

建立高分辨率熔解曲线法检测白癜风患者 *TNF- α* rs1800629 基因多态性

赵宗峰, 吴秀娟, 吴卫东, 普雄明, 康晓静

新疆维吾尔自治区人民医院, 新疆 乌鲁木齐 830001

摘要: 目的 探讨高分辨率熔解曲线法用于检测新疆维吾尔族白癜风患者肿瘤坏死因子 α rs1800629 基因多态性的可行性。方法 应用高分辨率熔解曲线法检测 100 例新疆维吾尔族白癜风患者肿瘤坏死因子 α 基因启动子区 rs1800629 位点多态性, 并与 PCR 产物直接测序法得到的结果进行比较分析。结果 HRM 法检测 rs1800629 位点多态性的灵敏度可以达到 5%, HRM 分型结果与 PCR 产物直接测序法结果相同, 二者符合率 100%。结论 HRM 法具有比较好的灵敏度与准确性, 是一种快速、简便、高通量检测白癜风患者 *TNF- α* 基因多态性的优选方法。

关键词: 白癜风; 单核苷酸多态性; 肿瘤坏死因子 α ; 高分辨率熔解曲线

中图分类号: R758.4⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2016)11-1302-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.11.008

Development of high resolution melting assay for detecting single nucleotide polymorphism of *TNF- α* rs 1800629 in patients with vitiligo

ZHAO Zong-feng, WU Xiu-juan, WU Wei-dong, PU Xiong-ming, KANG Xiao-jing

The People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang 830001, China

Corresponding author: WU Xiu-juan, E-mail: xjwuxj@sina.com

Abstract: **Objective** To explore the practicability of detecting the single nucleotide polymorphism (SNP) of tumor necrosis factor- α (*TNF- α*) rs1800629 in Uygur patients with vitiligo by high resolution melting (HRM) assay. **Methods** HRM assay was employed to detect the SNP of rs1800629 site in promoter region of *TNF- α* in 100 Uygur patients with vitiligo, and the detection results were analyzed and compared with the direct sequencing results of polymerase chain reaction (PCR) products.

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2015211C215)

作者简介: 赵宗峰(1980-), 男, 河北唐山人, 满族, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 皮肤病与基因。

通讯作者: 吴秀娟, E-mail: xjwuxj@sina.com。

参考文献

- [1] Graff FS, Griffin ML, Weiss RD. Predictors of dropout from group therapy among patients with bipolar and substance use disorders[J]. Drug Alcohol Depend, 2008, 94(3): 272-275.
- [2] Shaltiel G, Maeng S, Malkesman O, et al. Evidence for the involvement of the kainate receptor subunit *GluR6* (*GRIK2*) in mediating behavioral displays related to behavioral symptoms of mania [J]. Mol Psychiatry, 2008, 13(9): 858-872.
- [3] Rehm J, Room R, van den Brink W, et al. Alcohol use disorders in EU countries and Norway: an overview of the epidemiology[J]. Eur Neuro-psychopharmacol, 2005, 15(4): 377-388.
- [4] Shimizu E, Tang Y, Rampon, et al. NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation [J]. Science, 2000, 289(5494): 1170-1174.
- [5] 汪作为, 刘人申, 张少平, 等. 精神分裂症及攻击行为与离子型谷氨酸受体-6 基因多态性关联研究[J]. 中国行为医学科学, 2006, 15(2): 104-106.
- [6] 田媛媛, 梁黎, 于晓东, 等. *GluR-6* 和 *GABRG2* 基因多态性与精神分裂症患者精神症状的关系[J]. 精神医学杂志, 2009, 22(2): 122-125.
- [7] 邹韶红, 赵宗峰, 徐向东, 等. 新疆汉族乙醇依赖患者家庭暴力行为与谷氨酸受体 6 基因多态性关联分析[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(11): 910-912.
- [8] Caspi A, McClay J, Moffitt TE, et al. Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children [J]. Science, 2002, 297(5582): 851-854.
- [9] 邹韶红, 赵宗峰, 徐向东, 等. 单胺氧化酶 *Ars1137070* 基因多态性与儿童期受虐在新疆酒精依赖患者家庭暴力发生中的交互作用[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2014, 40(10): 580-584.
- [10] Ansorge MS, Zhou M, Lira A, et al. Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice [J]. Science, 2004, 306(7): 879-881.
- [11] Murgatroyd C, Patchev AV, Wu YH, et al. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress [J]. Nat Neurosci, 2009, 12(12): 1559-1566.
- [12] Jukka S, Alasaari, Markus Lagus, et al. Environmental stress affects DNA methylation of a CpG rich promoter region of serotonin transporter gene in a nurse cohort [J]. PLoS One, 2012, 7(9): 1-7.

收稿日期: 2016-04-28

Results The sensitivity of rs1800629 SNP could reach 5% by HRM assay. The results of HRM assay were consistent with those of the direct sequencing of PCR products, with the coincidence rate of 100%. **Conclusions** HRM assay has a high sensitivity and accuracy, and it is a rapid, simple, high-throughput and optimal method for the detection of *TNF- α* SNP in patients with vitiligo.

Key words: Vitiligo; Single nucleotide polymorphism; Tumor necrosis factor- α ; High resolution melting curve

白癜风是一种常见的,由于皮肤黑素细胞减少或功能消失引起的,后天局限性或泛发性皮肤色素脱失病,该病影响了世界上 0.2%~1%的人口^[1]。在国内,白癜风的发病率为 1%~2%^[2]。该病的发病机理目前仍不十分清楚。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*) 是一种多功能的促炎细胞因子,相关研究显示,*TNF- α* 在白癜风发病过程中扮演重要角色^[3],寻常型白癜风患者血清 *TNF- α* 水平显著高于健康人群,两者表达水平呈正相关^[4],病情达到进展期时,呈现最高值^[5]。定位于 *TNF- α* 启动子区转录起始位点上游 308 位置的单核苷酸多态性位点 (rs1800629) 影响到了转录因子激活蛋白 2 结合部位的一段共有序列,其单一碱基替换 G/A 就可以直接影响 *TNF- α* 的表达^[6]。但是,目前国内仍未见关于白癜风与 rs1800629 位点多态性的相关报道。

自 2006 年世界上第一台高分辨率熔解 (high resolution melting, HRM) 仪器 HR-1 面世以来,高分辨率熔解曲线法已在国内外使用近 10 年时间,目前国外使用该方法已比较普遍,该方法被用于菌种鉴定^[7]、疾病筛查^[8]、突变^[9-10] 及单核苷酸多态性扫描^[11]、DNA 甲基化检测^[12] 等各个方面。但是在国内,该方法应用仍不多见。本研究应用高分辨率熔解曲线法检测 100 例新疆维吾尔族白癜风患者血液样本中的 *TNF- α* 基因 rs1800629 位点多态性,并与 PCR 产物直接测序法得到的结果进行比较分析,希望对 HRM 法快速检测该位点多态性的准确性及敏感性进行评估,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象 100 例诊断明确的新疆维吾尔族白癜风患者血液样本来自于新疆维吾尔自治区人民医院皮肤性病科 2012 年 5 月-2013 年 1 月确诊的白癜风患者,按照白癜风的诊疗标准 (2010 年版)^[13] 由两位皮肤科医生进行,并排除其他可能导致色素减退的疾病如花斑癣、贫血痣、斑驳病、白化病、单纯糠疹、老年性白斑等,全部患者未合并其它疾病。男 46 例,女 54 例,年龄 1~69 岁,平均年龄 (25.57 \pm 16.77) 岁,病程 1 个月~33 年。发病年龄 \leq 12 岁 24 例 (儿童组),发病年龄 $>$

12 岁 76 例 (成人组);有家族史患者 14 例,无家族史患者 86 例;全部入组对象及家属对本研究知情同意,并签署知情同意书。本研究通过院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 全血基因组 DNA 的提取、浓度测定并标准化 采集每例受试者肘静脉外周血 1 ml,用全血基因组 DNA 提取试剂盒提取核酸,DNA 提取使用天根生化 TIANamp 血液基因组 DNA 提取试剂盒抽提,所得 DNA 放入-80℃冰箱中保存备用。qRT-PCR 之前,DNA 经 NanoDrop Lite 超微量分光光度计确定浓度后标准化模板浓度至 20 ng/ μ l 进行 HRM 分析。

1.2.2 HRM 根据 Genebank 公开发表的人 *TNF- α* 基因序列,采用在线软件 primer3 input 设计只包含 rs1800629 位点一个单核苷酸多态性的扩增引物,上游引物为 5'-GAAATGGAGGCAATAGGTT-3',下游引物为 5'-TTCTGGGCCACTGACTGA-3'。引物由北京鼎国生物技术工程有限公司合成。qRT-PCR 反应体系采用 Type-it HRM PCR Kit (Qiagen),反应体系包括 Master Mix 4 μ l,上下游引物各 0.4 μ l,基因组 DNA 1 μ l,加 ddH₂O 至 10 μ l,qRT-PCR 在 RQ-5 plex HRM 实时荧光定量 PCR 仪 (Qiagen) 上完成。反应条件为 95℃预变性 5 min,进入循环,95℃变性 10 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 10 s,并采集荧光,45 个循环。qRT-PCR 后继续进行高分辨率熔解收集数据,范围 70℃~85℃,每次升温 0.1℃,维持 2 s,HRM 通道自动采集数据并自动执行增益校正。应用 Rotor-Gene Q Series Software 软件进行数据分析,对样本进行分型,并根据熔解顺序确定基因型。

1.2.3 HRM 敏感度试验 将标准化至 20 ng/ μ l 的 GG 基因型和 AA 基因型模板按不同比例混合,使得样本中 AA 基因型所占比例分别为 0%、5%、10%、20%、50%、80%、90%、95%、100%,以混合模板用于 HRM 分析。为了便于观察,将敏感度实验以 50% 为界分两组进行,每组检测 6 个梯度。

1.2.4 PCR 产物直接测序法检测 根据 Genebank 公开发表的人 *TNF- α* 基因序列,采用在线软件 primer3 input 设计包含 rs1800629 位点的 *TNF- α* 基因长片段扩增引物,上游引物为 5'-AGGCAATAGGTTTT-

GAGGGGCAT -3', 下游引物为 5' - GAGCGTCTGCT-GGCTGGTG-3'。引物由北京鼎国生物技术工程有限公司合成。PCR 反应总体积为 40 μ l, 反应液为: 10 \times buffer (含 Mg^{2+} , 20 μ M/ μ l) 4 μ l, dNTP (10 μ M/ μ l) 1 μ l, TaqDNA 聚合酶 (2 U/ μ l) 1 μ l, 模板 DNA 1 μ l, 上下游引物各 1 μ l (10 μ M/ μ l), 加 ddH₂O 至 40 μ l, 在 PTC-100 PCR 扩增仪上扩增。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 进入循环, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 64 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。反应结束后取 5 μ l 扩增产物于 1 \times TAE 缓冲液中用 1% 琼脂糖凝胶电泳 20 min (恒压 150 V), 电泳结果在

凝胶成像系统下拍照并保存。扩增产物由北京鼎国生物技术工程有限公司进行目的片段测序, 结果返回后对相应位点分型并记录。

2 结果

2.1 HRM 敏感度试验 两组 HRM 法各检测 6 份不同比例的混合模板, 均可检测出仅含有 5% 不同基因型混合模板样本中的差异, 显示 HRM 法检测 rs1800629 位点多态性的灵敏度可以达到 5%。两种基因型各占 50% 时, 杂合程度最高, 则最先熔解, 杂合程度越低, 则溶解温度越高。见图 1、图 2。

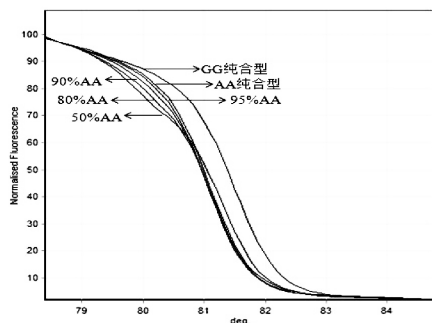


图 1 50%~95%AA 模板溶解曲线图

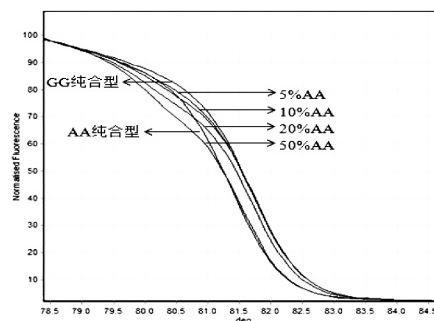


图 2 5%~50%AA 模板溶解曲线图

2.2 两种方法检测白癜风患者 rs1800629 位点多态性结果比较 HRM 结果显示, 在 100 例新疆维吾尔族白癜风患者血液样本中检出 GG 纯合型 54 例, AA 纯合型 7 例, AG 杂合型 39 例。AG 杂合型最先熔解, AA

纯合型次之, GG 纯合型最后熔解, 见图 3、图 4。经 PCR 产物直接测序法对全部标本进行进一步测序验证, 检验结果与 HRM 分型结果相同, 二者符合率 100%, HRM 分析具有比较好的准确性, 见图 5。

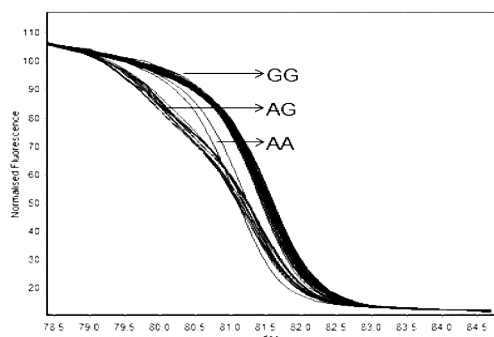


图 3 正常溶解曲线图

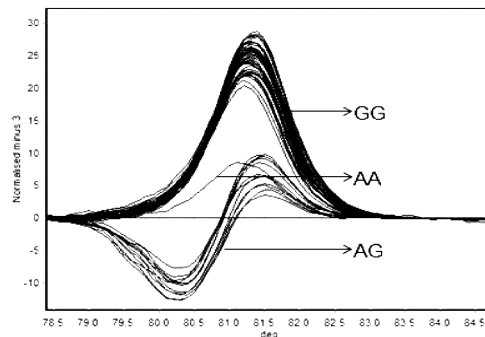


图 4 以 AA 为基线的相对溶解曲线图

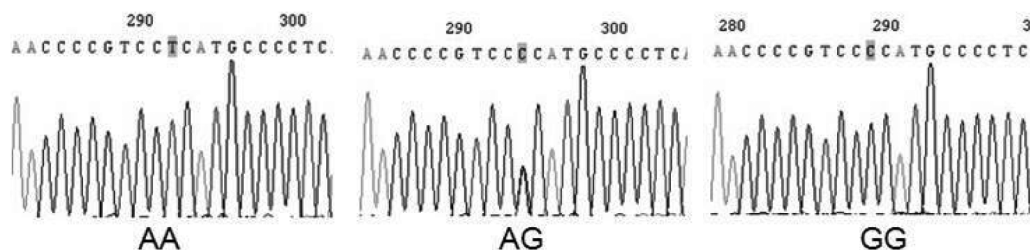


图 5 测序结果(反向测序)

3 讨论

定位于 *TNF- α* 启动子区转录起始位点上游 308

位置的单核苷酸多态性位点 (rs1800629) 与多种疾病的关联研究已持续多年, 该位点基因分型多采用酶切、

PCR 产物直接测序等方法,对于样本量较大的多态性研究来说以上方法存在工作量大、费用高等缺点。一种快速、准确、价格相对便宜的方法检测该位点多态性显然越来越紧迫,HRM 法可能是快速检测该位点多态性的一种比较好的可选方法。然而,HRM 法检测该位点多态性的准确性并没有得到过系统的评估。鉴于国内目前仍未见白癜风与 rs1800629 位点多态性的相关报道,本研究采用 HRM 法检测 100 例新疆维吾尔族白癜风患者该位点多态性,并与 PCR 产物直接测序法得到的结果进行比较分析,对 HRM 法快速检测该位点多态性的准确性及敏感性进行评估。

本研究实验结果显示 HRM 法可检测出仅含有 5% 不同基因型混合模板中的差异,HRM 法检测 rs1800629 位点多态性的灵敏度可以达到 5%。经 PCR 产物直接测序法对全部标本 HRM 分型结果进行测序验证,检验结果与 HRM 分型结果相同,二者符合率 100%,HRM 法具有比较好的准确性。

HRM 法是一种以荧光定量 PCR 为基础的简单通过检测 DNA 双链熔解曲线的变化发现 DNA 序列突变的技术^[14]。在双链 DNA 中插入荧光染料可以监测双链的扩增与熔解,因此,需要在进行 HRM 之前的样本 PCR 过程中加入饱和的荧光染料,PCR 之后,产物升温熔解,荧光量被监测,随着染料的释放荧光量不断降低^[15],野生纯合子序列、突变纯合子序列与杂合子序列之间双链 Tm 值总是存在差异,产物在升温过程中三者的荧光量不同导致熔解曲线存在差异。

HRM 方法简单、快速、成本低,具有高分辨率和准确性,是一种非常好的检测 rs1800629 位点多态性的新方法。HRM 扫描程序相当快速,只需在扩增之后直接运行高温熔解过程即可,一批样本可以在 10 min 之内完成扫描,结果由软件自动分析完成。运行完 HRM 法之后,扩增产物可以直接进行后续的测序验证。HRM 方法相对比较便宜,成本约为每样本每位点 5~7 元钱,只有直接测序法的四分之一,SNapShot 法的一半。HRM 的准确性虽然非常高,但是一些因素仍然对结果产生影响,比如:样本的来源与处理、扩增子长度、GC 含量、所用染料、设备等等^[16-17]。建议是在扩增之前应统一起始模板量,因为起始模板的差异过大会影响产物的 Tm 值;对于基因多态性分型来说,扩增子长度应尽量短,最好不超过 150 bp,各扩增子之间的温度差异才更容易被检测到;扩增子所包含的多态性位点不宜过多,HRM 法对多重熔解峰的分辨率会下降,后续基因型的判断将更加依赖于大量的预实验与研究人员

的经验。

总的来说,本研究建立了一种以 HRM 技术检测 *TNF- α* 基因多态性的方法,该方法具有比较好的灵敏度与准确性,是一种快速、准确、高通量检测白癜风患者 *TNF- α* 基因多态性的优选方法。

参考文献

- [1] Spritz RA. The genetics of generalized vitiligo [J]. Curr Dir Autoimmun, 2008, 10(2): 244-257.
- [2] 薛敏. 驱白巴布期片联合艾扶正片治疗白癜风临床研究 [J]. 中国基层医药, 2013, 20(13): 2061-2063.
- [3] Harris JE, Harris TH, Weninger W, et al. A mouse model of vitiligo with focused epidermal depigmentation requires IFN- γ for autoreactive CD8⁺ T-cell accumulation in the skin [J]. J Invest Dermatol, 2012, 132(7): 1869-1876.
- [4] 肖汉龙, 陶娟, 刘辉峰, 等. 白癜风患者血清巨噬细胞移动抑制因子和肿瘤坏死因子 α 的表达 [J]. 中华皮肤科杂志, 2012, 45(9): 673-674.
- [5] 邓茂, 曾凡才, 廖勇梅, 等. 白癜风患者血清 IL-10 与 *TNF- α* 的检测 [J]. 中国皮肤性病学期刊, 2012, 26(9): 786-788.
- [6] Abraham LJ, Kroeger KM. Impact of the -308 *TNF* promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the *TNF* gene: relevance to disease [J]. J Leukoc Biol, 1999, 66(4): 562-566.
- [7] Bingga G, Liu ZC, Zhang JF, et al. High resolution melting analysis (HRM) as a new tool for the identification of species belonging to the *Lactobacillus* case group and comparison with species-specific PCRs and multiplex PCR [J]. Food Microbiol, 2015, 46(4): 357-367.
- [8] Prajantasen T, Fuchareon S, Fuchareon G. High resolution melting analytical platform for rapid prenatal and postnatal diagnosis of β -thalassaemia common among Southeast Asian population [J]. Clin Chim Acta, 2015, 441(2): 56-62.
- [9] Singh M, Gupta VH, Amarapurkar DN, et al. Association of genetic variants with anti-tuberculosis drug induced hepatotoxicity: a high resolution melting analysis [J]. Infect Genet Evol, 2014, 23(1): 42-48.
- [10] Raymond L, Diebold B, Leroux C, et al. Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the *CDKL5* gene: identification of novel mutations [J]. Gene, 2013, 512(1): 70-75.
- [11] Badial PR, Oliveria-Filho JP, Winand NJ, et al. Allele frequency of hereditary equine regional dermal asthenia in American Quarter horses in Brazil determined by quantitative real-time PCR with high resolution melting analysis [J]. Vet J, 2014, 199(2): 306-307.
- [12] Mastoraki S, Chimonidou M, Dimitrakopoulos L, et al. A rapid and accurate closed-tube methylation-sensitive high resolution melting analysis assay for the semi-quantitative determination of *SOX17* promoter methylation in clinical samples [J]. Clin Chim Acta, 2015, 444(4): 303-309.
- [13] 中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会色素病学组. 黄褐斑和白癜风的诊疗标准 (2010 年版), 中华皮肤科杂志, 2010, 43(6): 373.
- [14] Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen [J]. Clin Chem, 2003, 49(6 Pt 1): 853-860.
- [15] Taylor CF. Mutation scanning using high-resolution melting [J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37(4): 433-437.
- [16] Montgomery JL, Sanford LN, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2010, 10(2): 219-240.
- [17] Li BS, Wang XY, Ma FL, et al. Is high resolution melting analysis (HRMA) accurate for detection of human disease-associated mutations? A meta analysis [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28078.

收稿日期: 2016-04-01