

错配修复基因 MLH1 和 MSH2 多态性分析条件的优化

Optimization of single-nucleotide polymorphism analysis of mismatch repair genes MLH1 and MSH2

王玉招[#], 梅倩[#], 颜宏利, 孙树汉^{*}

(第二军医大学基础医学部医学遗传学教研室, 上海 200433)

[关键词] 基因错配; DNA 修复; 多态性; 限制性片段长度

[中图分类号] Q 754 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2006)11-1276-02

DNA 修复系统是与大肠癌发病密切相关的遗传因素, 错配修复基因 (mismatch repair genes, MMR) 是最重要的一类 DNA 修复基因^[1], 其在维护基因组稳定的细胞内通路中发挥着重要的作用, 其主要是通过剪切发生错配的核苷酸而对基因进行修复^[2]。

散发性大肠癌的患者中有约 10% 可以检测到错配修复基因的改变。这些改变多为单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 引起。人们目前普遍认为 SNP 与生命科学中的许多现象相关^[3], 而且证实了包括 APC、HRAS1 在内的多种与大肠癌相关的 SNP^[4]。而所有 MMR 的改变中大约 98% 是发生在 MLH1 和 MSH2 这 2 个基因上的。因此本研究选择了 29 个 SNP 位点, 在 160 例散发性大肠癌患者和 150 例正常对照人群中利用 DNA 测序技术筛查其频率分布情况。

1 材料和方法

1.1 材料 所有患者样本采集自南京市中医院和第二军医大学长海医院, 正常对照样本由第二军医大学长征医院检验科提供。本实验中随机选择了 1 例肿瘤样本和 2 例正常对照样本进行条件摸索优化。SNP 位点根据 NCBI SNP 数据库和查阅到的文献进行选择 (表 1)。基因组 DNA 抽提试剂盒为杭州维特洁公司代理 Axygen 公司产品; *Pfu* 高保真和 Hotstart *Taq* DNA 聚合酶购自上海申能博彩公司; dNTP 为上海赛百盛公司产品; 测序用 BigDye 等试剂使用 Applied Biosystems (ABI) 公司 BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit 试剂盒; PCR 采用 ABI 公司 GeneAmp PCR system 9700 PCR 仪; 测序使用 ABI 公司 3130 遗传分析仪 (使用 36 cm 毛细管和 POP-7 测序胶); 蛋白凝胶扫描定量采用美国 Alpha 公司的 Chemilmager™ 5500 凝胶成像系统。

1.2 基因组 DNA 的提取制备 将 3 例样本提取基因组 DNA, 方法按照试剂盒说明书操作。用 2 种方法检测基因组 DNA 抽提质量: (1) 0.8% 琼脂糖凝胶电泳法; (2) 紫外分光光度法测定 D_{260}/D_{280} 。DNA 模板定量可以根据琼脂糖凝胶电泳 DNA 条带的深浅以及紫外分光光度计波长 260 nm 处样本的光密度 (D 值) 来确定。

1.3 引物 利用 Primer Premier5 软件进行设计, 在同一外显子的 SNP 位点有同一对引物在同一段扩增。引物见表 2。所有引物均由上海赛百盛公司合成。

表 1 错配修复基因 MLH1 和 MSH2 的 SNP 位点

MMR	外显子	碱基改变	密码子	氨基酸改变	
MLH1	1	2 T/ G	ATG/ AGG	M1R	
	2	199 G/ A	GGG/ AGG	G67R	
	4	350 C/ T	ACG/ ATG	T117M	
	4	350 C/ G	ACG/ AGG	T117R	
	5	394 G/ C	GAT/ CAT	D132H	
	8	637 G/ T	GTG/ TTG	V213L	
	8	649 C/ T	CGC/ TGC	R217C	
	8	655 A/ G	ATC/ GTC	I219V	
	11	977 T/ C	GTG/ GCG	V326A	
	12	1151 T/ A	GTT/ GAT	V384D	
	12	1217 G/ A	AGT/ AAT	S406N	
	13	1453 G/ C	GAT/ CAT	D485H	
	13	1474 G/ A	GCA/ ACA	A492T	
	14	1625 A/ T	CAG/ CTG	Q542L	
	16	1853 A/ C	AAG/ ACG	K618T	
	19	2152 C/ T	CAC/ TAC	H718Y	
	19	2185 C/ G	CTG/ GTG	L729V	
	MSH2	1	49 G/ T	GTC/ TTC	V17F
		2	277 C/ T	CTT/ TTT	L93F
2		287 G/ A	CGT/ CAT	R96H	
2		329 A/ G	AAG/ AGG	K110R	
3		499 G/ C	GAT/ CAT	D167H	
6		965 G/ A	GGC/ GAC	Q322D	
7		1168 C/ T	CTT/ TTT	L390F	
10		1571 G/ C	CGT/ CCT	R524P	
12		1886 A/ G	CAA/ CGA	Q629R	
12		1917 T/ G	CAT/ CAG	H639Q	
13		2141 C/ T	GCT/ GTT	A714V	

1.4 PCR 条件优化 根据 PCR 反应所需各种不同参数, 我们固定参数: 模板 DNA、引物和 dNTP, 对其他参数进行了优化, 包括高保真 *Pfu* 和 Hotstart *Taq* DNA 聚合酶的对比、 Mg^{2+} 浓度 (1.5、2.0、2.5 mmol/L) 以及退火温度 (56、58、60、62、64、65)。基础循环参数为: 94 5 min, 40 个循环 (94 30 s, 60 30 s, 72 45 s), 72 10 min, 降至 4。扩

[基金项目] 国家自然科学基金 (30271167); 上海市基础重点科研项目 (05JC14043)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30271167) and Key Fundamental Research Program of Shanghai (05JC14043)。

[作者简介] 王玉招, 助理实验师。E-mail: yuzhao_wang@msn.com; 梅倩, 博士。E-mail: meiqn@hotmail.com

[#] 共同第一作者。

^{*} Corresponding author. E-mail: shsun@vip.sina.com

增产物用 2.0%琼脂糖凝胶,5 V/cm 电压进行电泳分离,溴 乙锭染色,凝胶成像系统观察和照相。

表 2 PCR和测序引物

基因	外显子	正向引物(5' 3')	反向引物(5' 3')	
MLH1	1	GTG AGC ACG AGG CAC TGA GGT	GCAT TAG CTG GCC GCT GGA TA	
	2	TTT GAT TTG CCA GTT TAG ATG	AGC CTA GTT TCC AGA ACA GAG	
	4	CCC TTT GGT GAG GTG ACA GTG	CTG GTG TTG AGA CAG GAT TAC	
	5	AGT GGA GAA ATA AAC AGG AAA	TAC CAT TCT TAC CGT GAT CTG	
	8	TTA TGA TGT TTC AGT CTC AGC CA	CCA AAA TAA TGT GAT GGA ATG AT	
	11	CCC CAG AAT GTG GAT GTT AAT	CCC TGA CCT GGG TGA AGT ACA	
	12	CCA CAA CAA GTC TGA CCT CGT	TCA TCT TGC TGC CTA GCC CTG	
	13	ACA AGA ATA ATA ATG ATC TGC AC	TTC CTG GAG ACT CAA AAC ACT	
	14	TTT TGT TTT GCA GTT CTC CGG	TGC TCC CTG GAC CAT TGT TGT	
	16	CTT GCC TTA GAT AGT CCA GAG	TTT GAA GAA TAC AAC AGA AGT	
	19	GCA AAC AGG GAG GCT TAT GAC	CAC ATC CCA CAG TGC ATA AAT	
	MSH2	1	TTC AAC CAG GAG GTG AGG AGG	TCG CCC CGG TCG AAA AGG
		2	CTA ATA CAG TGC TTG AAC ATG	CTC AAA CCA TTC TAC TAT CAC
		3	AAC AAT GAT ATG TCA GCT TCC	TCA GTT TCC CCA TGT CTC CAG
		6	TTA TGT TAT TGT TCC TCT GTT TT	CTC CTC TAT TCT GTT CTT ATC CA
7		CAG ATT GAA TTT AGT GGA AGC	GAG CCT GTA TAA CAT TAG GTA GT	
10		TGA TTA TCA AGG CTT GGA CCC	TTA GGG AAT TAA TAA AGG GTT	
12		GTG TCA AAT GGA GCA CCT GTT	TGT GGA ACA TCT GTT TAT CTT TT	
13		AGT CAG CAG AAG TGT CCA TTG	GAG ATG CAC TTA CCT GAG GAT	
15	ATG CTG TCC CCT CAC GCT TCC	GCA CTT CTT TGC TGC TGG TTC		

1.5 测序条件优化 使用乙醇/醋酸钠方法纯化 PCR 产物以去除体系中残留的引物与 dNTP。反应体系为 BDT 0.375 μ l, Buffer 0.85 μ l, H₂O 0.725 μ l, primer 0.25 μ l, DNA template 10 ng。PCR 循环条件为 96 10 s、50 或 PCR 优化所得特异性退火温度 5 s、60 4 min、25 个循环,迅速降温至 4 ,以乙醇/EDTA/醋酸钠方法纯化产物。以 ABI 3130 遗传分析仪电泳测序。

2 结果

2.1 基因组 DNA 提取及电泳分析 3 个样本的基因组 DNA 在凝胶上均表现为 1 条规则的条带,无降解现象。

2.2 扩增条件优化结果及参数确定 通过优化 DNA 聚合酶和 Mg²⁺ 浓度,确定了最合适的 PCR 扩增参数:采用 Hot-start Taq DNA 聚合酶;1.5 mmol/L Mg²⁺;大部分片段采用 60 退火温度最佳,但 MLH1 的 14、19 和 MSH2 的 1、15 外显子片段应采用 63 。

2.3 测序条件优化结果及参数确定 通过条件摸索,以试剂盒提供的反应条件(50)进行反应,得到的测序图谱有大量杂峰出现,且可读序列短,碱基不宜判读,不能满足基因分型工作的要求。通过摸索条件,发现在其他因素决定情况下,改变测序 PCR 反应的退火温度,采用 PCR 扩增时的特异退火温度,可以得到序列峰清晰单一、可读性好的标准序列图谱。

3 讨论

大规模的基因测序要求测序结果快速而准确,有更高的精确度,更长的判读序列,且快速简便^[5]。DNA 自动测序的成功依赖于高质量的 DNA 模板,由于 DNA 模板质量的不同,核苷酸曲线峰的信噪比可出现明显的差异,从而影响到

相应核苷酸序列的判读。

而 PCR 反应的条件恰当与否直接影响测序 DNA 模板的质量,不恰当的条件得到的 PCR 扩增产物条带多且模糊,背景杂乱,不适于用作 DNA 测序模板。我们对 PCR 反应条件进行了反复的摸索,优化了 PCR 条件,保证了 DNA 测序的模板质量,得到了单一、清晰、无杂乱背景的扩增产物。我们还对产物以乙醇/醋酸钠沉淀纯化,以去除多余的引物、dNTP 的干扰。进行测序 PCR 后还进行乙醇/EDTA/醋酸钠纯化,以去除未结合的荧光染料标记物。

我们还对测序反应条件进行了进一步的摸索,优化了测序条件,能够得到较为标准的测序图谱,为下一步大规模测序分型工作奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Mohrenweiser HW, Jones IM. Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation[J]. *Mutat Res*, 1998, 400:15-24.
- [2] Brieger A, Trojan J, Raedle J, et al. Transient mismatch repair gene transfection for functional analysis of genetic *hMLH1* and *hMSH2* variants[J]. *Gut*, 2002, 51:677-684
- [3] Mitchell RJ, Farrington SM, Dunlop MG, et al. Mismatch repair genes *hMLH1* and *hMSH2* and colorectal cancer: a HuGE review[J]. *Am J Epidemiol*, 2002, 156:885-902.
- [4] 周建农,高长明,郑杰. 大肠癌[M]//吴. 肿瘤遗传学. 北京:科学出版社, 2004: 306-337.
- [5] 许艳,卫红飞,胡小平,等. DNA 自动测序中的常见影响因素及测序反应体系的优化[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2004, 30: 978-980.

[收稿日期] 2006-09-04

[修回日期] 2006-09-30

[本文编辑] 尹茶