

本文引文格式:宫磊,张志坚,杨建课,等.去离子甲酰胺在脑腱黄瘤病基因诊断中的应用[J].右江民族医学院学报,2021,43(4):481-484.

【论著与临床报道】

去离子甲酰胺在脑腱黄瘤病基因诊断中的应用

宫磊¹,张志坚¹,杨建课¹,高继光¹,戚之琳²

1. 皖南医学院医学生物学教研室,安徽 芜湖 241002;
2. 皖南医学院医学生物化学教研室,安徽 芜湖 241002)

摘要:目的 探讨去离子甲酰胺在脑腱黄瘤病基因诊断中的应用价值,同时为高GC含量DNA片段的扩增提供方法上的参考。**方法** 在反应体系中不含去离子甲酰胺以及去离子甲酰胺浓度为1%~10%的情况下采用热启动PCR扩增CYP27A1基因4个高GC含量的片段,然后进行琼脂糖凝胶电泳,再用Image J软件分析不同去离子甲酰胺浓度下目标条带的光强度值,比较差异,最后挑选特异性扩增产物测序分析。**结果** 在不含去离子甲酰胺和去离子甲酰胺浓度为1%~6%的情况下,均扩增出目标片段;在不含去离子甲酰胺时,4个目标片段的扩增产物均存在非特异性带,而当去离子甲酰胺的浓度为4%~6%时,非特异性带消失。不同浓度(0~6%)条件下目标带的光强度值差异无统计学意义。特异性扩增产物经测序验证为目标片段。**结论** 采用热启动PCR,同时向反应体系中添加去离子甲酰胺能有效扩增出高GC含量的DNA片段,并避免非特异性带的产生,但反应体系中去离子甲酰胺的浓度宜控制在4%~6%。这一方法不仅适用于脑腱黄瘤病的致病基因—CYP27A1基因的检测,也可用于其他富含GC的基因的检测。

关键词:去离子甲酰胺;热启动PCR;CYP27A1基因;黄瘤病,脑腱性

中图分类号:R589.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2021)04-0481-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.04.008

Application of deionized formamide in genetic diagnosis of cerebrotendinous xanthomatosis

Gong Lei¹, Zhang Zhijian¹, Yang Jianke¹, Gao Jiguang¹, Qi Zhilin²

1. Department of Medical Biology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China;
2. Department of Medical Biochemistry, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To explore the application value of deionized formamide in genetic diagnosis of cerebrotendinous xanthomatosis, so as to provide methodological reference for the amplification of DNA fragments with high GC content. **Methods** Four segments of the CYP27A1 gene with high GC content were amplified by hot-start PCR in the reaction system without deionized formamide or with 1%~10% deionized formamide. Then agarose gel electrophoresis was performed on these segments. The software Image J was then used to analyze the light intensity values of the target bands at different concentrations of deionized formamide, and the value differences were compared. Finally, specific amplification products were selected for sequencing analysis. **Results** The target fragments were amplified when there was no deionized formamide as well as when there was deionized formamide at the concentration of 1%~6%. In the absence of deionized formamide, all the amplified products of the four target fragments had non-specific bands. When the concentration of deionized formamide was 4%~6%, the non-specific band disappeared. There was no significant difference in the light intensity of the target zone at different concentrations (0~6%). The specific amplified product was confirmed as the target fragment by sequencing. **Conclusion** Using hot-start PCR and adding deionized formamide to

第一作者简介:宫磊(1974—),女,硕士,副教授,研究方向:医学遗传学,E-mail:leigong03@126.com

通讯作者简介:戚之琳(1977—),女,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:疾病相关功能分子与细胞信号转导,E-mail:422627721@qq.com

the reaction system can effectively amplify DNA fragments with high GC content and avoid the generation of non-specific bands. However, the concentration of deionized formamide in the reaction system should be restrained at 4%~6%. This method is not only applicable for the detection of *CYP27A1* (the pathogenic gene of cerebrotendinous xanthomatosis), but also can be used for the detection of other GC-rich genes.

Key words: deionized formamide; hot start PCR; *CYP27A1* gene; xanthomatosis, cerebrotendinous

脑腱黄瘤病(cerebrotendinous xanthomatosis, CTX)是一种常染色体隐性遗传的脂质代谢性疾病。90%以上的病例是由于 *CYP27A1* 基因突变导致编码产物固醇 27-羟化酶功能异常,继而引起胆酸合成障碍而发病,临床表现为多系统损害,如青少年白内障、肌腱黄瘤、早发性动脉硬化、进行性神经功能障碍等。通过基因检测早期明确诊断并采用鹅去氧胆酸治疗对于阻止或延缓病情发展具有重要的意义^[1-3]。在对 *CYP27A1* 基因的检测中,我们发现由于其编码序列 GC 含量较高,进行 PCR 扩增时,很容易出现非特异性条带,不利于后续对 PCR 产物的测序分析。为提高 PCR 反应的特异性,我们采用了热启动 PCR,并在反应体系中添加去离子甲酰胺,以优化 *CYP27A1* 基因检测的方法,同时也为高 GC 比 DNA 片段的扩增提供方法上的参考。

1 资料与方法

1.1 血液标本 健康人体外周血标本 1 例,肝素锂抗凝,-20℃冰柜冻存。

1.2 研究方法

1.2.1 主要仪器和试剂 Mastercycler Gradient PCR 仪(Eppendorf 公司);血液基因组 DNA 提取试剂盒(Axygen 公司);去离子甲酰胺(上海生工生物工程公司);热启动 Taq 酶(Takara 公司);DL2000 DNA Marker(Takara 公司);dNTPs(Takara 公司);PCR 清洁试剂盒(Axygen 公司)。

1.2.2 DNA 提取 将全血室温解冻后,使用血液基因组 DNA 提取试剂盒提取出基因组 DNA。

1.2.3 引物设计和合成 NCBI 网站在线设计 4 对引物分别扩增 *CYP27A1* 基因 4 个片段,涵盖 *CYP27A1* 基因全部外显子以及外显子内含子接头处。引物序列、位置以及扩增片段的编号、大小、GC 含量见表 1。

1.2.4 不同浓度去离子甲酰胺条件下采用热启动 PCR 扩增 *CYP27A1* 基因目标片段 在反应体系中不含去离子甲酰胺和去离子甲酰胺浓度分别为 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%的情况下扩增 *CYP27A1* 基因片段 2;在不含去离子甲酰胺和去离子甲酰胺浓度分别为 1%、2%、3%、4%、5%、6%的情况下扩增 *CYP27A1* 基因片段 1、3、4。PCR 总反应体积为 50 μ l,其中热启动 Taq 酶 1.25 U, MgCl₂ 1.5

表 1 引物序列、位置以及扩增片段的编号、大小、GC 含量

片段编号	引物序列	所在位置	扩增片段大小	扩增片段 GC 含量
1	F:CCCTCCAGGGATCAGATGAC R:TGAGTTCCTGCAGCCTTCAC	5'非翻译区 内含子 1	862bp	67%
2	F:GCCATCAGACCCTTCCTCAC R:AGGCTCAGAGGATGCAGAGG	内含子 1 内含子 2	398bp	59%
3	F:TTCTAGATGCCCGCATAACC R:GAAGGTCGGGATCAGGTGAG	内含子 2 内含子 5	1193bp	55%
4	F:TGCATACACCCACTCATAACCC R:CAGTGCCTCGTGAACCAAG	内含子 5 3'非翻译区	1513bp	56%

mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, 上游及下游引物各 0.25 μ mol/L。PCR 循环条件为:94℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 53℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min 30 s, 共 40 个循环,最后 72℃延伸 5 min。对 PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 去离子甲酰胺对 PCR 扩增效率影响的分析 采用 Image J 软件分别测量不同去离子甲酰胺浓度条件下扩增出的 4 条目标带的光强度值。然后采用 SPSS Statistics 20.0 软件进行单因素方差分析,比较不同浓度下目标带的光强度值差异。

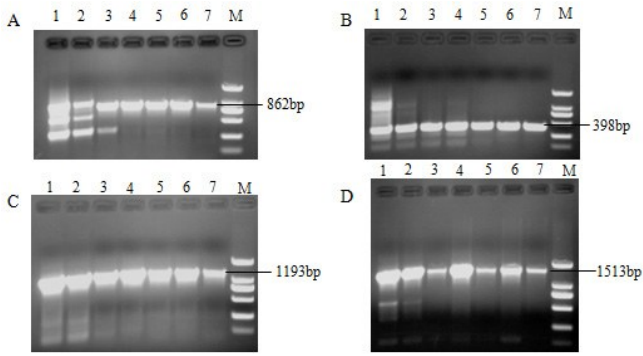
1.2.6 测序分析 挑选 4 个目标带的特异性扩增产物,经 PCR 清洁试剂盒纯化后进行测序分析。

2 结果

2.1 不同浓度去离子甲酰胺条件下 *CYP27A1* 基因的扩增结果

2.1.1 片段 2 的扩增结果 在反应体系中不含去离子甲酰胺和去离子甲酰胺浓度为 1%~8%时,均扩增出目标带,但浓度为 7%和 8%时,目标带明显减弱。浓度为 9%和 10%时,未扩增出目标带。在反应体系中不含去离子甲酰胺和去离子甲酰胺浓度为 1%~3%时可见非特异性条带,浓度为 4%~8%时,未见非特异性带。

2.1.2 片段 1、3、4 的扩增结果 在反应体系中不含去离子甲酰胺和去离子甲酰胺浓度为 1%~6%时,均扩增出目标带;在反应体系不含去离子甲酰胺时,扩增产物均存在非特异性带,当去离子甲酰胺浓度为 3%~6%时,均未见非特异性条带,见图 1。



注:图 A:片段 1 的扩增结果;图 B:片段 2 的扩增结果;图 C:片段 3 的扩增结果;图 D:片段 4 的扩增结果; M 为 DL2000 DNA Marker;图 A、B、C、D 中第 1 至第 7 泳道对应的去离子甲酰胺浓度均依次为 0、1%、2%、3%、4%、5%、6%。

图 1 不同浓度去离子甲酰胺条件下热启动 PCR 扩增 CYP27A1 基因 4 个目标片段的结果

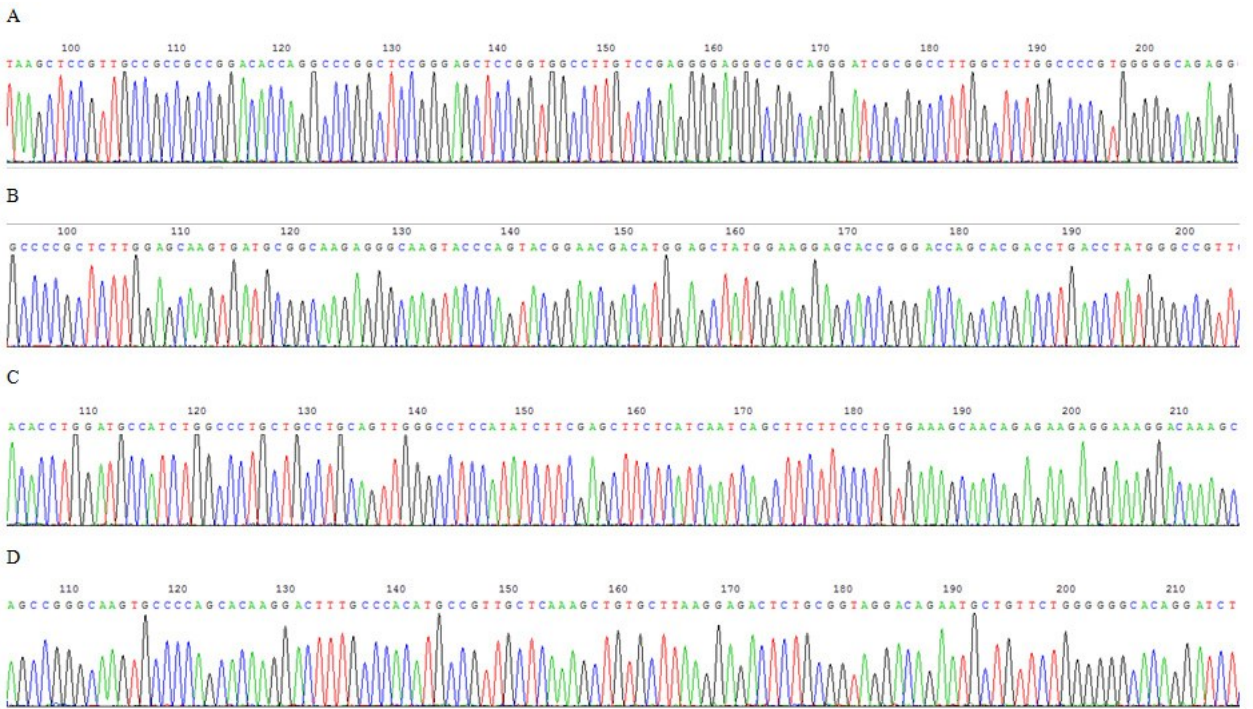
2.2 不同去离子甲酰胺浓度条件下扩增产物中目标带光强度值的比较结果 经单因素分差分析,去离子

甲酰胺浓度在 0、1%、2%、3%、4%、5%、6% 条件下扩增出的目标带光强度值无明显差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 不同去离子甲酰胺浓度下扩增 CYP27A1 基因目标带的光强度值比较

去离子甲酰胺浓度	n	光强度值	F	P
0	4	331356.75±96121.93	1.599	0.197
1%	4	277122.00±102608.76		
2%	4	234527.75±89422.63		
3%	4	302797.25±88972.93		
4%	4	229004.75±83194.86		
5%	4	254868.50±56835.91		
6%	4	173274.50±42795.63		

2.3 DNA 测序结果 CYP27A1 基因 4 个目标带的特异性扩增产物经测序分析和 NCBI 网站 BLAST 比对验证为目标序列,见图 2。



注:图 A:片段 1 的测序结果;图 B:片段 2 的的测序结果;图 C:片段 3 的的测序结果;图 D:片段 4 的的测序结果。

图 2 CYP27A1 基因 4 个目标片段的测序结果

3 讨论

采用 PCR 扩增目标基因然后进行测序分析是基因检测或诊断中常用的一种简便而经济的方法。在使用 PCR 扩增高 GC 含量的 DNA 片段时,可能因为退火时模板易形成链内的二级结构而出现产量低、特异性低的问题^[4-6]。由于甲酰胺能够减弱核苷酸之间的氢键,消除局部的二级结构,Sarkar G 等^[4]在扩增 GC 含量为 55% 的 DRD2 基因片段时,为了提高特异性,

最先在 PCR 反应体系中加入甲酰胺,使其终浓度分别为 1.25%、2.5%、5%、10%,结果发现甲酰胺浓度为 5% 时不仅提高了扩增的效率,而且完全消除了非特异性带,而当甲酰胺浓度为 10% 时,未扩增出目标片段。之后相继有学者报道一定浓度的甲酰胺可以提高高 GC 比片段扩增的效率和特异性,但不同研究结果所显示的甲酰胺在 PCR 反应体系中的最佳使用浓度存在差异,有 3%、4% 和 5%^[6-8]。Strien J 等^[9]在分别使用

HotStarTaq 聚合酶、DAp GoldStar[®] DNA 聚合酶、OneTaq[®] DNA 聚合酶并添加甲酰胺的情况下扩增 GC 比分别为 56% 和 82% 片段时,未获得成功,因而不建议甲酰胺作为 PCR 添加剂时与这些酶联用。本研究在扩增 CYP27A1 基因 4 个高 GC 含量的片段时,为了提高 PCR 反应的特异性,在 Mg²⁺ 浓度为 1.5 mmol/L 的情况下,首先采用了热启动 PCR 方法,结果均扩增出目标带,但 4 个目标带的扩增均见非特异性条带。为进一步提高反应的特异性,我们向反应体系中添加不同浓度的去离子甲酰胺,结果发现扩增的特异性明显增强,当去离子甲酰胺的终浓度为 4%、5% 和 6% 时,4 个片段的扩增均完全消除了非特异性带。为进一步了解去离子甲酰胺的浓度是否会影响目标带的扩增效率,我们采用了 Image J 软件测量反应体系中不含去离子甲酰胺以及去离子甲酰胺浓度为 1%、2%、3%、4%、5%、6% 7 种情况下 4 个目标条带的光强度值,比较不同浓度下目标带的光强度值差异,结果显示无明显差异,提示去离子甲酰胺浓度在 6% 及以下时,对热启动 PCR 的扩增效率无影响。而当我们去离子甲酰胺的浓度增加至 7% 或 8% 来扩增 CYP27A1 基因片段 2 时,目标带明显减弱;增至 9% 或 10% 时,PCR 反应完全被抑制,这一结果与 Sarkar G 等^[4] 在 10% 的甲酰胺浓度下未扩增出目标带以及 Kovárová M 等^[7] 报道的 2M(相当于 8%)的甲酰胺可导致 PCR 扩增效率下降 90% 相似。综合 CYP27A1 基因 4 个片段的扩增结果及已有的报道,我们认为采用热启动 PCR,同时向反应体系中添加去离子甲酰胺能有效扩增出高 GC 含量的 DNA 片段,同时避免非特异性带的产生,但反应体系中去离子甲酰胺的浓度宜控制在 4%~6%。这一方法不仅适用于脑腱黄瘤病

的致病基因—CYP27A1 基因的检测,也可用于其他富含 GC 的基因的检测。

参考文献:

- [1] Toro CJ, Marín PJB, Enríquez DMB. Cerebrotendinous xanthomatosis: the diagnostic challenge [J]. *Med Clin (Barc)*, 2019, 152(3):123-124.
- [2] Salen G, Steiner RD. Epidemiology, diagnosis, and treatment of cerebrotendinous xanthomatosis (CTX) [J]. *J Inher Metab Dis*, 2017, 40(6):771-781.
- [3] Yunisova G, Tufekcioglu Z, Dogu O, et al. Patients with lately diagnosed cerebrotendinous xanthomatosis [J]. *Neurodegener Dis*, 2019, 19(5-6):218-224.
- [4] Sarkar G, Kapelner S, Sommer SS. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(24):7465.
- [5] Chakrabarti R, Schutt CE. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones [J]. *Gene*, 2001, 274(1-2):293-298.
- [6] Varadharajan B, Parani M. DMSO and betaine significantly enhance the PCR amplification of ITS2 DNA barcodes from plants [J]. *Genome*, 2021, 64(3):165-171.
- [7] Kovárová M, Dráber P. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(13):E70.
- [8] Kaiser R, Tremblay PB, Roots I, et al. Validity of PCR with emphasis on variable number of tandem repeat analysis [J]. *Clin Biochem*, 2002, 35(1):49-56.
- [9] Strien J, Sanft J, Mall G. Enhancement of PCR amplification of moderate GC-containing and highly GC-rich DNA sequences [J]. *Mol Biotechnol*, 2013, 54(3):1048-1054.

收稿日期:2021-04-17;修回日期:2021-05-17