量。一般建议的引物终浓度为 900nM, 探针终浓度为 200nM, 认为此时 PCR 的扩增效率和敏感性最佳。在具体实验中, 引物终浓度可在 50~900nM 之间选择, 直至达到满意效果。探针终浓度应以 200nM 为基础, 适度增加。若出现非特异性扩增, 可通过提高退火温度、增加 PCR 循环数、调整 Mg²⁺ 浓度的方法来消除。建议退火温度一般为 60℃, 提高退火温度 1-2℃, 可明显减低其非特异性扩增。适当增加 PCR 循环数可以提高反应的敏感性, 减低其非特异性扩增。但并非循环数增加越多, 敏感性就越高。实际上, 循环数增加到某一值时敏感性就不再升高。所以 PCR 循环数一般要根据经验来确定。Mg²⁺ 浓度过高会增加引物二聚体的形成, 并且 Mg²⁺ 浓度是影响 Taq 酶活性的关键因素, 所以选择合适的 Mg²⁺ 浓度可以减低非特异性扩增, 提高实验的敏感性。模板最好选用纯化的模板, 基因组 DNA 的模板浓度在 100ng~1000ng 之间选择。

本研究发现贵州少数民族隔离自然人群的 GSTP1 基因型频率为: 野生型 (AA)226/321 (70.4%), 杂合子 (AG)92/321 (28.7%), 纯合突变型 (GG)3/321 (0.9%)。这之前报道的中国人人群 GSTP1 基因型频率分布特征相一致^[8,9], 表现为纯合突变型频率低, 野生型频率高。

4 结论

本研究首次在国内成功完成用 TaqMan-MGB 探针基因分型方法分析 GSTP1 基因外显子 5 SNP (A→G) 突变进行的, 但 TaqMan-MGB 探针基因分型方法不仅能用于点突变分析, 还可用于缺失、插入等突变的分析。总之, TaqMan-MGB 探针基因分型方法是一种简单、高通量、高度自动化的基因突变分析技术, 可适用于大规模的 SNP 筛查。

(下转第 30 页)

霉素化疗不仅会增加对 MCA-2 细胞溶解同时也明显降低了肺转移数量。本实验结果显示:5-FU+HBO 组对 BALB/c 鼠移植瘤体积抑制率达 72.10%,较单纯 5-FU 组(42.38%)、单纯 HBO 组(25.77%)为高($p<0.05$),提示 HBO 联合细胞周期特异性药物 5-FU 可明显增强了 5-FU 的抗癌作用。

有关 HBO 对肿瘤的作用机制仍不明白,有文献报道 HBO 提高了肿瘤组织的氧自由基含量,来发挥抑制肿瘤生长的作用^[6];实体瘤内的缺氧状况与肿瘤恶性表型和预后有关系,缺氧的肿瘤细胞为了能够逃避缺氧的损伤,其可通过改变基因表达来适应缺氧环境,如肿瘤细胞可通过高表达缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1 α)来调控血管内皮生长因子、促红细胞生成素、糖酵解酶等表达,以适应缺氧环境而继续增殖^[7,8],亦有研究报道,肿瘤组织中的 HIF-1 α 水平随着组织内氧含量增加而降解,继而抑制肿瘤的生长^[9]。本研究结果显示 HBO 处理荷瘤鼠可抑制肿瘤的生长,与上述报道相一致。这进一步支持了 HBO 联合细胞周期特异性药物治疗肿瘤的可行性。

HBO 对化疗药物的增效机制是什么?目前认为 HBO 能使处于静止期的肿瘤细胞重新进入细胞周期,这有利于提高细胞周期特异性药物的抗癌效能。Kalns^[10]发现 HBO 可使 LNCaP 癌细胞在 G2/M 期积蓄,并可使缺氧区域的癌细胞分裂增殖加速,推测 HBO 具有导致肿瘤细胞周期同步化的作用。我们通过检测了 HBO 作用于 CT26 瘤细胞的增殖周期的改变,显示对照组 G0/G1 期 (74.82%)、S 期 (20.38%)、G2/M 期 (4.80%); HBO-A 组为 66.48%、33.16%、0.36%; HBO-B 组为 55.89%、40.79%、3.32%,提示 HBO 可以诱导 CT26 结肠腺癌细胞在 S 期积蓄,但这与 Kalns 发现的 HBO 可使 LNCaP 癌细胞在 G2/M 期积蓄不一致,这可能与实验用的细胞种类及其生长特性有关,有待进一步证实。

本实验我们选择了两种不同的细胞周期特异性药物 5-FU (主要作用于 S 期)和紫杉醇(主要作用于 M 期),联合 HBO 开展动物实验。结果表明 HBO 明显增强 5-FU 的抑制肿瘤增殖的作用,而 HBO 对紫杉醇的作用无显著统计学意义,初步验证 HBO 具有提高细胞周期特异性药物的抗癌作用。有关 HBO 联

合细胞周期特异性药物治疗肿瘤的研究值得进一步探究。

参考文献

- [1] Haffty BG, Hurley RA, Peters LG. Carcinoma of the larynx treated with hypofractionated radiation and hyperbaric oxygen: long-term tumor control and complications [J]. Int J Radiation Oncology Biol Phys, 1999,45(1):13-20
- [2] Feldmeier J, Carl U, Hartmann K, et al. Hyperbaric oxygen: does it promote growth or recurrence of malignancy? [J]. Undersea Hyperb Med, 2003,30(1):1-18
- [3] Linda E.B, Stuhra VV1, Oddbj?rn S, et al. Hyperbaric oxygen alone or combined with 5-FU attenuates growth of DMBA-induced rat mammary tumors[J]. Cancer Letters, 2004,210:35-40
- [4] Takiguchi N, Saito N, Nunomura M, et al. Use of 5-FU plus hyperbaric oxygen for treating malignant tumors: evaluation of antitumor effect and measurement of 5-FU in individual organs [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2001,47(1):11-4
- [5] Petre PM, Baciewicz FA, Tigan S, et al. Hyperbaric oxygen as a chemotherapy adjuvant in the treatment of metastatic lung tumors in a rat model[J]. Thorac Cardiovasc Surg. 2003,125(1):85-95
- [6] Ogiso Y, Tomida A, Lei S, et al. Proteasome inhibition circumvents solid tumor resistance to topoisomerase II -directed drugs [J]. Cancer Res 2000,60(6): 2429-2434
- [7] 练庆林,杭荣椿,严惠芳等,高压氧对小鼠 s-18 肉瘤化学治疗增效作用研究[J].中华航海医学杂志,1997,4(1):30-33
- [8] Feldkamp MM, Lau N, Rak J, et al. Normoxic and hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) by astrocytoma cell is mediated by Ras [J]. Int J Cancer, 1999,81(1):118-120
- [9] Marxsen JH, Schmitt O, Metzen E, et al. Vascular endothelial growth factor gene expression in the human breast cancer cell line MX-1 is controlled by O2 availability in vitro and in vivo [J]. Ann Anat, 2001,183(3):243-249
- [10] Marc-Andre CD., Maude D, Michaud DE., et al. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators [J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005,37: 535-540

张薇(上接第 26 页)

参考文献

- [1] Michael M Shi, Scott P Myrand, Michael R Bleavins, et al. High-throughput genotyping method for glutathione S-transferase T1 and M1 gene deletions using TaqMan probes[J]. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, 1999,103(1): 3-15
- [2] Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, et al. Identification of genetic polymorphism at the glutathione S-transferase P locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer [J]. Carcinogenesis, 1997,18: 641-644
- [3] Henderson CJ, McLaren AW, Moffat GJ, et al. Pi-class glutathione S-transferase :regulation and function [J]. Chem Biol Interact, 1998, 112:69-82
- [4] Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance [J]. Biochem. Mol. Biol., 1995, 30: 445-600
- [5] Carol Sweeney, Gail Y McClure, Manal Y Fares, et al. Association between Survival after Treatment for Breast Cancer and Glutathione S-Transferase P1 Ile105Val Polymorphism [J]. Cancer Research, 2000,60: 5621-5624
- [6] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells [J]. Nucleic Acids Res., 1998, 16: 1215
- [7] Sanguinetti CJ, Neto ED, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. Biotechniques,1994, 17: 915-919
- [8] 冷曙光,宋文佳,王雅文,等.中国汉族人口三种谷胱甘肽 S- 转移酶基因多态性分析[J].中华预防医学杂志,2001,35(3):159-162
- [9] 马晴雯,林国芳,陈纪刚,等.上海“本地人”正常人群 h GSTP1 基因 A1578G 多态性研究[J].癌变 畸变 突变,2000,12(1):6-8