

应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术检测 载脂蛋白 E 基因多态性

欧雪玲, 赵 方, 许传超, 伍新尧, 区敬华

(中山大学中山医学院法医学教研室, 广东 广州 510080)

摘 要: 【目的】应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术检测人类载脂蛋白 E(*apoE*) 基因的多态性。【方法】用 PCR 扩增出含 *apoE* 两个单核苷酸多态性 (SNPs) 位点 (334 T/C 和 472 C/T) 的 DNA 片段作为模板, 经延伸反应, 产物纯化后利用 MALDI-TOF MS 进行检测。从而确定样本 *apoE* 基因型。【结果】应用本技术对 50 例广东地区无关个体进行 *apoE* 基因多态性检测, 共检出 3 种常见的 *apoE* 基因型, 其中以 *apoE*Σ3/3 型最多, 占总数的 74.00%, 等位基因频率分布以 ε3 (87.00%) 最高。【结论】本实验建立的基于 MALDI-TOF MS 与引物延伸技术检测 *apoE* 基因多态性的方法, 具有快速、准确和可靠的特点。

关键词: 飞行时间质谱; 引物延伸法; 载脂蛋白 E; SNPs

中图分类号: R446

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)06-0564-04

Rapid Detection of SNPs of *ApoE* Gene by Matrix-assisted Laser Desorption/ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry

OU Xue-ling, ZHAO Fang, XU Chuan-chao, WU Xin-yao, OU Jing-hua

(Department of Forensic Medicine, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To use matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid determination of single nucleotide polymorphisms (SNPs) on *apoE* gene. 【Methods】The DNA fragment containing 2 SNPs of *apoE* (334 T/C and 472 C/T) was amplified using polymerase chain reaction (PCR). Purified product was utilized as the template in primer extension (PEX). The small products of allele-specific reaction were purified and measured by MALDI-TOF MS. 【Result】Blood samples from unrelated 50 persons from Guangdong area were genotyped with this method (total 5 types). It was found that *apoE*Σ3/3 was 74.00%. The highest allele (ε3) frequency distribution was 87.00%. 【Conclusion】The analysis is highly accurate and can be applied to clinic practice.

Key words: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; primer extension; *apoE*; single nucleotide polymorphisms

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25 (6): 564 - 567]

载脂蛋白 E (*apoE*) 通过其特异性受体参与摄取与清除肝脏内乳糜微粒 (CM) 和极低密度脂蛋白 (VLDL)^[1]。*apoE* 基因位于第 19 号染色体上, 目前在其基因编码区内发现两个单核苷酸多态性 (SNPs) 位点 334 T/C 和 472 C/T, 分别决定 *apoE* 多肽链中第 112 位和第 158 位氨基酸残基是半胱

氨酸 (Cys) 或精氨酸 (Arg)^[2]。2 个位点均为 Arg 者为 E4, 2 个位点均为 Cys 者为 E2, 112 位为 Cys、158 位为 Arg 者为 E3。其中, E4 比 E3 多 1 个正电荷, E2 则比 E3 少 1 个正电荷, 因而造成其与 *apoE* 受体及 LDL 受体结合能力发生改变。由这两个 SNPs 位点组合而成 ε2、ε3、ε4 3 种常见等位基因及 *apoE*

收稿日期 2004-06-12

基金项目: 原中山医科大学 "211 工程" 基金资助项目 (1999)

作者简介: 欧雪玲 (1978 -), 女, 广东顺德人, 硕士生, 主要研究方向为基因诊断和基因治疗; 伍新尧, 通讯作者. E-mail: xyawo@

gzsums.edu.cn

的6种基因型,即 $\Sigma 2/2$ 、 $\Sigma 3/3$ 、 $\Sigma 4/4$ 、 $\Sigma 4/3$ 、 $\Sigma 3/2$ 、 $\Sigma 4/2$ ^[2]。研究表明, $\Sigma 2/2$ 基因型与Ⅲ型高脂血症有关,而 $\epsilon 4$ 等位基因频率上升则是动脉粥样硬化(AS)及Alzheimer's病的危险因素^[3,4]。对apoE基因多态性的检测已逐步成为临床上脂质代谢相关性研究的重要项目。apoE基因分型的方法有斑点杂交、单链构象多态性分析(SSCP)^[5]、扩增阻滞突变系统(ARMS)^[6]、PCR加限制性酶切法等^[7],但以上方法在临床应用上有一定的限制。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)是近年应用在生物大分子检测领域的一种新技术已经成为蛋白质及多肽分子的重要检测工具。国外正兴起利用该技术的高精确度和灵敏度来进行基因组SNP的分析检测^[8]。而国内有报道利用“引物延伸(PEX)-MALDI-TOF MS”技术检测人类线粒体DNA SNPs^[9]。本研究利用此技术检测apoE基因的多态性位点,建立了一种检测apoE基因多态性的新方法,具有快速、准确和可靠的特点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本 广东地区无关个体血液样本50份,取自本实验室日常检案的检材。

1.1.2 仪器和试剂 OmniFLEX™ MALDI-TOF质谱仪(Bruker-Daltonics,德国),DNA扩增仪(Eppendorf公司);Taq DNA聚合酶,4×dNTPs,ThermoSequenase™(TS,Amersham),TS反应缓冲液,ddCTP,ddGTP,dTTP,基体3-羟基吡啶酸(β -HPA)和扩增产物genopure ds、oligo磁珠纯化试剂盒(Bruker-Daltonics,德国)。

1.2 方法

1.2.1 总DNA提取 采用Chelex-100法提取。

1.2.2 PCR扩增 扩增apoE基因第4外显子232bp片段,使用的扩增引物序列:5'-cgcgggcagcggtgcc aag-3'和5'-gccccggcctgtactacgc-3',由上海博亚公司合成。DNA扩增反应体系:10×反应缓冲液5 μ L,MgCl₂4 μ L(25mmol/L),两条引物各4 μ L(5 μ mol/L),4 μ L模板DNA(约50~100ngDNA),4×dNTP2 μ L(各2mmol/L),Taq DNA聚合酶1 μ L(2U/ μ L),用纯水补足至50 μ L。循环条件:95 $^{\circ}$ C 5min预变性

后95 $^{\circ}$ C 45s变性,68.5 $^{\circ}$ C 30s退火,72 $^{\circ}$ C 50s延伸,循环30次,最后经72 $^{\circ}$ C 2min延伸。

1.2.3 PCR产物纯化 用genopure ds磁珠纯化系统纯化。去除残留的引物及dNTPs等。将纯化产物溶解于10 μ L溶解缓冲液中。此溶液作为下一步PEX反应的模板。

1.2.4 apoE基因2个SNPs位点特异的PEX反应 apoE 334nt特异的PEX引物为5'-gcgacatggaggacgtg-3',472nt为5'-gatgccgatgacctgcagaagc-3',由上海博亚公司合成。反应体系含:纯化后的PCR产物(模板)1.5 μ L(约150ngDNA),ThermoSequenase(TS)0.5 μ L(2U/ μ L),TS反应缓冲液1 μ L,两条引物各1 μ L(20 μ mol/L),ddCTP 0.3 μ L,ddGTP 0.3 μ L,dTTP 0.4 μ L(各2mmol/L),用纯水补足至10 μ L。循环条件:95 $^{\circ}$ C 5min预变性后,95 $^{\circ}$ C 10s变性,41 $^{\circ}$ C 30s退火,72 $^{\circ}$ C 10s延伸,循环60次,最后经72 $^{\circ}$ C 2min延伸。

1.2.5 PEX产物纯化 用genopure oligo磁珠纯化试剂盒纯化。最后将纯化产物溶解于5.0 μ L溶解缓冲液中待测。

1.3 样本分析

在Scout 100样品靶(10×10)上,每个样品点上0.5 μ L基质溶液(饱和3-HPA、10mmol/L柠檬酸氢二氨、300ml/L乙腈(ACN))。室温晾干。再将待测样品溶液0.5 μ L点于每个样品点干燥的基体表面,室温晾干。将靶装入MALDI-TOF MS质谱仪中,采用阳离子模式,PIE线形工作模式进行信号采集;采用样品内部的引物峰为内标进行内部校正。

1.4 数据处理

收集的原始数据用XMASS 5.0软件进行分析处理。

1.5 等位基因判别

2个特异引物和各自延伸产物的序列和相对应的分子质量见表1。对于等位基因 $\epsilon 4$,这2条特异性引物均只延伸一个ddC;对于等位基因 $\epsilon 3$,334nt特异引物延伸一个dT+ddG,472nt特异引物延伸一个ddC;而对于等位基因 $\epsilon 2$,2条特异性引物均延伸一个dT+ddG(表1,表2和图1)。通过MALDI-TOF MS检测,各个引物及其PEX产物可形成2个(纯合子)或3个(杂合子)信号峰,计算各个产物峰与响应的引物峰之间的m/z之差,得知所延伸的碱基的类型,可推断该SNPs位点的基因型。

表 1 apoE 基因内两个 SNPs 位点的特异性引物及其相应延伸产物

Table 1 apoE primers and extension products			
Primer ID	Sequence of primer/extension product	Mass(ku)	Variation
apoE-334	gcggacatggaggacgtg	5 630	
	gcggacatggaggacgtgddC	5 902	C
	gcggacatggaggacgtgTddG	6 245	T
apoE-472	gatgccgatgacctgcagaag	6 482	
	gatgccgatgacctgcagaagddC	6 754	C
	gatgccgatgacctgcagaagTddG	7 098	T

表 2 apoE 基因的 3 种常见等位基因分型

Table 2 Allelic variations in the gene coding for apoE

SNPs site	Variation	Alleles
apoE-334	T	ε2
apoE-472	T	
apoE-334	T	ε3
apoE-472	C	
apoE-334	C	ε4
apoE-472	C	

SNP: single nucleotide polymorphism

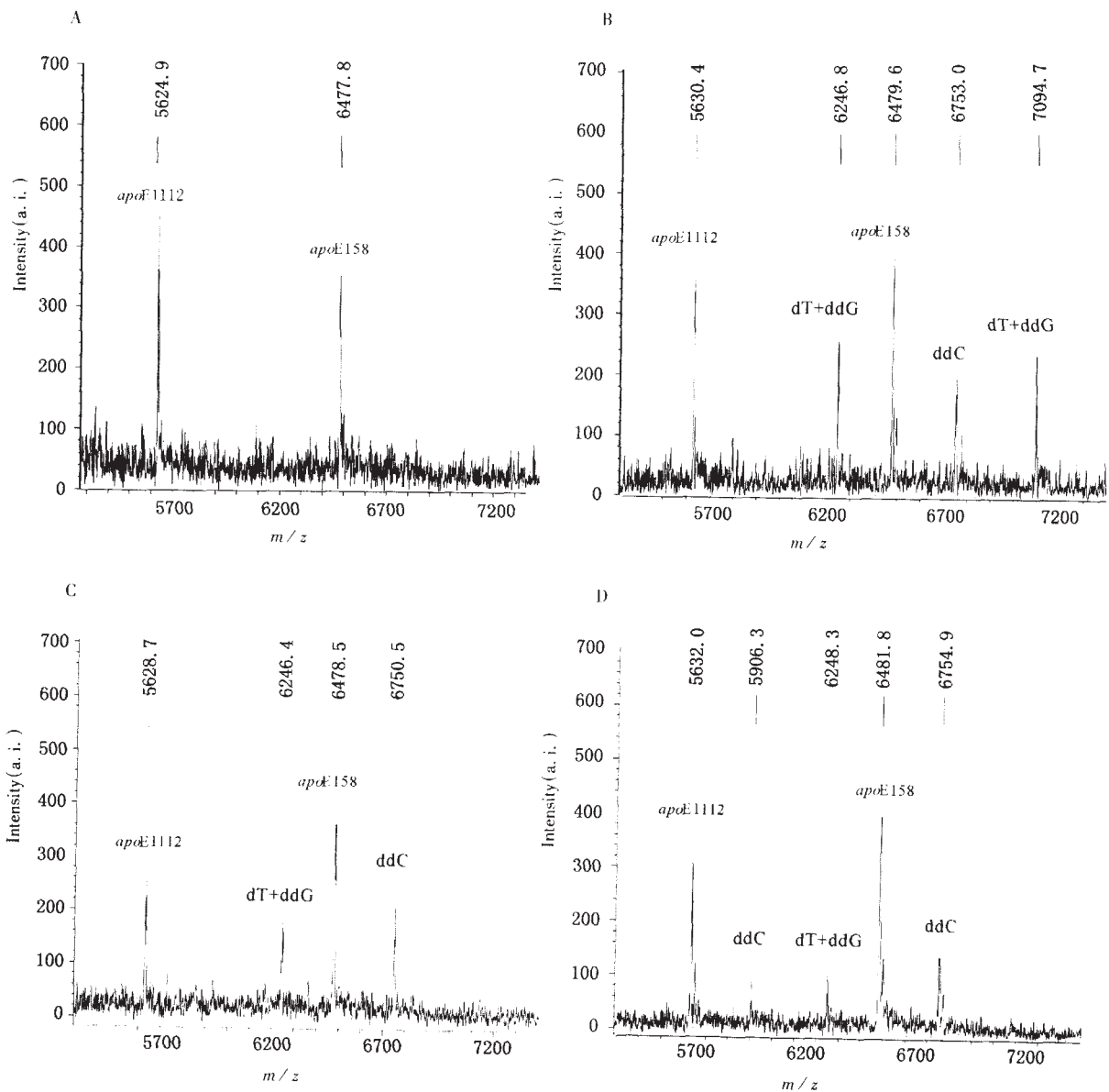


图 1 apoE 两个 SNPs 位点的 MALDI-TOF MS/PEX 质谱图

Fig. 1 MALDI-TOF Ms/PEX spectra of 2 SNPs in the apoE gene (mass charge ratio: m/z)

MALDI-TOF: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight; PEX: primer extension; SNP: single nucleotide polymorphism

A: SNPs primers ; B :apoE Σ2/3 ; C: apoE Σ3/3 ;D: apoE Σ3/4

2 结果

我们初步应用此技术对广州地区 50 个无关个体进行 apo E 基因多态性检测,结果如下:在 50 例广州地区 50 个无关个体标本中,发现三种基因型,未发现 $\Sigma 2/2$ 、 $\Sigma 4/2$ 、 $\Sigma 4/4$ 基因型。基因型分布为 $\Sigma 3/2$ 8 例,占 16.00%; $\Sigma 3/3$ 37 例,占 74.00%; $\Sigma 4/3$ 5 例,占 10.00%。等位基因分布为 $\epsilon 2$ 8.00%、 $\epsilon 3$ 87.00%、 $\epsilon 4$ 5.00%。经 Hardy-Wenber 定律检验处于遗传平衡状态。其中有代表性的质谱检测图谱见图 1。

3 讨论

本研究用 MALDI-TOF MS 结合引物延伸法能准确检测人类载脂蛋白 E (apoE) 的基因型。与其他传统方法比较,本技术直接检测生物大分子的分子量,并能够区分相差 9(ku) 的两种分子,例如两条长度相同,只有 1 个碱基不同的寡核苷酸片段。但是, MALDI-TOF MS 质谱技术在检测较长的 DNA 链时有一些限制^[10],而引物延伸法 (PEX) 则弥补了这个不足。引物延伸法又称为微测序 (mini sequencing) 是为检测 SNPs 而设计的分析技术^[12],在 PEX 反应中,引物只延伸 1~2 个碱基,合成的片段小 (通常 < 25 bp),故适于 MALDI-TOF MS 检测;且合成碱基的数目少, DNA 聚合酶酶促反应产生错配的几率大大下降,因而反应更精确。用本方法对 50 例广州地区无关个体 ApoE 基因型进行检测,发现 $\Sigma 3/2$ 、 $\Sigma 3/3$ 、 $\Sigma 4/3$ 三种基因型,未发现 $\Sigma 2/2$ 、 $\Sigma 4/2$ 、 $\Sigma 4/4$ 基因型,可能与这三种基因型在人群中分布稀少或本次实验样本量不足有关。经 Hardy-Wenber 定律检验,符合遗传平衡分布状态。

在本实验中,结合 MALDI-TOF MS 质谱技术与 PEX 法,可在一次实验中同时检测 apoE 基因上的 2 个 SNPs 位点的基因型,检测一个位点只需几分钟。配合机械手自动点样,自动化软件进行信号收集和数据处理,此技术进行 SNPs 筛查每天可检测数千个样本^[8,11],适用于大规模的 SNPs 快速检测,研究 apoE 基因多态性相关的疾病,并可发展为检验科常规检验项目。随着对这项技术的完善,可利

用它进行人群频率调查及其它疾病的相关性研究。

参考文献:

- [1] Mahley R W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology[J]. Science, 1988, 240 (4852): 622-30.
- [2] Koch W, Ehrenhaft A, Griesser K, et al. TaqMan systems for genotyping of disease-related polymorphisms present in the gene encoding apolipoprotein E[J]. Clin Chem Lab Med 2002, 40(11): 1123-31.
- [3] Davignon J, Gregg R E, Sing C F. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis [J]. Arteriosclerosis, 1988, 8(1): 1-3.
- [4] Sauuders A M, Schmader K, Breitner J C, et al. Apolipoprotein $\epsilon 4$ allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming disease [J]. Lancet, 1993, 342(8873): 710-1.
- [5] Tsai M Y, Suess P, Schwichtenberg K, et al. Determination of apolipoprotein E genotypes by single strand conformational polymorphism[J]. Clin Chem, 1993, 39(10): 2121-4.
- [6] Main B F, Jones P J, MacGillivray R T, et al. Apolipoprotein E genotyping using the polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide primer[J]. J Lipid Res, 1991, 32(1): 183-7.
- [7] Richard P, Thomas G, Zulueta M P, et al. Common and rare genotypes of human apolipoprotein E determined by specific restriction profile of polymerase chain reaction amplified DNA[J]. Clin Chem, 1994, 40(1): 24-9.
- [8] Bray M S, Boerwinkle E, Doris P A. Highthroughput multiplex SNP genotyping with MALDI-TOF mass spectrometry: practice, problems and promise[J]. Hum Mutat, 2001, 17(4): 296-304.
- [9] 许传超,蔡贵庆,伍新尧,等. 检测线粒体 DNA SNPs 的快速测定法 - 引物延伸 - 飞行时间质谱法 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2003, 42(6): 90-2.
- [10] Griffin T J, Smith L M. Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Trends Biotechnol, 2002, 18(2): 77-84.
- [11] Sun X Y, Ding H, Hung K, et al. A new MALDI-TOF based mini-sequencing assay for genotyping of SNPs[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E68.

(编辑 黄小延)