DOI:10.16016/j.1000-5404.201501223

论著

基于分子信标技术的CYP2C8基因139A/G单核苷酸多态性检测的初步研究

郭 美,雷 洁,杨 昭,陈庆海 (400038 重庆,第三军医大学西南医院检验科)

[摘要] **目的** 基于分子信标技术设计一种新型的断接式发夹探针,利用该探针建立并优化检测CYP2C8基因139A/G单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)的方法。**方法** 首先运用生物信息学软件设计断接式发夹探针,合成目的探针和靶序列,再探索反应体系的最适温度和最适探针浓度比,最后利用该方法对CYP2C8 139A/G的SNP进行检测。**结果** 断接式发夹探针识别靶序列中SNP位点的最适杂交温度为40 ℃,反应体系中荧光探针与淬灭探针的最适浓度比为1∶4。在最适温度和最适探针浓度比的反应条件下,断接式发夹探针与CYP2C8基因原始靶序列反应体系的荧光强度为(7 632.0±8.7)RFU,而与突变靶序列反应体系的荧光强度为(6 425.7±6.1)RFU,两者差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 新型的断接式发夹探针可以有效区分原始序列和突变序列,是一种可以用于检测CYP2C8基因139A/G SNP位点的新方法。

[关键词] 分子信标;断接式发夹探针;单核苷酸多态性;CYP2C8基因
[中图法分类号] R394-33; R446 [文献标志码] A

Detection of CYP2C8 gene 139A/G single nucleotide polymorphism based on molecular beacon technology

Guo Mei, Lei Jie, Yang Zhao, Chen Qinghai (Department of Clinical Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To design a new fracture-connective hairpin probe based on the technique of molecular beacons, and then to establish and optimize a new method to detect the 139A/G single nucleotide polymorphism (SNP) of CYP2C8 gene by the probe. **Methods** Firstly, the fracture-connective hairpin probe was designed through the bioinformatic software, and then the desired probes and target sequences were synthesized. The optimal temperature and concentration ratio of probe were explored for the reaction system. At last, this method was performed to detect the 139A/G SNP of CYP2C8 gene. **Results** The optimal hybridization temperature for the fracture-connective hairpin probe was 40 ℃ to distinguish the SNP of target sequence, and the optimal hybridization ratio was 1∶4 of fluorescence probe to quenching probe. Under the condition of optimal temperature and ratio, the fluorescent intensity of the reaction system of the fracture-connective hairpin probe and CYP2C8 gene primary sequence was 7 632.0±8.7 RFU, while that of of the fracture-connective hairpin probe and CYP2C8 gene mutational sequence was 6 425.7±6.1 RFU. There was difference significance between the 2 reaction systems ($P<0.05$). **Conclusion** Our new type of fracture-connective hairpin probe can effectively distinguish the primary and mutational sequences, and can be used to detect the 139A/G SNP of CYP2C8 gene. This study lays experimental foundation for the rapid and high-throughput SNP detection.

[**Key words**] molecular beacons; fracture-connective hairpin probe; single nucleotide polymorphism; CYP2C8 gene

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81371641, 81171419) and the Optimal Project for Science and Technology Activities for Overseas Students From Ministry of Human Resources and Social Security (2013). Corresponding author: Chen Qinghai, E-mail:cqh1023@aliyun.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81371641,81171419);国家人社部留学人员科技活动择优项目(2013)
[通信作者] 陈庆海,E-mail:cqh1023@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150421.1022.016.html(2015-04-21)

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤[1]。手术联合全身性化疗是改善乳腺癌患者预后和提高生存率的重要方法。抗肿瘤药物在体内的代谢、功效和毒副作用方面均存在显著的个体差异[2-3]。目前的研究表明,化疗药对肿瘤患者疗效的差异与遗传因素,特别是与药物代谢关键基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)关系最为密切[4]。因此,检测和筛选这些基因中相应的SNP位点对于探究乳腺癌化疗药物的疗效和个体化用药等方面均具有重要的指导意义。

分子信标(molecular beacons,MB)是一种在5′和3′端形成的长约8 bp呈茎环结构的双标记寡核苷酸探针,由于形似发夹又被称为发夹型DNA探针[5]。典型的MB长25 bp,其中探针序列约15 bp,可与靶核酸结合。MB的作用特点是:在正常茎环状态下不产生荧光;当探针区域与完全互补的目标序列配对后,其荧光基团被激发产生荧光。MB技术已经被用于实时核酸检测、等位基因分析和临床诊断等方面[6]。MB能发挥独特的"光开关"的作用,对单个碱基的错配、缺失或插入突变具有极强的检测能力,因此可以将其用于目的基因的SNP检测。本课题组长期关注乳腺癌化疗药物代谢相关基因SNP检测方法的研究。我们发现:MB分子由于结构限制,其两个末端分别被荧光-淬灭分子对占用,缺少将分子固定在检测载体表面的结构,因而其应用一直受到制约。

本实验拟在前期研究的基础上,设计一种基于MB技术的新型断接式发夹探针,并结合实时定量PCR技术,将该探针用于乳腺癌化疗药物紫杉醇和阿霉素在肝脏代谢的相关基因CYP2C8的139A/G SNP突变位点分析,以期为乳腺癌患者个体化用药方案提出新的SNP检测方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

杂交缓冲液为TNE buffer,CFX96荧光定量PCR扩增仪(美国Bio-Rad公司);CYP2C8基因序列的断接式发夹探针设计和合成(大连TaKaRa公司);断接式发夹探针序列设计软件DNASIS版本。

1.2 实验方法

1.2.1 CYP2C8基因序列的断接式发夹探针设计和合成 通过NCBI GenBank查得CYP2C8基因序列,以该基因的原始序列和139A/G位点SNP突变序列分别作为后续试验用的原始靶序列和突变靶序列,并根据靶序列设计用于检测CYP2C8基因SNP突变的断接式发夹探针,将探针和靶序列送至大连TaKaRa公司进行合成。

1.2.2 检测体系最适杂交温度的确定 为避免实验假阳性结果,摸索最适杂交温度的过程中采用5个对照反应体系进行,其中反应体系1:5 μL荧光探针(P1)+45 μL缓冲液;反应体系2:5 μL P1+20 μL淬灭探针(P2)+25 μL缓冲液;反应体系3:5 μL P1+20 μL P2+25 μL原始靶序列;反应体系4:5 μL P1+20 μL P2+25 μL突变靶序列;反应体系5:50 μL缓冲液,反应总体积为50 μL。每次反应均设立阴性对照(以无菌去离子水代替靶序列)和阳性对照(以合成的原始靶序列代替突变靶序列)。杂交反应条件:95 ℃预变性5 min,然后按98~0.8 ℃,每循环下降0.3 ℃条件进行温度梯度杂交,读取荧光条件进行80个循环,反应结束后对结果进行分析。

1.2.3 最适探针浓度比的确定 根据1.2.2所得到的最适杂交温度,在其他杂交条件不变的情况下设定荧光探针和淬灭探针的不同浓度比(1∶1、1∶2、1∶3及1∶4),以确定该检测体系的最适探针浓度比。

1.2.4 断接式发夹探针用于SNP位点检测与荧光定量PCR反应 根据之前确定的最佳反应体系,加入终浓度为2 μmol/L的荧光探针P1,按1.2.2体系反应。荧光定量PCR后测定FAM荧光强度。以不加入模板cDNA的反应体系为对照组。通过对比CYP2C8基因原始靶序列和139A/G突变靶序列实验组的荧光强度,分析断接式发夹探针用于检测SNP位点的可行性。每组实验重复3次。

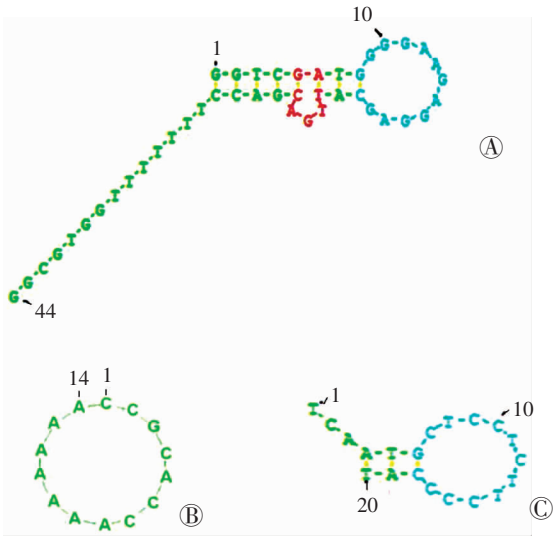
1.3 统计学处理

采用SPSS 18.0统计软件,实验结果中的计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,两组间数据采用t检验(检验水准$\alpha = 0.05$)进行比较,多组间数据采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 CYP2C8基因序列的断接式发夹探针序列及结构

根据本课题组前期构建断接式发夹探针的基本原理,采用DNASIS软件设计用于检测SNP位点的荧光探针P1(图1A),该探针长端连接氨基基团与羧基磁珠固定,短端连接荧光基团。同时根据荧光探针P1的序列设计与其长端相互补的淬灭探针P2(图1B),以及与荧光探针P1发夹序列互补的原始靶序列(图1C)。由于CYP2C8基因SNP在第139碱基处由G突变为A,因此突变靶序列与原始靶序列的差别为第10位碱基处由C变为T。按照实验计划将探针和靶序列送至公司进行合成,序列见表1。



A:荧光探针 P1 的空间结构;B:淬灭探针 P2 的空间结构;C:原始靶序列的空间结构

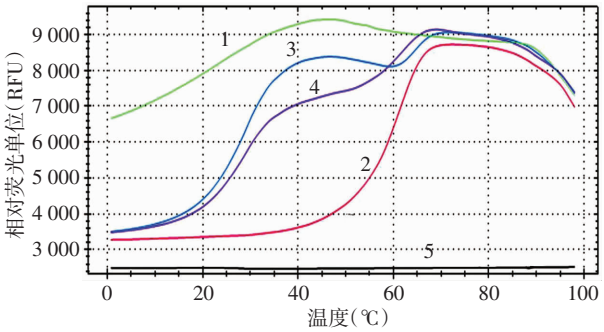
图 1　CYP2C8 基因序列的断接式发夹探针及原始靶序列空间结构

表 1　断接式发夹探针和靶序列及其特点

名称	序列	长度(bp)	说明
荧光探针 P1	5′-GGTCGATGGGGAAGAGGAGCA-TTGACGACCTTTTTTTGGTGCGG-3′	44	5′FAM 荧光修饰 3′氨基修饰
淬灭探针 P2	5′-CCGCACCAAAAAAA-3′	14	3′BHQY 修饰
原始靶序列	5′-TCAATGCTCCTCTTCCCCAT-3′	20	
突变靶序列	5′-TCAATGCTCTTCTTCCCCAT-3′	20	

2.2　检测体系的最适温度

将公司合成的探针和靶序列加入杂交反应体系中,进行温度梯度杂交,以确定探针检测 SNP 的最适温度。结果发现随着杂交温度的下降,仅含有荧光探针 P1 的反应体系(图 2 曲线 1)其荧光强度随着温度的降低变化不大,稳定在 6 500 相对荧光单位(relative fluorescence units,RFU)以上;含有荧光探针 P1 与淬灭探针 P2 的反应体系(图 2 曲线 2)其荧光强度远低于反应体系 1 的荧光强度,说明荧光探针 P1 和淬灭探针 P2 在该温度范围内能够有效的杂交,继而淬灭荧光;含有荧光探针 P1、淬灭探针 P2 以及原始靶序列的反应体系(图 2 曲线 3)的荧光强度随着温度的降低而出现先增强后逐渐降低的趋势,表明荧光探针 P1 能够有效地与原始靶序列杂交,阻止淬灭探针 P2 与荧光探针的结合;而含有荧光探针 P1、淬灭探针 P2 以及突变靶序列反应体系(图 2 曲线 4)的荧光强度与反应体系 2 相似,也随着温度降低而减弱,证明了该荧光探针 P1 不能识别突变靶序列,且不能与突变靶序列进行杂交而显示荧光。上述结果表明在一定范围内,温度的降低对探针与靶序列的杂交反应有一定的影响,杂交反应体系在 40℃附近时原始靶序列(曲线 3)和突变靶序列(曲线 4)引发的 RFU 差异最大,因此 40℃时杂交反应体系鉴别原始和突变序列的效果最佳,也即检测体系的最适温度。



曲线 1:5 μL P1 +45 μL 缓冲液;曲线 2:5 μL P1 +20 μL P2 +25 μL 缓冲液;曲线 3:5 μL P1 +20 μL P2 +25 μL 原始靶序列;曲线 4:5 μL P1 +20 μL P2 +25 μL 突变靶序列;曲线 5:50 μL 缓冲液

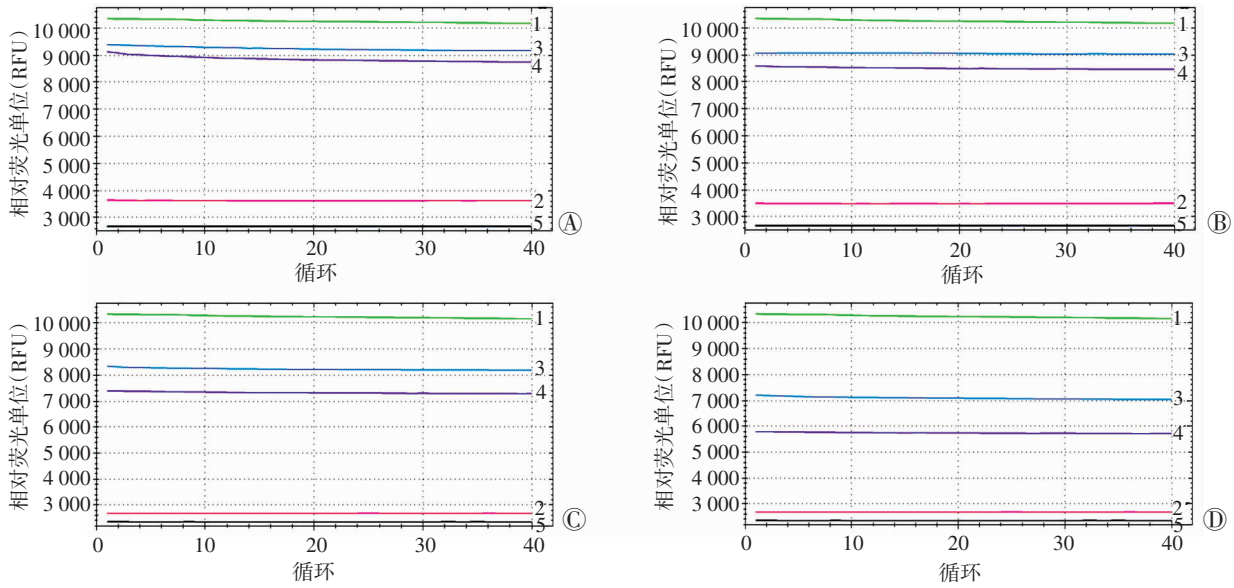
图 2　检测体系最适温度的确定

2.3　检测体系的最适探针浓度比

杂交反应体系采用最适温度 40 ℃,进一步探索荧光探针和淬灭探针的最适浓度比。将探针和靶序列按照实验所设定的 4 个浓度配比加入荧光定量 PCR 反应体系中,结果显示,当荧光探针和淬灭探针的浓度的比例分别为 1∶1、1∶2、1∶3和 1∶4时,含有原始靶序列和突变靶序列反应体系的相应荧光强度差值分别为(167 ± 29. 3)、(665 ± 12)、(997 ± 26. 5) RFU 和(1 256. 6 ± 11. 8)RFU(图 3);其中 1∶4组中两者的荧光强度相差最大(图 3),与其他组相比差异有统计学意义(P <0. 05)。能够有效地区分原始靶序列和突变靶序列。因此,当荧光探针浓度为淬灭探针比例为 1∶4 时,该反应体系检测靶序列中 SNP 位点的效果最佳,即达到最适探针浓度比。

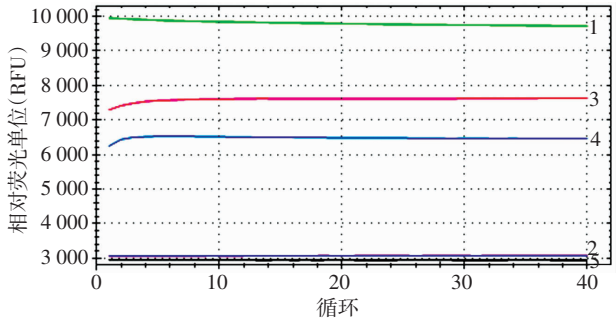
2.4　断接式发夹探针用于 SNP 位点检测的效果

用于检测的杂交反应体系采用最适温度 40 ℃和最适探针浓度比 P1∶P2 = 1∶4,在确定好的 PCR 荧光定量反应管内,检测原始靶序列和突变靶序列反应体系的荧光相对表达强度。结果显示:含有原始靶序列的反应体系荧光强度为(7 632. 0 ± 8. 7) RFU,显著高于含有突变靶序列的反应体系(6 425. 7 ± 6. 1) RFU,经比较两者差异具有显著性(P <0. 05)。说明在最适温度和最适探针浓度比的反应条件下,断接式发夹探针可用于检测 CYP2C8 基因序列 139A/G SNP 位点,效果较好。



A:反应体系(P1∶P2=1∶1);B:反应体系(P1∶P2=1∶2);C:反应体系(P1∶P2=1∶3);D:反应体系(P1∶P2=1∶4);曲线1:5 μL P1+45 μL缓冲液;曲线2:5 μL P1+20 μL P2+25 μL缓冲液;曲线3:5 μL P1+相应量P2+(25 μL-相应量)缓冲液+20 μL原始靶序列;曲线4:5 μL P1+相应量P2+(25 μL-相应量)缓冲液+20 μL突变靶序列;曲线5:50 μL缓冲液

图3 检测体系的最适探针浓度比的确定



曲线1:5 μL P1+45 μL缓冲液;曲线2:5 μL P1+20 μL P2+25 μL缓冲液;曲线3:5 μL P1+20 μL P2+25 μL原始靶序列;曲线4:5 μL P1+20 μL P2+25 μL突变靶序列;曲线5:50 μL缓冲液

图4 断接式发夹探针检测SNP位点的效果

3 讨论

使用紫杉醇、蒽环类等进行术后化疗是转移性乳腺癌患者最常见治疗方式,但因为癌细胞的耐药性、化疗药代谢基因的遗传多样性以及与药物之间存在复杂的相互作用,关于乳腺癌化疗相关基因的SNPs与疗效的精确关联尚不清楚[7]。然而,通过对化疗药物代谢相关单基因SNP的研究,可以为乳腺癌等恶性肿瘤的个体化用药、毒副作用及生存情况预测等方面的进一步探索奠定基础。

细胞色素P450(cytochrome p450,CYP450)酶系是肝脏代谢的主要酶系之一,能够直接参与药物代谢,继而影响药物疗效和安全性[8]。根据CYP分子上氨基酸序列的同源性,可以将CYP分为不同的家族和亚型,其中CYP1-3家族成员是外源性物质最主要的代谢酶[9]。CYP1-3家族中大部分亚型的基因在人群中的分布呈遗传多态性,因此酶催化活性也具有高度变异的特性,这是导致药物效应个体差异最主要的原因[10]。CYP2C8是CYP2家族的一个亚型,其紫杉醇6α-羟基化的活性在不同个体间的差异可达38倍,是导致不同乳腺癌患者对紫杉醇、蒽环类化疗药物临床治疗效果和药物安全性存在巨大差异的主要原因[11]。因此,探究CYP2C8基因的多态性及其在药物代谢过程中的作用对于紫杉醇和蒽环类化疗药物的临床安全性和乳腺癌患者的个体化治疗均有十分重要的意义[12]。

目前,对SNP位点检测的主要方法包括:基于分子杂交的方法,如等位基因特异核苷酸片段杂交、分子信标、动态等位基因特异杂交等[13];基于酶促反应或PCR的方法,如扩增抗拒突变系统、双向等位基因特异性PCR、Taqman法等[14];基于分子构象的方法,如单链构象多态性、温度梯度凝胶电泳、变性梯度凝胶电泳等[15];以及直接测序法等。这些方法均各有利弊,例如基于PCR技术和分子构象的方法虽然成本较低,但往往需要再与电泳、荧光、酶免、芯片等方法相结合,检测步骤繁琐,耗时长,且容易出现假阴性结果,直接影响疾病诊断;基于直接测序的方法稳定性好,但费用

颇高,不利于临床推广;基于分子杂交的方法原理较为简明,但是在稳定性上仍有一些不足,需要技术上的改进。本研究就是对MB技术改良的初步尝试。

本研究在MB技术的基础上,首先利用生物信息学软件设计了一种新的断接式发夹探针,该探针由一端可以固定至目标分子而另一端带有荧光分子的主链,以及一端可与主链互补配对而另一端带有淬灭分子的辅助链构成。两链正好断端对接紧密靠近,形成具有荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer,FRET)现象的荧光-淬灭分子对[16]。这种设计在技术上避开了传统探针茎臂修饰技术难、缺少载体固定结构等缺点,并具有合成技术难度低、应用成本低等优势。然后,本研究对于断接式发夹探针检测CYP2C8基因SNP的反应体系进行了初步的优化,结果显示该探针在反应温度为40 ℃时,能够较好的区分原始序列和突变序列;且进一步实验发现,当淬灭探针的浓度为荧光探针的4倍时,原始序列的荧光强度与突变序列相差最大,因此,该检测体系能够在最适温度40 ℃、最适探针比例(荧光探针∶淬灭探针)1∶4的条件下准确检测出CYP2C8基因139A/G的SNP,且前期探针合成和后期检测操作简单、便捷,而且,还可以进一步通过对荧光探针标记不同的荧光分子而实现多个样品同时检测,继而实现快速高通量的检测目的。

综上所述,本研究基于MB技术设计的断接式发夹探针是一种能够快速、高通量检测SNP的新技术,且已确定了其检测CYP2C8基因多态性的最适反应温度最适探针浓度比,为后续乳腺癌患者临床样本的CYP2C8基因SNP检测和分析奠定了理论和实验基础。在本研究中我们也发现这种单一的断接式发夹探针还需要锚定在一个载体上才能实现高通量、多类型的检测目的,因此本课题组正在尝试将断接式发夹探针结合于具有荧光信号放大、富集效应且易于被固定的纳米磁珠上,以期这种荧光探针能尽快应用于高通量的SNP位点检测。

参考文献:

[1] Chen M, Xu R, Turner J W, *et al*. Race and the molecular origins of breast cancer in Chinese women: breast cancer in Chinese women[J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19(13): 4085 - 4093.

[2] Kelly C M, Hortobagyi G N. Adjuvant chemotherapy in early-stage breast cancer: what, when, and for whom? [J]. Surg Oncol Clin N Am, 2010, 19(3): 649 - 668.

[3] Nerich V, Chelly J, Montcuquet P, *et al*. First-line trastuzumab plus taxane-based chemotherapy for metastatic breast cancer: cost-minimization analysis[J]. J Oncol Pharm Pract, 2014, 20(5): 362 - 368.

[4] Li F, Ren G S, Li H Y, *et al*. A novel single nucleotide polymorphism of the cyclooxygenase-2 gene associated with breast cancer[J]. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2009, 21(4): 302 - 305.

[5] Han S X, Jia X, Ma J L, *et al*. Molecular beacons: a novel optical diagnostic tool [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2013, 61(2): 139 - 148.

[6] Wang Q, Chen L, Long Y, *et al*. Molecular beacons of xeno-nucleic acid for detecting nucleic acid [J]. Theranostics, 2013, 3(6): 395 - 408.

[7] Hertz D L, Motsinger-Reif A A, Drobish A, *et al*. CYP2C8 *3 predicts benefit/risk profile in breast cancer patients receiving neoadjuvant paclitaxel[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 134(1): 401 - 410.

[8] Harvey R D, Morgan E T. Cancer, inflammation, and therapy: effects on cytochrome p450-mediated drug metabolism and implications for novel immunotherapeutic agents [J]. Clin Pharmacol Ther, 2014, 96(4): 449 - 457.

[9] Go R E, Hwang K A, Choi K C. Cytochrome P450 1 family and cancers[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2015, 147: 24 - 30.

[10] Sikka R, Magauran B, Ulrich A, *et al*. Bench to bedside: Pharmacogenomics, adverse drug interactions, and the cytochrome P450 system [J]. Acad Emerg Med, 2005, 12 (12): 1227 - 1235.

[11] Bajpai P, Srinivasan S, Ghosh J, *et al*. Targeting of splice variants of human cytochrome P450 2C8 (CYP2C8) to mitochondria and their role in arachidonic acid metabolism and respiratory dysfunction[J]. J Biol Chem, 2014, 289(43): 29614 - 29630.

[12] 王健, 唐金海, 赵建华. 紫杉醇相关代谢酶和药物转运体基因多态性与乳腺癌化疗反应[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(1): 63 - 67.

[13] Blackstock D, Chen W. Halo-tag mediated self-labeling of fluorescent proteins to molecular beacons for nucleic acid detection[J]. Chem Commun (Camb), 2014, 50(89): 13735 - 13738.

[14] Hayashida M, Ota T, Ishii M, *et al*. Direct detection of single nucleotide polymorphism (SNP) by the TaqMan PCR assay using dried saliva on water-soluble paper and hair-roots, without DNA extraction[J]. Anal Sci, 2014, 30(3): 427 - 429.

[15] Galeano C H, Fernandez A C, Gomez M, *et al*. Single strand conformation polymorphism based SNP and Indel markers for genetic mapping and synteny analysis of common bean (Phaseolus vulgaris L.)[J]. BMC genomics, 2009, 10: 629.

[16] Hsieh A T, Pan P J, Lee A P. A real-time characterization method to rapidly optimize molecular beacon signal for sensitive nucleic acids analysis[J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(13): 3059 - 3067.

(**收稿**:2015-01-29;**修回**:2015-03-12)

(编辑 邓强庭)