

高分辨率熔解曲线法在 *GLP1R* 基因多态性位点 rs3765467 检测中的应用[△]

张 远*, 何 霞, 钟 磊, 串俊兰, 龙恩武[#](四川省医学科学院/四川省人民医院药学部, 成都 610072)

中图分类号 R394 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)17-2305-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.17.01

摘 要 目的: 建立检测肠促胰岛素样肽-1受体(*GLP1R*)基因已知突变位点 rs3765467(NT_007592.16 的第 39 065 819 位)的方法, 并评价其准确性与实用性。方法: 收集我院体检中心 2015 年 10 月—2016 年 2 月 72 例健康体检者的外周静脉血样本, 采用柱提法提取其全血 DNA, 经降落聚合酶链反应扩增后, 采用高分辨率熔解曲线(HRM)法对产物进行分析; 同时选取其中 38 例受试样本进行双脱氧链终止法(Sanger 测序法)测序验证, 比较 2 种方法的结果。结果: 突变扫描结果显示, 扩增片段中存在 39 065 817 和 39 065 819 两个多态性位点。HRM 法只检测出了 4 种基因型[GCG/GCG、GCA/GCG 或 ACG/GCG、GCA/GCA 或 ACG/ACG、A(G)CA(G)]; 而 Sanger 测序法共检测出 6 种基因型[GCG/GCG、ACG/GCG、ACG/ACG、A(G)CA(G)、GCA/GCG、GCA/GCA]。结论: HRM 法可区分 GCG/GCG 和 A(G)CA(G)基因型, 但无法区分 GCA/GCG 与 ACG/GCG 杂合突变、GCA/GCA 与 ACG/ACG 纯合突变。该方法并不适用于多个邻近位点的单核苷酸多态性检测。在进行单核苷酸突变检测时, 应对序列进行综合分析后再选取经济、简便的方法。

关键词 *GLP1R* 基因; 高分辨率熔解曲线; 单核苷酸多态性; 基因检测

Application of High Resolution Melting Method in the Detection of *GLP1R* Gene Polymorphism Site rs3765467

ZHANG Yuan, HE Xia, ZHONG Lei, CHUAN Junlan, LONG Enwu (Dept. of Pharmacy, Sichuan Academy of Medical Sciences/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the detection of the known glucagon-like peptide 1 receptor (*GLP1R*) gene mutation site rs3765467 (NT_007592.16, position: 39 065 819), and to evaluate its accuracy and practicability. METHODS: Peripheral venous blood samples of 72 healthy subjects were collected in medical examination center of our hospital during Oct. 2015-Feb. 2016. The whole blood DNA was extracted by column extraction method. After amplified by touch down PCR, high resolution melting (HRM) method was adopted to analyze amplified product. Sequencing verification by double stranded chain termination method (Sanger sequencing method) was performed for 38 test samples. The results of 2 methods were compared. RESULTS: The results of mutation scanning showed that there were 39 065 817 and 39 065 819 polymorphism sites in amplified segments. Four types of mutations were detected by HRM method [GCG/GCG, GCA/GCG or ACG/GCG, GCA/GCA or ACG/ACG, A(G)CA(G)], but 6 types of mutations was detected by Sanger sequencing method [GCG/GCG, ACG/GCG, ACG/ACG, A(G)CA(G), GCA/GCG, GCA/GCA]. CONCLUSIONS: HRM method can identify GCG/GCG and A(G)CA(G) genotype, but can not identify GCA/GCG and ACG/GCG heterozygous mutation, GCA/GCA and ACG/ACG homozygous mutation. The method is not suitable for the detection of single nucleotide polymorphism for multiple neighboring sites. In the detection of single nucleotide mutation, economical and simple method should be selected after comprehensive analysis of sequence.

KEYWORDS *GLP1R* gene; High resolution melting; Single nucleotide polymorphism; Gene detection

肠促胰岛素效应是指口服葡萄糖对胰岛素分泌的促进作用明显强于静脉注射的现象。该效应所产生的胰岛素占进食后胰岛素总量的 60% 左右, 且有研究发现, 这种肠促胰岛素效应在 2 型糖尿病患者中有所减退, 因此, 基于肠促胰岛素样肽 1 (Glucagon-like peptide 1,

GLP-1) 作用机制的药物应运而生, 为 2 型糖尿病的治疗开辟了新的途径^[1]。GLP-1 由肠道 L 细胞分泌, 与胰岛 B 细胞表面 GLP-1 受体 (Glucagon-like peptide 1 receptor, *GLP1R*) 结合后, 通过 G 蛋白偶联途径调控胰岛素的分泌^[2]。近几年有研究发现, 2 型糖尿病患者虽然餐后 GLP-1 水平未见改变, 但胰岛素分泌功能却明显受损; 此外, 一些 2 型糖尿病患者对外源性 GLP-1 刺激不敏感, 提示可能与 *GLP1R* 功能异常有关^[3-4]。Sathanathan A 等^[4]发现, *GLP1R* 基因多态性位点 rs3765467 (NT_007592.16 的第 39 065 819 位) 可显著影响健康人输注

△ 基金项目: 四川省科技支撑计划项目 (No. 2015SZ0182)

* 主管药师, 硕士。研究方向: 药物基因组学。电话: 028-87393405。E-mail: 447415054@qq.com

通信作者: 副主任药师。研究方向: 内分泌临床药学、药事管理学、药物经济学评价。电话: 028-87393316。E-mail: dragon984169@126.com

GLP-1 后胰岛 B 细胞的应答,故在 2 型糖尿病患者中检测该多态性位点可能有助于阐明个体差异的原因和指导疾病治疗。

高分辨率溶解曲线(High resolution melting, HRM)是近年来国内外兴起的一种灵敏度高、特异性好、通量高、检测成本低、快速、方便的单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)检测方法。该方法通过在 DNA 双链中嵌入饱和染料、监控 DNA 溶解曲线的变化来进行分析,不仅可检测已知突变位点,还可以同时扫描目标片段中的未知突变位点^[9]。本研究通过建立 *GLP1R* 基因多态性位点 rs3765467(G>A)的 HRM 分析方法,对 72 例健康受试者进行该突变位点的检测及其前后共 68 bp 片段的突变扫描,并采用双脱氧链终止法(Sanger 测序法)对其中 38 例样本进行验证,评价 HRM 法用于 SNP 检测的准确性与实用性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集我院体检中心 2015 年 10 月—2016 年 2 月 72 例健康体检者的外周静脉血样本。其中,男性 48 例,平均年龄(52.00 ± 5.27)岁;女性 24 例,平均年龄(50.79 ± 6.01)岁。所有标本的采集均获得医院医学伦理委员会的批准,所有受试者均知情同意。

1.2 DNA 的提取

采用柱提法提取受试者的全血 DNA。所有受试者均采集静脉血 1~2 mL,经乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝后,采用柱式全血基因组提取试剂盒(上海百傲科技股份有限公司)提取全血 DNA。采用 NanoDrop 2000 型微量分光光度计(美国 Thermo 公司)测得其 DNA 质量浓度为 40~120 ng/μL;以不同波长下光密度(OD)比值计算其纯度分别为 1.6~2.0(OD_{260 nm}/OD_{280 nm})、1.7~2.2(OD_{260 nm}/OD_{230 nm})。

1.3 引物合成

根据美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)人类 *GLP1R* 的参考序列 NT_007592.16,设计针对 rs3765467(G>A)突变位点的上、下游引物,详见表 1。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,并采用高效液相色谱(HPLC)法纯化。

表 1 *GLP1R* 基因多态性位点 rs3765467 的引物序列

Tab 1 Primer sequences for *GLP1R* gene polymorphism site rs3765467

引物	碱基数量	序列
正向	20	5'-CTGAGGACTTGTCTGGAGT-3'
反向	21	5'-TCCAGTGAAGTGTCCAAGAC-3'

1.4 扩增及 HRM 分析

扩增及 HRM 分析均在 Light Cycler 480 型实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(罗氏诊断)中完成,试剂盒采用预混有 Taq 酶、dNTP、高分辨率溶解染料的 Light Cycler 480 HRM 试剂盒(罗氏诊断)。

采用降落 PCR 法对受试者全血 DNA 进行扩增。扩增体系共 20 μL,包括 2 ng DNA 模版、150 nmol/L 引物、1.5 μmol/L Mg²⁺。PCR 反应条件:95 °C 预变性 10 min,95 °C 扩增 10 s;随后,退火温度由 66 °C 降至 58 °C,保持 10 s,每 1 °C 为 1 个循环,延迟 2 个循环开始,共扩增 50 个循环;72 °C 再延伸 10 s。扩增产物长度为 109 bp。

HRM 反应条件:95 °C 溶解 1 min,降至 40 °C 保持 90 s,以 0.04 °C/s 的速率从 75 °C 上升到 95 °C,完成溶解曲线分析,探测次数为 15 次/°C。采用 Light Cycler 480 基因扫描软件(R 1.5.1.62)(罗氏诊断),设置“温度偏移(Temperature shift)”一栏下的“温度变化水平(Threshold)”为 0,其他参数为默认,每个待测样本均设置复孔,进行扫描与分析。

1.5 Sanger 测序

为进一步验证 HRM 法检测结果,从各基因型样本中随机抽取 7~13 例样本,共 38 例,采用 Sanger 测序法进行验证。该试验交由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

2 结果

2.1 HRM 法的检测结果

突变扫描结果显示,扩增片段中存在 39 065 817 和 39 065 819 两个多态性位点,共检出基因型 4 种。其中,野生型(GCG/GCG)23 例,杂合型(GCA/GCG 或 ACG/GCG)28 例,突变型(GCA/GCA 或 ACG/ACG)11 例,多位点突变型[A(G)CA(G)]10 例,详见图 1、图 2(因涉及两个位点的突变,故为明确表达,结果均采用 NT_007592.16 第 39 065 817~39 065 819 位的 3 个碱基表示)。序列第 39 065 817 位也存在 G>A 的突变,而 HRM 法无法区分这两个位点间的杂合突变(GCA/GCG 和 ACG/GCG)和纯合突变(GCA/GCA 和 ACG/ACG)。

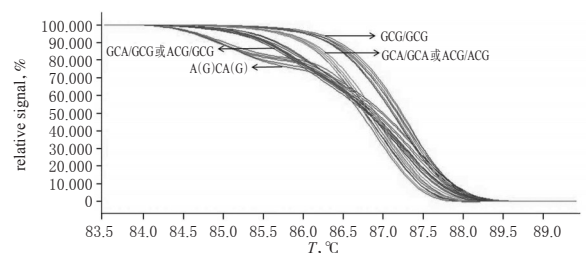


图 1 样本标准化溶解曲线

Fig 1 The normalized melting curves of samples

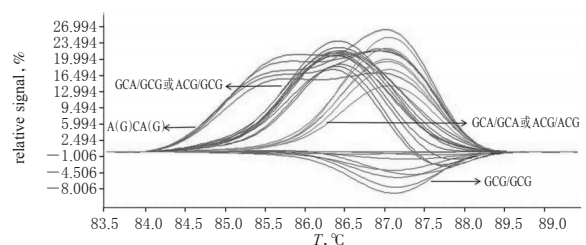


图 2 样本差异作图

Fig 2 The difference plot for samples

2.2 Sanger 测序法的检测结果

共检出基因型 6 种。其中, GCG/GCG 型 14 例,

ACG/GCG型2例,ACG/ACG型1例,A(G)CA(G)型9例,GCA/GCG型6例,GCA/GCA型6例,详见图3。由于HRM法无法区分5'-ACG-3'与5'-GCA-3'的纯合和杂合型,故无法判断HRM法的检测结果是否与Sanger测序一致,但HRM法能够区分GCG/GCG与A(G)CA(G)这两种基因型,其检测结果与Sanger测序是一致的。

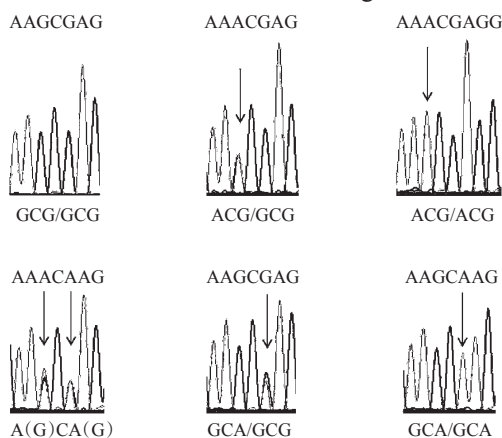


图3 GLP1R rs3765467位点的Sanger测序图

Fig 3 Sanger sequencing for GLP1R rs3765467

3 讨论

在倡导精准医疗的大背景下,基于遗传多态性的个体化用药被越来越多的医务工作者所重视。现有多种SNP筛查技术如测序、DNA芯片、Tagman探针、突变扩增阻滞系统(Amplification refractory mutation system, ARMS)等已逐渐应用于临床检测,并已覆盖到心脑血管疾病、精神类疾病及肿瘤等方面^[6-7]。本研究通过检测GLP1R基因中的已知SNP位点,探讨HRM法用于突变检测的优缺点,为使用该技术的同行提供参考。

PCR-HRM的分析原理是在普通PCR的基础上加入可与双链DNA结合的饱和荧光染料,扩增结束后采取逐步升温的过程将产物解链,荧光染料因此脱落,荧光信号逐渐减弱,形成一个随温度升高而荧光信号减弱的曲线图(如图1)。当50%的双链解链成单链时所对应的温度称为熔解温度(T_m),由于各片段的碱基(GC)含量不同,所对应的 T_m 也有所不同。HRM法至少可分辨0.5℃ T_m 的差异,其精密的温控设计使单个碱基的突变(一般是C/T或G/A突变分辨效果较好)分型成为可能^[5]。

由于HRM法不需要设计探针,且PCR扩增过程完成后只需运行一个升温程序即可完成检测,因此具有成本低、简便、闭管操作等优势。但在有些情况下(比如C>G、A>T突变,突变基因丰度很低,或待测位点邻近区域有其他突变碱基),则需进行条件优化,优化方法包括:掺杂一定比例的野生型样本、使用低变性温度下共扩增PCR或设计多重PCR及各式探针等^[8-10]。虽然这些方法可以扩大HRM法的检测范围,但探针引物的设计及PCR反应体系的探索更耗时、耗力,甚至有时候需要在扩增后进行开管操作,难以体现HRM法成本低、简便等特点。

本研究共检测了72例样本,为避免人力、物力不必要的浪费,根据统计学理论和Janavicius R等^[11]的对比研究,抽取了超过16例样本(本研究抽取的38例样本)进行验证^[12],采用的方法为基因检测的“金标准”——Sanger测序法(检测成本高)。验证结果显示,与HRM法只检出了4种基因型比较,Sanger测序法共检出了6种基因型,表明HRM法的分辨率不如Sanger测序法高。其原因可能为:本研究的待测位点邻近区域恰巧也存在1个G>A的突变,使得包括待测位点在内的3个碱基呈对称排列[5'-GCG-3'(野生型)或5'-ACA-3'(突变型)],这种排列造成5'-ACG-3'与5'-GCA-3'的纯合型(ACG/ACG和GCA/GCA)和杂合型(ACG/GCG和GCA/GCG)无法被区分。因此对于此类位点的检测,HRM法也许不是一个适当的选择。Tindall EA等^[13]和Chen C等^[14]在各自的研究中也得出与本研究一致的结论,即当待测片段中含有多个SNP位点时会影响HRM法分析结果的准确性。

综上所述,当检测范围有2个以上邻近突变位点时不宜采用HRM法;若是对突变片段进行扫描,必须结合测序结果才能作出准确判定,否则会影响结果的准确性。如此一来,HRM法成本低、简便等优势也许就不那么明显了。本研究为HRM法直接检测SNP位点提供了一定的方法学参考,但如何全面地评价HRM法在SNP检测中的应用地位还需要参考更多的方法,如加入探针或改变试验条件,或与Taqman探针、DNA芯片等检测方法进行对比,以及进行经济学方面的比较等。

参考文献

- [1] Nauck MA, Holst JJ, Willms B, *et al.* Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) as a new therapeutic approach for type 2-diabetes[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1997, 105(4):187-195.
- [2] Salehi M, Aulinger B, Prigeon RL, *et al.* Effect of endogenous GLP-1 on insulin secretion in type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2010, 59(6):1330-1337.
- [3] Shu L, Matveyenko AV, Kerr-Conte J, *et al.* Decreased TCF7L2 protein levels in type 2 diabetes mellitus correlate with downregulation of GIP- and GLP-1 receptors and impaired beta-cell function[J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(10):3004.
- [4] Sathananthan A, Man CD, Micheletto F, *et al.* Common genetic variation in GLP1R and insulin secretion in response to exogenous GLP-1 in nondiabetic subjects: a pilot study[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(9):2074-2076.
- [5] Chambliss AB, Resnick M, Petrides AK, *et al.* Rapid screening for targeted genetic variants via high-resolution melting curve analysis[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(4):507-516.
- [6] Howe R, Miron-Shatz T, Hanoch Y, *et al.* Personalized medicine through SNP testing for breast cancer risk: clinical implementation[J]. *J Genet Couns*, 2015, 24(5):

miR-497 和 miR-34a 在铂敏感和铂耐药卵巢上皮癌患者中的表达差异及机制研究

曹丽娟*, 刘文博(承德市中心医院妇产科, 河北承德 067000)

中图分类号 R737.31 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)17-2308-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.17.02

摘要 目的:探讨微小核糖核酸 miR-497 和 miR-34a 在铂敏感和铂耐药卵巢上皮癌(EOC)患者中表达的差异及机制。方法:选取 2008 年 1 月—2012 年 1 月于我院妇产科行卵巢癌分期手术或肿瘤细胞减灭术的 EOC 患者 72 例,术后均以铂类药物为基础的规范化疗,并进行随访(时间为 2008 年 7 月—2016 年 7 月)。根据患者对铂类药物的敏感性将其分为铂敏感组(42 例)和铂耐药组(30 例)。采用实时荧光定量聚合酶链反应法检测两组患者肿瘤组织中 miR-497 和 miR-34a 的表达水平,并考察其与患者总生存时间的相关性;采用巢式降落式甲基化特异性聚合酶链反应法检测患者 miR-497 和 miR-34a 启动子区 DNA 甲基化水平,采用蛋白印迹法考察组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸残基二甲甲基化(H3K9me2)水平,采用染色质免疫共沉淀法检测 miR-497 和 miR-34a 启动子区 H3K9me2 水平。结果:铂敏感组患者 miR-497 和 miR-34a 的表达水平均显著高于铂耐药组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);72 例患者的总生存期为(45.7 ± 17.5)个月,与其 miR-497 和 miR-34a 表达水平呈正相关(r^2 分别为 0.271 4、0.378 2, $P < 0.01$)。铂耐药组患者 miR-497 和 miR-34a 启动子区 DNA 甲基化水平均显著高于铂敏感组,且其启动子区 H3K9me2 水平也显著高于铂敏感组,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而铂耐药组患者 H3K9me2 水平虽略高于铂敏感组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:EOC 患者肿瘤组织中 miR-497 和 miR-34a 的表达水平与铂化疗的敏感性及其患者的生存时间有关,启动子区 DNA 甲基化和组蛋白甲基化可能是其表达变化的机制之一。

关键词 微小核糖核酸;miR-497;miR-34a;卵巢上皮癌;铂耐药;DNA 甲基化;组蛋白甲基化;启动子区

Expression Difference and Its Mechanisms of miR-497 and miR-34a in Platinum-sensitive and Platinum-resistant Epithelial Ovarian Carcinoma Patients

CAO Lijuan, LIU Wenbo (Dept. of Gynaecology and Obstetrics, Chengde Municipal Central Hospital, Hebei Chengde 067000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the expression difference and its mechanism of miR-497 and miR-34a in platinum-sensitive and platinum-resistant epithelial ovarian carcinoma (EOC) patients. METHODS: A total of 72 EOC patients underwent ovarian cancer staging surgery or cytoreductive surgery were selected from department of gynaecology and obstetrics of our hospital during Jan. 2008-Jan. 2012. They received standardized platinum chemotherapy after surgery and were followed up (during Jul.

744-751.

- [7] Rai AJ, Yee J, Fleisher M. Biomarkers in the era of personalized medicine: a multiplexed SNP assay using capillary electrophoresis for assessing drug metabolism capacity[J]. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 2010, doi: 10.3109/00365513.2010.493355.
- [8] Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics[J]. *Pharmacogenomics*, 2007, 8(6):597-608.
- [9] Poon KS, Liu TC, Tan KM, et al. One-step molecular detection of the MYD88 L265P mutation by unlabeled probe genotyping analysis[J]. *Mol Cell Probes*, 2015, 29(1):74-77.
- [10] Wu J, Zhou Y, Zhang CY, et al. Co-amplification at lower denaturation-temperature PCR combined with unlabeled-probe high-resolution melting to detect KRAS codon 12 and 13 mutations in plasma-circulating DNA of pancreatic adenocarcinoma cases[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(24):10647-10652.
- [11] Janavicius R, Matiukaite D, Jakubauskas A, et al. Microsatellite instability detection by high-resolution melting analysis[J]. *Clin Chem*, 2010, 56(11):1750-1757.
- [12] 罗森, 李立, 安伟. 多种检测目标下样本容量设计的比较[J]. *统计与决策*, 2013, 1(1):35-37.
- [13] Tindall EA, Petersen DC, Woodbridge P, et al. Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments[J]. *Hum Mutat*, 2009, 30(6):876-883.
- [14] Chen C, Li S, Lu X, et al. High resolution melting method to detect single nucleotide polymorphism of VKORC1 and CYP2C9[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(5):2558-2564.

(收稿日期:2016-08-08 修回日期:2017-02-07)

(编辑:张元媛)

* 副主任医师。研究方向:妇科肿瘤。电话:0314-2028107。E-mail:18603140900@wo.cn