

# PCR-CTPP 简单快速检测乙醇脱氢酶-1B 基因多态性

姜树朋, 童永清, 李艳

武汉大学人民医院检验医学中心, 湖北 武汉 430060

**摘要:** **目的** 建立两对交叉引物-聚合酶链反应(PCR-CTPP)检测体系鉴别乙醇脱氢酶-1B 基因多态性。 **方法** 针对 *ADH1B* rs1229984 位点设计两对内外引物, 经过聚合酶链反应、电泳鉴别基因型, 将该方法与 DNA 测序法比较, 验证其检测准确性, 并通过该方法检测 58 例健康人 *ADH1B* 基因多态性分布情况。 **结果** PCR-CTPP 方法可用于准确检测 *ADH1B* 基因多态性, 与 DNA 测序结果相符; 在 58 例健康人中, *ADH1B* A 等位基因频率 71.6%, 为优势等位基因。 **结论**

PCR-CTPP 技术检测 *ADH1B* 基因多态性简单快速、经济省力, 可用于疾病易感基因的快速筛查和分子流行病学研究, 适合在一般实验室推广应用。

**关键词:** 乙醇; 乙醇脱氢酶-1B; 单核苷酸多态性; PCR-CTPP

**中图分类号:** R446.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2017)09-1061-03 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2017.09.010

## Simple and rapid detection of alcohol dehydrogenase-1B polymorphism by PCR-CTPP assay

JIANG Shu-peng, TONG Yong-qing, LI Yan

Center of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China

Corresponding author: LI Yan, E-mail: yanlitf1120@163.com

**Abstract:** **Objective** To identify the polymorphism of alcohol dehydrogenase-1B (*ADH1B*) gene by polymerase chain reaction with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) assay. **Methods** According to the sequence of *ADH1B* rs1229984, two pairs of primers were designed for polymerase chain reaction and the genotypes could be identified by electrophoresis, which were verified by DNA sequencing method. The distribution of *ADH1B* gene polymorphism was detected by PCR-CTPP in 58 cases of healthy people. **Results** PCR-CTPP method could be used for detecting *ADH1B* gene polymorphism accurately and the results of genotyping in PCR-CTPP were coincident with those performed by DNA sequencing. In 58 cases of healthy people, the *ADH1B* A allele was the dominant allele with the frequency of 71.6%. **Conclusions** The detection of *ADH1B* polymorphism by PCR-CTPP assay is simple, rapid, economical and labor-saving which can be widely applied to common laboratories for rapid screening and molecular epidemiological study of disease-related genes.

**Key words:** ethanol; alcohol dehydrogenase-1B; single nucleotide polymorphism; PCR-CTPP

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)作为第三代 DNA 遗传标记,是指在基因组水平上由单个碱基的变异所引起的 DNA 序列多态性,包括单个碱基的转换或颠换和单个碱基的插入或缺失。SNP 在群体中的发生频率不小于 1%, 占有已知多态性的 90% 以上。SNP 标记可用于高危群体的发现、疾病相关基因的鉴定、药物的设计和测试等,是人类基因组计划走向应用的重要步骤<sup>[1-2]</sup>。SNP 检测方法众多,如限制性片段长度多态性-聚合酶链反应(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)、等位基因特异聚合酶链反应

(allele-specific polymerase chain reaction, AS-PCR)、高分辨溶解曲线(high-resolution melt, HRM)分析、TaqMan 探针技术、Sanger 测序等<sup>[3-5]</sup>。

乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)是酒精第一步代谢的关键酶,即乙醇代谢为乙醛的关键酶。ADH  $\beta$  亚基编码基因为 *ADH1B*, *ADH1B* 基因位于人类 4 号染色体长臂 2 区 2 带, *ADH1B* \*1 等位基因在 3 号外显子发生 143G>A 变异,形成 *ADH1B* \*2 等位基因,导致组成 *ADH1B* 酶的  $\beta$ 1 亚基的第 48 位的精氨酸(arginine, arg)变为组氨酸(histidine, His),从而形成  $\beta$ 2 亚基,酶活性增高<sup>[6]</sup>。本研究采用两对交叉引物-聚合酶链反应(polymerase chain reaction with confronting two-pair primers, PCR-CTPP)方法检测 *ADH1B* c. 143G>A 变异,了解本地区健康人群 *ADH1B* 基因多态性分布情况。

**基金项目:**国家重点临床专科建设项目(财社[2010]305号)

**作者简介:**姜树朋(1989-),男,硕士,研究方向:个体化医疗与分子诊断。

**通信作者:**李艳, E-mail: yanlitf1120@163.com。

1 材料与方法

1.1 标本来源 采集 58 例健康人群者外周血 1 ml (EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝),按外周血 DNA 提取试剂盒说明书中的步骤进行 DNA 提取,DNA 保存于-70 ℃备用。

1.2 仪器与试剂 本研究主要试剂为外周血 DNA 提取试剂盒(北京天根公司)、Takara PCR Premix(大连宝生物公司)、DL1000 DNA Marker(大连宝生物公司)、DNA 凝胶回收试剂盒(美国 Axygen 公司)、Big-Dye v3.1 测序反应试剂盒(美国 ABI 公司);主要仪器为 Sorvall ST 16R 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher 公司)、ABI Veriti 梯度 PCR 仪(美国 ABI 公司)、G:BOX F3 高级凝胶成像系统(英国 Syngene 公司)、ABI 3500DX 基因测序仪(美国 ABI 公司)。

1.3 检测方法

1.3.1 引物设计 AS-PCR 是以 Taq DNA 聚合酶缺少 3'→5'外切酶活性(即无单核苷酸错配的校正功能)为基础,当引物的 3' 端碱基与多态性位点的等位基因互补时,则继续扩增;当引物 3' 端核苷酸与多态性位点等位基因错配时,则扩增停止。基于上述扩增原理设计两条特异性 SNP 内引物 F1 和 R2,外加两条外引物 F2 和 R1,经过聚合酶链反应后可产生三种产物,即 G 等位基因产物、A 等位基因产物、非特异性产物,通过凝胶电泳即可检测出待测基因型别<sup>[7-8]</sup>。见图 1。在 NCBI 数据库中搜索 *ADH1B* rs1229984 多态性位点所在序列,使用在线引物工具 Primer3.0 ([http://primer3. ut. ee/](http://primer3.ut.ee/)) 设计引物如下: F1: 5' - GTAGATGGTG-GCTGTAGGAATCTGGCG-3'; R1: 5' - GGGAAAGAG-GAAACTCCTGAAGTCCTGG - 3'; F2: 5' - GAGAAGGGCTTTAGACTGAATAACCTTGGGG - 3'; R2: 5' - GCCACTAACCACGTGTCATCTGGGT - 3'。在内引物 F1 和 R2 中,3' 端末位碱基为 SNP 特异性位点,3' 端第 3 位碱基为人为错配碱基,见图 1,经过聚合酶链反应后可得:产物 X(G 等位基因产物),产物 Y(A 等位基因产物),产物 Z(非特异性产物,内参照)。

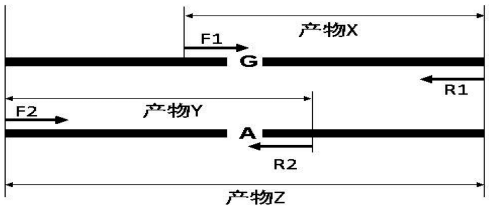


图 1 PCR-CTPP 技术检测 *ADH1B* 多态性示意图

1.3.2 SNP 检测 该反应体系总体积 20  $\mu$ l: PCR Premix 10.0  $\mu$ l,引物 1.0  $\mu$ l(内外引物比例为 1:2,浓度 10  $\mu$ mol/L),模板 DNA 1.5  $\mu$ l(约 50 ng),无核酶水 7.5  $\mu$ l。PCR 反应程序如下:95 ℃预变性 5 min;94

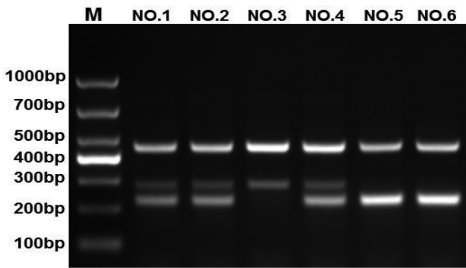
℃变性 30 s,62 ℃复性 30 s,72 ℃延伸 30 s,循环 35 次;72 ℃末延伸 10 min,4 ℃保存。反应结束,取 10  $\mu$ l PCR 产物,经 2% 琼脂糖凝胶电泳,使用 Syngene G:BOX F3 凝胶成像系统拍照,根据条带大小和有无鉴别基因型。

1.3.3 DNA 测序 将 PCR 产物 Z(463 bp) DNA 条带回收、纯化,分别用 F2、R1 引物作为正反向测序引物进行测序反应,然后在 ABI3500DX 基因测序仪上进行测序分析。

1.4 统计学分析 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,Hardy-Weinberg 遗传平衡检验采用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR-CTPP 分型 在 PCR 结束后,取扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳、凝胶成像系统分析后,*ADH1B* 基因多态性结果见图 2。条带由大到小依次为产物 Z463 bp(非特异性产物,内参照),产物 X286 bp(G 等位基因产物),产物 Y230 bp(A 等位基因产物)。NO.1、2、4 泳道为 *ADH1B*/G 型,NO.3 泳道为 *ADH1B*/G 型,NO.5、6 泳道为 *ADH1B*/A 型。



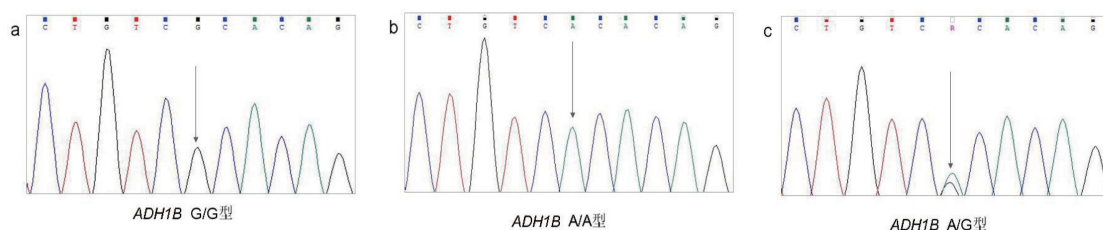
M 为泳道 Marker,NO.1、2、4 泳道为 A/G 型,NO.3 泳道为 G/G 型,NO.5、6 泳道为 A/A 型

图 2 PCR-CTPP 技术 *ADH1B* 基因分型电泳结果

2.2 DNA 测序分型 DNA 测序法通常作为检测基因多态性的金标准,*ADH1B* 基因多态性测序结果见图 3。将 PCR-CTPP 法和 DNA 测序法平行检测健康人群中 30 例随机样本 *ADH1B* 基因型的结果进行比较。在 30 例随机样本中,PCR-CTPP 法检测出 A/A 型 15 例,A/G 型 13 例,G/G 型 2 例,与 DNA 测序法完全符合,证实 PCR-CTPP 方法可用于准确检测 *ADH1B* 基因多态性。见表 1。

表 1 两种方法检测 *ADH1B* 基因型分布

PCR-CTPP	DNA 测序法			合计
	A/A 型	A/G 型	G/G 型	
A/A 型	15	0	0	15
A/G 型	0	13	0	13
G/G 型	0	0	2	2
合计	15	13	2	30



箭头所指处为 *ADH1B* rs1229984 位点,其中图 a 为 G/G 型,图 b 为 A/A 型,图 c 为 A/G 型,其 SNP 位点处显示重叠峰。

图 3 Sanger 测序检测 *ADH1B* 基因分型结果

**2.3 健康人群 *ADH1B* 基因多态性分布** 在 58 例健康人中,PCR-CTPP 方法检测 *ADH1B* 基因多态性结果显示,*ADH1B* A/A 型 28 例(48.3%),*ADH1B* A/G 型 27 例(46.5%),*ADH1B* G/G 型 3 例(5.2%);A 等位基因频率 71.6%,G 等位基因频率为 28.4%。经 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验, $\chi^2 = 1.19, P > 0.05$ ,分布达到了 H-W 遗传平衡,该样本具有代表性。

### 3 讨论

乙醇及其代谢产物乙醛可以通过多种途径损害肝脏正常的结构与功能,引起酒精性肝炎、酒精性肝硬化甚至肝癌<sup>[9]</sup>。ADH 介导的氧化途径是酒精代谢的主要途径,当其  $\beta$  亚基编码基因 *ADH1B* 发生变异,即 *ADH1B* \* 1 等位基因发生 c.143G > A 变异,形成 *ADH1B* \* 2 等位基因,乙醇脱氢酶活性增高,导致乙醇代谢为乙醛的过程加快。在东亚人群中,*ADH1B* \* 2 等位基因(即 A 等位基因)比例特别高,甚至可达 80% 以上<sup>[6]</sup>。在本研究的 58 例健康人中,*ADH1B* A 等位基因占 74.1%,为优势等位基因,与 Peng 等对湖北地区 *ADH1B* 等位基因频率调查结果相符<sup>[10]</sup>。*ADH1B* A 等位基因携带者可以迅速将摄入的酒精代谢为乙醛,乙醛的累积能够引起脸红、恶心、呕吐、血压升高等一系列不适反应,从而阻止酒精的继续摄入,起到保护作用,因此 *ADH1B* A 等位基因携带者不易发生酗酒或酒精依赖现象。此外,在亚洲地区,*ADH1B* G 等位基因是食管鳞癌发生的高危因素<sup>[11-12]</sup>。因此,了解饮酒人群 *ADH1B* 基因型别,对高危人群加强宣传教育,减少酒精对身体的危害,具有重要意义。

本研究采用 PCR-CTPP 技术检测适宜在条件一般的实验室开展,只需设计两对引物,经过 PCR、琼脂糖电泳分析即可鉴别基因型,与传统的 PCR-RFLP 相比,PCR-CTPP 不需要限制性酶切位点,省去了酶切的费用与时间;与 AS-PCR 相比,PCR-CTPP 可单管检测基因多态性,而且产物 Z 可为作为对照,不需要另外设计内参<sup>[13-14]</sup>;与 DNA 测序相比,PCR-CTPP 检测基因多态性省时省力,避免了后续的胶回收、测序反应等复

杂步骤。但该技术对引物的设计要求严格:两条内引物受制于多态性位点,内引物中需要引入除多态性位点之外的第二个错配碱基,以提高扩增的特异性;四条引物必须有相近的退火温度,否则由于竞争性扩增出现假阴性。此外,该技术体系引物比例的优化比一般 PCR 反应复杂,内引物浓度过高就不能有效阻断错配扩增而出现假阳性,浓度过低则条带不清晰而不能准确判读结果。本研究中,在 *ADH1B* 两条内引物 3' 端第三位引入弱错配碱基,以内外引物 1:2 比例、62 °C 的退火温度,成功检测出 *ADH1B* 基因三种型别。

综上所述,本研究采用 PCR-CTPP 技术检测 *ADH1B* 基因多态性简单、快速、经济,可用于疾病易感基因的快速筛查和分子流行病学研究,适合在一般实验室推广应用。

#### 参考文献

- [1] 顾星,高春芳. 单核苷酸多态性与原发性肝细胞癌易感性的研究进展[J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(3):235-237.
- [2] 魏瑜,高媛,程江,等. 单核苷酸多态性在医学领域的应用[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(5):954-956.
- [3] Zhang L, Zhao J, Cui G, et al. Genotyping on *ALDH2*: comparison of four different technologies[J]. PLoS One, 2015, 10(3):e0122745.
- [4] 傅昌,杨亦荣,倪晓洁,等. 代谢酶基因单核苷酸多态性两对引物-聚合酶链反应技术方法的建立及初步应用[J]. 中华流行病学杂志, 2009, 30(1):63-67.
- [5] 蔡芬,宋治,陈皓,等. 不同检测方法检测比较 *ABCA1* 基因多态性与脑梗死的关系[J]. 实用预防医学, 2014, 21(4):497-499.
- [6] Li H, Mukherjee N, Soundararajan U, et al. Geographically separate increases in the frequency of the derived *ADH1B* \* 47His allele in eastern and western Asia[J]. Am J Human Genet, 2007, 81(4):842-846.
- [7] Hamajima N. PCR-CTPP: a new genotyping technique in the era of genetic epidemiology[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2014, 1(1):119-123.
- [8] 王柯,章金涛,运玉霞,等. PCR-CTPP:一种基于错配技术的 SNP 分型方法的改良[J]. 遗传, 2011, 33(2):182-188.
- [9] 史清海,伏建峰,路西春,等. 酒精灌胃大鼠血浆中乙醇浓度变化[J]. 实用预防医学, 2006, 13(5):1322-1323.
- [10] Peng Y, Shi H, Qi XB, et al. The *ADH1B* Arg47His polymorphism in East Asian populations and expansion of rice domestication in history[J]. BMC Evol Biol, 2010, 10(1):1-8.
- [11] Ye B, Ji CY, Zhao Y, et al. Single nucleotide polymorphism at alcohol dehydrogenase-1B is associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Cell Int, 2014, 14(1):740-745.
- [12] Zhang G, Mai R, Huang B. *ADH1B* Arg47His polymorphism is associated with esophageal cancer risk in high-incidence Asian population: evidence from a meta-analysis[J]. PLoS One, 2010, 5(10):e13679-e13679.
- [13] 高秀丽,景奉香,杨剑波,等. 单核苷酸多态性检测分析技术[J]. 遗传, 2005, 27(1):110-122.
- [14] Gaudet M, Fara A G, Beritognolo I, et al. Allele-specific PCR in SNP genotyping[J]. Methods Mol Biol, 2009, 578(212):415-424.

收稿日期:2017-03-20