

• 论 著 •

应用实时荧光定量 PCR 技术分析 UGT1A1 基因 启动子区 A(TA)_nTAA 多态性

徐羽中¹, 陈群蓉², 孙顺昌^{1△}, 彭运生¹

(广东省深圳市宝安区人民医院:1. 检验科;2. 输血科 518101)

摘要:目的 建立实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术检测尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶 1A1(UGT1A1)基因启动子区 A(TA)_nTAA 序列多态性的方法。方法 以 16 例 Gilbert 综合征患者和 66 例健康对照个体为研究对象,抽提基因组 DNA,通过 DNA 测序确定 UGT1A1 基因启动子区 A(TA)_nTAA 序列多态性。同时,设计 1 对引物和 2 条 TaqMan MGB 探针,2 条探针的 5'端分别标记 FAM 和 VIC 染料,探针的 3'端则均以 MGB 修饰。使用实时荧光定量 PCR 方法扩增并检测研究对象的 UGT1A1 基因启动子区 A(TA)_nTAA 多态性序列,与测序法比较,验证实时荧光定量 PCR 方法的灵敏度和特异度。结果 应用荧光定量 PCR 技术检测,16 例 Gilbert 综合征患者的 UGT1A1 基因启动子区 A(TA)_nTAA 多态性序列均为 A(TA)₇TAA,46 例健康对照个体 A(TA)_nTAA 多态性序列为 A(TA)₆TAA,其余 20 例健康对照个体 A(TA)_nTAA 多态性序列为 A(TA)₆TAA/A(TA)₇TAA 杂合多态性。上述结果与 DNA 测序结果完全一致。结论 通过实时荧光定量 PCR 技术检测 UGT1A1 基因启动子区 A(TA)_nTAA 序列多态性的方法具有灵敏度高、特异度强及操作简单等特点,可在临床推广应用。

关键词:UGT1A1 基因; 多态性; 实时荧光定量 PCR

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.13.023

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)13-1806-03

Analysis on A(TA)_nTAA polymorphism of UGT1A1 gene promoter by fluorescence real-time quantitative PCR

XU Yuzhong¹, CHEN Qunrong², SUN Shunchang^{1△}, PENG Yunsheng¹

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Blood Transfusion, Baoan District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518101, China.)

Abstract: **Objective** To develop a new method to detect A(TA)_nTAA polymorphism in the UGT1A1 gene promoter by fluorescence real-time quantitative PCR (RQ-PCR). **Methods** Genomic DNA was extracted from peripheral blood in 16 patients with Gilbert's syndrome and 66 healthy individuals. The polymorphic A(TA)_nTAA sequence in the UGT1A1 gene promoter was determined by DNA sequencing. A pair of primers and two TaqMan probes labeled with either 5' FAM or VIC reporter dye incorporated a 3' minor groove binder were designed. The A(TA)_nTAA polymorphisms in the UGT1A1 gene promoter were identified by RQ-PCR for all research subjects. The sensitivity and specificity of RQ-PCR for detecting the A(TA)_nTAA polymorphisms were verified by DNA sequencing method. **Results** The homozygous A(TA)₇TAA polymorphism was found in the promoter region of the UGT1A1 gene in all 16 patients with Gilbert's syndrome by using RQ-PCR. The homozygous A(TA)₆TAA polymorphism was found in 46 healthy subjects, while the heterozygous A(TA)₆TAA/A(TA)₇TAA polymorphism was found in other 20 healthy subjects. All A(TA)_nTAA polymorphisms in the promoter region of the UGT1A1 gene identified by RQ-PCR were consistent with that of DNA sequencing. **Conclusion** It is a sensitive, specific and simple method to detect the A(TA)_nTAA polymorphisms in the promoter region of the UGT1A1 gene by RQ-PCR, which can be promoted and applied in clinic.

Key words:UGT1A1 gene; polymorphism; fluorescence real-time quantitative PCR

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶 1A1(UGT1A1)是催化胆红素转变为葡萄糖醛酸胆红素的关键酶之一^[1]。UGT1A1 酶是 UGT1A1 基因的编码产物,UGT1A1 基因突变会导致血清胆红素升高,依据胆红素升高程度由低到高分别命名为 Gilbert 综合征(20~60 μmol/L)、I 型 Crigler-Najjar 综合征(>60~340 μmol/L)、II 型 Crigler-Najjar 综合征(>340 μmol/L)^[2]。Gilbert 综合征是以间歇性非溶血性黄疸为病理特征的良性遗传性疾病,患者血清胆红素轻度升高,其临床表现为长期间歇性黄疸^[3]。在 UGT1A1 基因启动子中存在 A(TA)_nTAA 微卫星多态性,其中(TA)重复拷贝数越多,UGT1A1 酶活性越低^[4]。A(TA)₆TAA 和 A(TA)₇TAA 是人群中两种常见多态性,非洲人群偶见 A(TA)₅TAA 多态性,高加索人群偶见 A(TA)₈TAA 多态性。在中国人群中仅发现 A(TA)₆TAA 和 A(TA)₇TAA 两种多态性序列^[5]。研究发现 A(TA)_nTAA 多

态性与伊立替康(irinotecan)、阿扎那韦(atazanavir)等药物的不良反应有关,群体遗传学研究还显示美国籍非洲人群中 A(TA)₇TAA 多态性与乳腺癌的易感性存在相关^[6]。因此,UGT1A1 基因启动子 A(TA)_nTAA 多态性检测在临床具有重要的意义。本研究将试图建立检测 A(TA)_nTAA 多态性的实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 10 月至 2013 年 4 月在本院就诊的 16 例 Gilbert 综合征患者,其中男 9 例,女 7 例,年龄 15~46 岁。Gilbert 综合征诊断依据包括临床表现、实验室检查及基因突变分析。诊断标准为临床出现间歇性非溶血性黄疸、升高的胆红素以游离胆红素为主、排除肝胆疾病、排除溶血因素、检测到 UGT1A1 基因突变。选择同期健康体检的 66 例健康者,其中男 36 例,女 30 例,年龄 18~56 岁。所有研究对象的

UGT1A1 基因启动子中 A(TA)₇TAA 多态性序列通过 PCR 扩增并测序确定,具体方法见文献[7]。本研究经过医院伦理委员会批准,所有研究对象均被告知研究内容,并同意参与本研究。研究对象的基因组 DNA 为-30 ℃冰箱保存的经苯酚-氯仿抽提制备的基因组 DNA。

1.2 方法

1.2.1 仪器 实时荧光定量 PCR 仪为 LightCycler 480 II 扩增仪(瑞士罗氏诊断公司制造)。

1.2.2 引物及探针设计 在 UGT1A1 基因(GenBank NM_000463.2)启动子区及外显子 1 上设计 1 对引物,扩增基因的启动子区及外显子 1 的部分序列。上游引物序列为 5'-CAT TAA CTT GGT GTA TCG ATT GGT-3',下游引物序列为 5'-AGC AGG CCC AGG ACA AGT-3'。与 A(TA)₆TAA 序列杂交的探针 1 序列为 FAM-TTG CCA TAT ATA TAT ATA TAA GTA GGA-MGB,与 A(TA)₇TAA 序列杂交的探针 2 序列为 VIC-TGC CAT ATA TAT ATA TAT ATA AGT AGG A-MGB,其中 FAM 与 VIC 为荧光染料,探针 3' 端以小沟聚合物(MGB)修饰。引物合成、探针合成及修饰均由上海基康生物技术有限公司完成。扩增片段长度为 132 bp [A(TA)₆TAA]或 134 bp[A(TA)₇TAA]。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 PCR 反应在 96 孔反应板中进行,反应总体积为 50 μL。反应体系含 75 mmol/L Tris-HCl (pH8.8)、20 mmol/L (NH₄)₂SO₄、0.01%吐温 20、3.0 mmol/L MgCl₂、0.5 mmol/L dNTPs、0.2 μmol/L 引物/条、0.2 μmol/L 探针/条、0.4 U Taq DNA 聚合酶、100 ng 基因组 DNA。PCR 扩增程序为首先 95 ℃变性 5 min,然后进入 40 个扩增循环,每一循环包括 95 ℃变性 15 s,60 ℃杂交 1 min,荧光采集模式设为 60 ℃单点采集。结果分析模式为终点基因分型,X 轴为 FAM 荧光强度,Y 轴为 VIC 荧光强度。

1.2.4 方法学评价 读取实时荧光定量 PCR 检测的 A(TA)_nTAA 多态性结果,并与以前的测序结果进行比较,探讨实时荧光定量 PCR 检测 A(TA)_nTAA 多态性的灵敏度和特异度。

2 结 果

2.1 实时荧光定量 PCR 技术能检测分型 A(TA)_nTAA 多态性 通过实时荧光定量 PCR 技术,本研究标本全部成功扩增。终点基因分型法显示,16 例 Gilbert 综合征患者的 UGT1A1 基因启动子区 A(TA)_nTAA 多态性序列均为 A(TA)₇TAA,46 例健康者 A(TA)_nTAA 多态性序列为 A(TA)₆TAA,其余 20 例健康者 A(TA)_nTAA 多态性序列为 A(TA)₆TAA/A(TA)₇TAA 杂合多态性序列。实时荧光定量 PCR 技术能分型全部个体 UGT1A1 基因启动子区的 A(TA)_nTAA 多态性序列。

2.2 实时荧光定量 PCR 技术分型 A(TA)_nTAA 多态性具有高的灵敏度和特异度 通过实时荧光定量 PCR 技术,16 例 Gilbert 综合征患者和 66 例健康者 UGT1A1 基因启动子区 A(TA)_nTAA 多态性序列均被成功检测,与测序一致,检测灵敏度达 100%。通过与测序结果比较,实时荧光定量 PCR 技术分型检测 UGT1A1 基因启动子区 A(TA)_nTAA 序列多态性的结果与 DNA 测序结果完全相符,且 3 种基因型散点图分布在 3 个明显不同区域,每一区域的点较为集中,因此实时荧光定量 PCR 技术分型检测 A(TA)_nTAA 多态性的特异度达 100%。

3 讨 论

在 UGT1A1 基因启动子中存在 A(TA)_nTAA 微卫星多

态性,基因中 TA 重复序列拷贝数越多,UGT1A1 酶活性越低,研究显示 TA 重复序列每增加 1 个拷贝,UGT1A1 酶活性就降低 30%^[8]。伊立替康、氟尿嘧啶与亚叶酸联合用药是目前临床治疗转移性结肠癌、直肠癌的一线药物,伊立替康在治疗过程中有时会出现骨髓抑制和迟发性腹泻等不良反应,这些不良反应与个体 UGT1A1 基因启动子中 A(TA)_nTAA 多态性存在相关^[9]。研究显示 UGT1A1 基因启动子中携带 (TA)₇TAA 的个体比携带 (TA)₆TAA 个体更能耐受阿扎那韦治疗导致的黄疸^[10]。群体遗传学研究显示在美国籍非洲人群中,UGT1A1 基因启动子中携带 A(TA)₇TAA 多态性序列个体的乳腺癌易感性增加^[11]。因此 UGT1A1 基因启动子中 A(TA)_nTAA 多态性检测在临床具有重要意义。

A(TA)_nTAA 多态性属于短串联重复序列(STR),传统检测方法有单链构像多态性分析、变性梯度凝胶电泳、毛细管电泳、变性高效液相色谱等^[12]。这些检测技术各有自身的特点,但也存在一些缺陷,如检出率不高、假阳性率高、检测通量低、实验技术要求高、实验时间较长、检测成本高等,因此难以用于临床检测。微卫星多态性检测新方法有侵入探针分析法和高分辨率熔解曲线分析法。侵入探针分析法是一种等温的定性或定量检测技术,操作简单,但灵敏度较低^[13]。高分辨率熔解曲线分析是一种高效稳定的 PCR 检测技术,操作简便快速,成本低,已广泛应用于检测单核苷酸多态性,但它检测微卫星多态性分辨率不高^[14]。

TaqMan 探针技术已成为一种经典的定量 PCR 技术,特异度强,灵敏度高,既可用于定量分析,又可用于定性检测^[15]。TaqMan 探针技术检测关键在于合成探针及引物,这给检测特定定位点序列变异、微卫星多态性序列变异带来困难。在中国人群中 UGT1A1 基因启动子区 A(TA)_nTAA 多态性序列包括 A(TA)₆TAA 和 A(TA)₇TAA,用 TaqMan 探针技术区分它们需设计一对引物和两条探针,且探针覆盖 A(TA)_nTAA 序列。本研究首先设计与 A(TA)₇TAA 序列杂交的探针 2:5'-TGC CAT ATA TAT ATA TAT ATA AGT AGG A-3',为了使 2 条探针的退火基本一致,设计与 A(TA)₆TAA 序列杂交的探针 1 时,本研究在探针的 5'端延伸了一个 T 碱基,因此探针 1 为 5'-FAM-TTG CCA TAT ATA TAT ATA TAA GTA GGA-MGB-3'。普通荧光定量 PCR TaqMan 探针的 T_m 一般需高于引物的 T_m 值 10 ℃左右,若目标区域(A+T)%含量高,往往达不到 10 ℃左右 T_m 差值的要求^[16]。若延长探针长度,又难以区分 A(TA)₆TAA 和 A(TA)₇TAA 序列,3' 端标记 MGB 可提高探针的 T_m 值,故本研究的探针 3' 端以 MGB 标记。两条探针的 5' 端依据一般实进荧光定量 PCR 仪激发波长范围分别标记荧光染料 FAM 与 VIC。本研究关键在于成功设计了扩增 UGT1A1 基因启动子区 A(TA)_nTAA 多态性序列的探针及引物,并在探针 3'端使用 MGB 修饰,使探针尤其适合检测富含 AT 重复序列。目前临床检测病原性微生物的基因扩增技术基本都采用了实时荧光定量 PCR 技术,并且同一厂家的大多数试剂盒共用一个检测程序,极大简化了临床检测。本研究使用实时荧光定量 PCR 技术检测 A(TA)_nTAA 多态性,可与病原性微生物基因检测同步进行,检测方便,具有临床应用价值。

参考文献

- [1] Sato H, Uchida T, Toyota K, et al. Association of neonatal hyperbilirubinemia in breast-fed infants with UGT1A1 or