

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.14.009

文章编号: 1005-8982(2017)14-0044-04

临床研究·论著

高分辨率熔解曲线分析技术检测 *MASP-2* 基因点突变方法的建立及评价*

贾晓晖¹, 阎敏娜², 贾天军¹, 程永婷¹, 张斌²

(1.河北北方学院 医学检验学院,河北 张家口 075000;2.河北北方学院 附属第一医院 检验科,河北 张家口 075000)

摘要:目的 建立高分辨率熔解曲线(HRM)分析技术检测人甘露糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶-2(*MASP-2*)基因 g.21370(G>T)位点单核苷酸多态性(SNP)的方法并进行评价。**方法** 通过测序获得 *MASP-2* 基因 g.21370(G>T)位点 3 种不同基因型对照品,并用其建立 HRM 技术检测 *MASP-2* 基因点突变方法。利用 60 份待测 DNA 样品对建立的 HRM 方法的准确性、重复性及稳定性进行评价。**结果** 建立的 *MASP-2* 基因 HRM 分析方法扩增反应正常,G/G、G/T、T/T 3 种基因型区分明显,扩增产物 Melt 曲线良好,无非特异性产物出现;与基因序列测定结果对比显示准确性良好;对野生型和突变型标本 3 次重复检测结果显示,Tm 值变异系数为 0.017 和 0.023; χ^2 检验结果表明,本研究选取的随机体检人群 *MASP-2* 基因 g.21370(G>T)位点基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡。**结论** 建立的 *MASP-2* 基因 g.21370(G>T)位点 HRM 检测方法准确性高、重复性及稳定性良好,为下一步临床分析 *MASP-2* 基因 SNP 提供一定的技术支持。

关键词: 高分辨率熔解曲线;甘露糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶-2;基因型;单核苷酸多态性

中图分类号: R346

文献标识码: A

Establishment and evaluation of detecting *MASP-2* mutations by high-resolution melting analysis*

Xiao-hui Jia¹, Min-na Yan², Tian-jun Jia¹, Yong-ting Cheng¹, Bin Zhang²

(1. College of Laboratory Medicine, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China; 2. Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

Abstract: Objective To establish a method for detection of mannose-binding lectin associated serine protease-2 (*MASP-2*) mutations by high-resolution melting (HRM) analysis and to evaluate its effect. **Methods** Three different genotype reference substances of *MASP-2* gene g.21370 (G>T) site were acquired by sequencing, and were used for establishment of HRM. Sixty DNA samples were used to evaluate the accuracy, repeatability and stability of this method. **Results** The amplification of *MASP-2* gene analyzed by the HRM method was normal, three genotypes (G/G, G/T and T/T) were distinguished clearly, and the melting curves of the amplification products were good. The HRM analysis results were identical to the results of DNA sequencing. Repeated analyses showed that the coefficients of variance of Tm value were very small (0.017 and 0.023). χ^2 test showed that the distribution of genotype frequency of *MASP-2* gene g.21370 (G>T) site in the selected population was accorded with Hardy-Weinberg genetic equilibrium. **Conclusions** The HRM method has high accuracy, good repeatability and stability for detection of *MASP-2* gene g.21370 (G>T) mutations, which

收稿日期:2016-04-12

* 基金项目:河北省张家口市科学技术研究与发展计划(No:1421109D)

[通信作者] 贾天军, E-mail: tjjia1968@sohu.com; Tel: 18931316365

provides certain technical support for the clinical analysis of MASP-2 gene SNP in the next step.

Keywords: high-resolution melting; mannose-binding lectin associated serine protease-2; genotype; single nucleotide polymorphism

人甘露糖结合凝集素(mannose-binding lectin, MBL)相关丝氨酸蛋白酶-2(mannan-associated serine protease 2, MASP-2)是天然免疫系统中的重要组分,属丝氨酸蛋白酶家族,可参与免疫调理,与多种感染性疾病、自身免疫性疾病及肿瘤等相关^[1-3]。MASP-2 基因中单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点的存在会改变血清中 MASP-2 蛋白含量,对机体补体凝集素途径产生影响,进而导致对不同疾病的易感性发生变化^[4]。MASP-2 基因 g.21370(G>T)位点(rs12711521)存在 SNP,可导致 MASP-2 蛋白第 371 位氨基酸由天冬氨酸改变为酪氨酸。有研究表明,该位点突变可增加 HCV 易感性,且与血清中 MASP-2 含量升高有关^[5]。还有文献报道,该位点突变与类风湿性疾病有关^[6]。本研究选取该 SNP 位点作为研究对象,试图建立高分辨率熔解曲线(high-resolution melting, HRM)分析该位点的方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

QIAGEN Rotor gene Q 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪(德国 Qiagen 公司),SAM4000 超微量紫外分光光度计(美国 Mreinton 公司)。HRM 试剂盒购于德国 Qiagen 公司, DNA 提取试剂盒购于中国天根生物化学科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 应用全血 DNA 提取试剂盒,提取 2015 年 6 月-2015 年 10 月在河北北方学院附属第一医院体检科检查的 60 例体检者血细胞 DNA,并应用 SMA4000 超微量紫外可见分光光度计测定基因组 DNA 纯度及浓度,备用。

1.2.2 HRM 引物设计 针对 MASP-2 基因 g.21370(G>T)突变情况,应用 Primer 3 软件设计 HRM 引物,用于区分该位点 3 种不同基因型。引物设计原则遵循 HRM 技术要点要求,引物序列如下, P1:5'-CCCTC CCATGCTTCTTTCTTAGT-3'(Tm=60.05℃, GC 含量=47.83%); P2:5'-ATGTACTCCACTCGGCCACT-3'(Tm=60.61℃, GC 含量=55%),预期产物长度为 74 bp。

1.2.3 HRM 方法的建立 首先对本实验室保存的随机人群的 DNA 样本进行测序,获得 3 种基因型(野生型 GG、杂合型 GT、突变纯合型 TT)对照品,并应用对照品进行 HRM 方法的建立。HRM 扩增及分析检测均由 QIAGEN Rotor Gene Q 仪器一步完成。反应体系为 20 μl,包括 2 × HRM PCR Master Mix 10 μl, P1 1.4 μl, P2 1.4 μl, 基因组 DNA(1~50)ng, 用 RNase-free Water 补齐至 20 μl。扩增参数使用两步法,具体为:95℃预变性 5 min, 95℃变性 10 s, 55℃退火 30 s, 共 40 个循环。扩增结束后直接进入 HRM 分析, 熔解温度 73~85℃, 温度上升速率为 0.1℃/2 s。

1.2.4 准确性评价方法 为评价 HRM 方法的准确性,将 60 份待测 DNA 样品在 3 周内分 3 批使用已经建立的 HRM 方法进行基因型分析。并从 HRM 检测的每种基因型样品中,选择一定比例具有代表性的样品进行直接测序,并由第 3 方对 HRM 分析和测序 2 种方法所得的结果进行对比。

1.2.5 重复性和稳定性评价方法 为排除单次实验的随机误差,取一定数量经测序法验证的野生型 GG 和突变纯合型 TT 标本,进行 3 次 HRM 重复检测,记录并计算不同基因型标本 Tm 值的变异系数(coefficient of variation, CV)值。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件,计算 MASP-2 基因型纯合子熔解 Tm 的变异系数,判定 HRM 方法重复性及稳定性。通过 χ^2 检验判断所选取的随机群体样本 MASP-2 基因 g.21370(G>T)位点等位基因频率和基因型频率分布是否符合 Hardy-Weniberg 平衡, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HRM 方法建立情况

扩增反应正常, G/G、G/T、T/T 3 种基因型区分明显,扩增产物 Melt 曲线良好,无非特异性产物出现。见图 1。

2.2 HRM 方法的准确性

3 周内分 3 次对 60 例标本行 HRM 检测。结果显示,其中 11.667%(7/60)为野生型 G/G, 33.333%

(20/60)为杂合型 G/T, 55.000% (33/60)为突变纯合型 T/T。选取 HRM 结果中具有代表性的 10 例杂合型、10 例突变纯合型和所有 7 例野生型标本送由北京博奥生物科技有限公司进行测序。将 HRM 检测结果与测序结果进行比对, 显示完全相符, 证明 HRM 方法能够准确区分 MASP-2 基因 g.21370(G>T)位点 3 种不同基因型。见图 2。

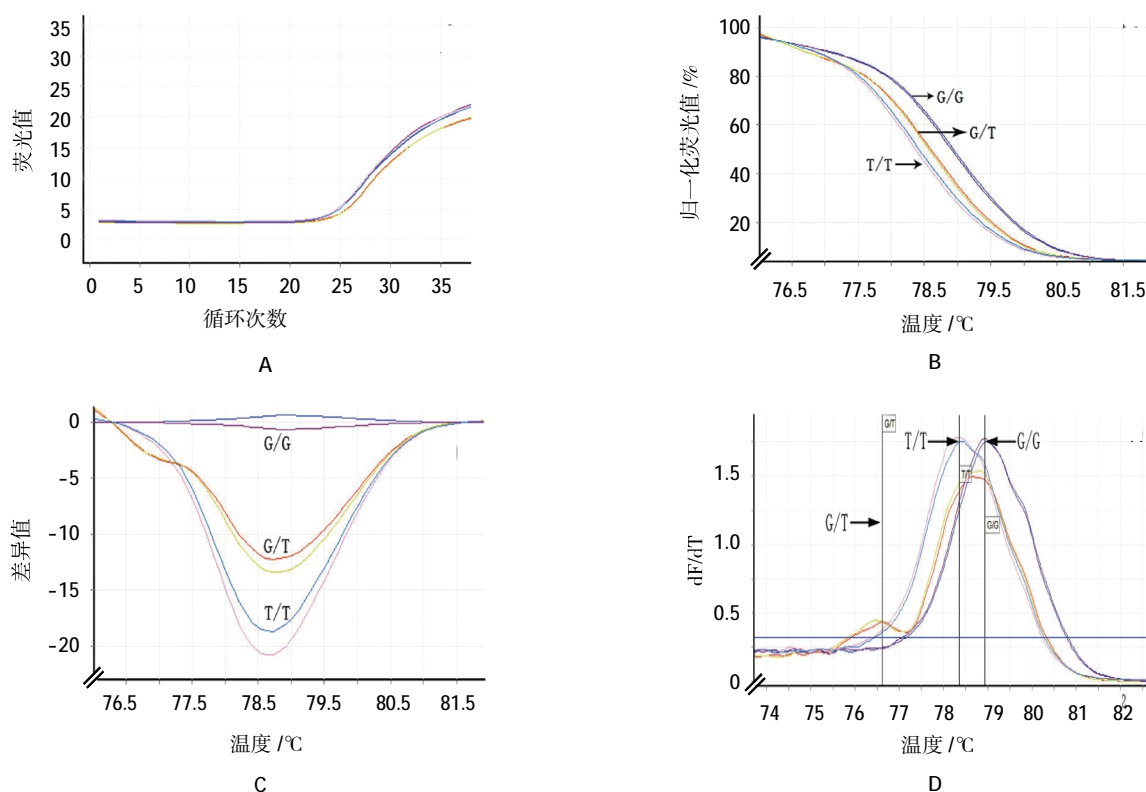
2.3 HRM 方法的重复性和稳定性

对野生型和突变型标本使用 HRM 方法进行 3 次重复检测。结果显示, 其 Tm 值的 CV 值较小, 表明 HRM 方法重复性和稳定性良好。CV 值分别为

0.017%和 0.023%。

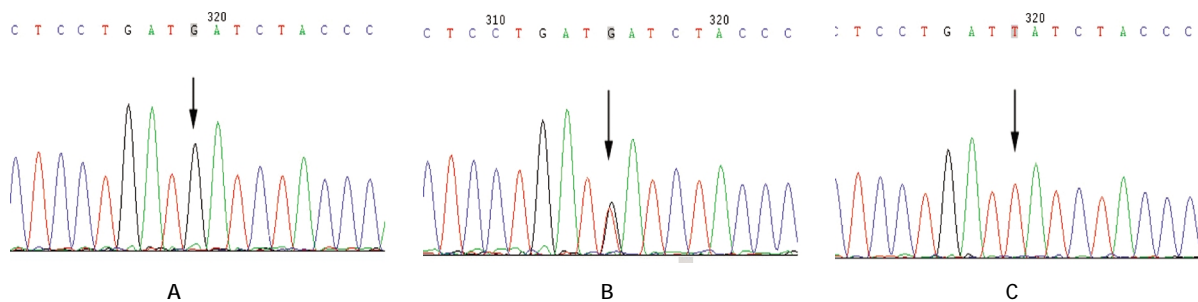
2.4 Hardy-Weinberg 遗传平衡分析

根据 Hardy-Weinberg 遗传平衡公式: $(p+q)^2=p^2+2pq+q^2=1$ 计算 MASP-2 基因 g.21370G>T 位点等位基因频率。MASP-2 G 等位基因频率: $p=(2 \times 7+20)/120=0.283$; MASP-2 T 等位基因频率: $q=(2 \times 33+20)/120=0.717$ 。计算结果显示, 实际值与理论值比较, 经 χ^2 检验, 差异无统计学意义 ($\chi^2=1.943, P=0.431$), 认为本研究选取的随机体检人群 MASP-2 基因 g.21370(G>T)位点基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡。见附表。



A: 扩增结果; B: 标准化视图结果; C: 差异化视图结果; D: 扩增产物 Melt 分析结果

图 1 HRM 方法建立结果



A: 野生型 G/G; B: 杂合型 G/T; C: 突变纯合型 T/T。箭头所示为 g.21370(G>T)位点

图 2 MASP-2 基因 g.21370(>T)位点不同基因型测序结果

附表 MASP-2 基因不同基因型实际值与理论值的比较

[n=60,例(%)]

组别	G/G	G/T	T/T
实际值	7(11.667)	20(33.333)	33(55.000)
理论值	4.800(8.000)	24.360(40.600)	30.840(51.400)

3 讨论

随着分子生物技术的快速发展,人类对疾病发病机制的研究不断深入到分子水平,希望可以通过测定基因组内某些 DNA 碱基变异来对疾病进行诊断和预防,并帮助与推行个体化药物治疗^[1]。目前临床上进行基因突变的检测多采用测序法,该方法过程较繁琐、耗时长,且对取材和操作技术要求较高,临床推广难度较大。

MASP-2 基因 SNP 位点的存在可引起不同类型疾病患者血清中 MASP-2 蛋白含量改变,可能与疾病的发生、发展有关^[2]。寻找并建立新的 MASP-2 基因 SNP 的临床检测方法对疾病的防治有一定的临床意义。

HRM 分析技术是近几年来兴起的 SNP 及突变分析方法,操作简便、快速,成本较低,且为闭管操作,降低污染风险,提高检测准确性,受到广泛关注^[3]。在扩增含有突变位点的目的基因时,由于基因突变位点的不同导致解链温度有差异,通过观察双链 DNA 释放荧光染料的时间曲线及荧光强度上是否出现差异,就可以判别出是否存在突变位点。再与标准基因型样本进行比较,即可以完成对未知样品各种基因型的进行判定。

本研究结果显示,建立的 MASP-2 基因 HRM 分析方法扩增反应正常,能够很好的区分 3 种基因型,与基因序列测定结果比较显示准确性也良好。对野生型和突变型标本 3 次重复检测结果显示, Tm 值变异系数均较低,证明建立的 HRM 分析方法重复性和稳定性良好。χ² 检验结果显示,本研究选取的随机

体检人群 MASP-2 基因 g.21370(G>T)位点基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡,所选研究对象具有该地区人群的代表性。基因型频率分析从另一方面证实 HRM 方法准确性良好。总之,本研究利用 HRM 技术建立一种新的快速、准确分析 MASP-2 基因 g.21370(G>T)位点基因型的方法,为下一步分析不同疾病类型患者 MASP-2 基因 SNP 提供一定的技术支持。

参 考 文 献:

- [1] 张海燕. MASP2 与肿瘤相关性的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2015, 31(9): 812-815.
- [2] JENNY L, AJJAN R, KING R, et al. Plasma levels of mannan-binding lectin-associated serine proteases MASP-1 and MASP-2 are elevated in type 1 diabetes and correlate with glycaemic control[J]. Clin Exp Immunol, 2015, 180(2): 227-232.
- [3] CHEN M, LIANG Y, LI W, et al. Impact of MBL and MASP-2 gene polymorphism and its interaction on susceptibility to tuberculosis[J]. BMC Infect Dis, 2015, 15: 151.
- [4] WU J, BAI J Y, LI L, et al. Genetic polymorphisms of the BMAP-28 and MASP-2 genes and their correlation with the somatic cell score in Chinese holstein cattle[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(1): 1-8.
- [5] TULLIO S, FAUCZ F R, WERNECK R I, et al. MASP2 gene polymorphism is associated with susceptibility to hepatitis C virus infection[J]. Hum Immunol, 2011, 72(10): 912-915.
- [6] GOELDNER I, SKARE T, BOLDT A B, et al. Association of MASP-2 levels and MASP2 gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in patients and their relatives[J]. PLoS One, 2014, 9(3), DOI: 10.1371/journal.pone.0090979.
- [7] 李静, 顾江. 个体化医疗和大数据时代的机遇和挑战[J]. 医学与哲学, 2014, 35(1): 5-10.
- [8] CATARINO S J, BOLDT A B, BELTRAME M H, et al. Association of MASP2 polymorphisms and protein levels with rheumatic fever and rheumatic heart disease[J]. Hum Immunol, 2014, 75(12): 1197-1202.
- [9] TONG S Y, GIFFARD P M. Microbiological applications of high-resolution melting analysis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(11): 3418-3421.

(童颖丹 编辑)