

VIPR2 拷贝数变异检测方法的建立及应用*

袁建民, 金春慧, 俞 水, 王继东[△](南京医科大学附属无锡市精神卫生中心, 江苏无锡 214151)

【摘要】 目的 建立 VIPR2 基因拷贝数变异检测方法, 并应用于 VIPR2 拷贝数变异与精神分裂症的相关性研究中。**方法** 将 2010 年 11 月至 2012 年 8 月南京医科大学附属无锡市精神卫生中心收治的 310 例精神分裂症住院患者纳入精神分裂症组, 同期选择 300 例健康志愿者纳入健康对照组。采用多重竞争性实时荧光定量聚合酶链反应法, 对 610 例受试者进行 VIPR2 微重复分析。**结果** 精神分裂症组中 VIPR2 拷贝数变异检测阳性率为 0.97%(3/310), 健康对照组 VIPR2 拷贝数变异检测阳性率为 0.00%(0/300), 两组比较差异无统计学意义($\chi^2=1.275, P=0.259$)。**结论** 多重竞争性聚合酶链反应法能对多位点拷贝数变异进行快速分型, 是验证拷贝数变异的有效方法。

【关键词】 精神分裂症; VIPR2 基因; 拷贝数变异; 多重竞争性实时荧光定量聚合酶链反应法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.20.011 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)20-2824-04

Establishment and application of VIPR2 copy number variation detection method* YUAN Jian-min, JIN Chun-hui, YU Shui, WANG Ji-dong[△] (Mental Health Center in Wuxi City Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu 214151, China)

【Abstract】 Objective To establish a method detecting VIPR2 copy number variation, and to apply it in the analysis on the relationship between VIPR2 copy number variation and schizophrenia. **Methods** A total of 310 patients with schizophrenia from Nov. 2010 to Aug. 2012 in Mental Health Center in Wuxi City Affiliated to Nanjing Medical University were selected into schizophrenia group, and 300 healthy people were recruited into control group. Polymerase chain reaction (PCR) method were used to analyze the VIPR2 copy number. **Results** The positive rate of VIPR2 copy number variation in the schizophrenia group and control group were 0.97%(3/310) and 0.00% respectively, and there was no significant difference between the two groups ($\chi^2=1.275, P=0.259$). **Conclusion** PCR could be an effective method to confirm VIPR2 copy number variation.

【Key words】 schizophrenia; VIPR2 gene; copy number variation; polymerase chain reaction method

拷贝数变异 (CNV) 是由基因组发生重排而导致的, 一般指长度为 1 000 pb 到数百万 pb 的基因组大片段的拷贝数增加或减少, 主要表现为亚显微水平的缺失、重复、插入和复杂多位点变异, 是基因组结构性差异的常见形式, 也是继单核苷酸多态性后又一个重要的基因标记物。国外已有许多关于 VIPR2 重复与精神分裂症相关的报道^[1-2], 而国内虽然已有关于 CNV 的临床报道^[3-5], 但关于精神分裂症与 VIPR2 基因 CNV 的相关报道比较少见。本研究运用多重竞争性实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 技术, 建立了一种简单廉价、中通量的 VIPR2 CNV 检测方法。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2010 年 11 月至 2012 年 8 月本院收治的 310 例精神分裂症住院患者纳入精神分裂症组。其中男 162 例, 女 148 例; 年龄 35~68 岁, 平均年龄 (46.4±12.3) 岁; 所有患者符合美国精神障碍诊断与统计手册第四版 (DSM-IV) 精神分裂症诊断标准。同期选择 300 例健康志愿者纳入健康对照组, 其中男 153 例, 女 147 例。健康对照组患者与精神分裂症组患者无血缘关系, 无精神疾病史及精神疾病家族史, 无严重躯体疾病、脑器质性疾病及药物滥用与依赖史。两组间一般资料比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 组间具有可比性。

1.2 仪器与试剂 血液基因组 DNA 提取试剂盒由杭州爱思进生物技术有限公司提供, 5 U/ μ L Taq 酶由 Qiagen 公司提

供, 2 mmol/each dNTP 由 Promega 公司提供, 9600 型 PCR 仪由珀金埃尔默公司提供, MJ PTC-200 梯度 PCR 仪由 Bio-Rad 公司提供, 3730 型核酸测序仪由 ABI 公司提供, JY600+电泳仪由北京君意东方电泳设备有限公司提供, FR-200A 全自动紫外与可见光分析仪由上海复日科技有限公司提供。Gene-mapper V4.0 片段分析和基因分型软件由美国应用生物系统公司提供, Bio Photometer 核酸蛋白检测仪由 Eppendorf 公司提供。

1.3 方法

1.3.1 外周血 DNA 提取 采用乙二胺四乙酸二钾 (EDTA-K₂) 真空采血管采集所有受试者 5 mL 静脉血, 全基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA 样本, 操作严格按照试剂盒说明书进行。电泳法检测 DNA 样本, 并在核酸检测仪上进行定量, 统一标化、分装, 终浓度为 10 ng/ μ L。

1.3.2 引物设计与合成 (1) 检测区段的选择。基因数据库中下载 VIPR2 基因序列, 采用 Primer Express3.0 软件设计 3 个引物, 其中 2 个引物序列与文献[1]中 2 个引物序列基本重叠, 另一个引物序列自行设计, 且位于前 2 个引物序列之间, 以增加检测密度, 提高拷贝数变异的检出率。(2) 参考基因片段的选定。利用 Primer Express3.0 软件设计内参引物, 分别在 Chr5、Chr10、ChrX 染色体上选取某一序列, 并对其进行同源比对以保证序列特异性, 在 USCS 数据库中查询以确保没有

* 基金项目: 江苏省无锡市科技局科研项目 (CSZON1316); 江苏省无锡市卫生局卫生科研项目 (Q201208)。

作者简介: 袁建民, 男, 本科, 副主任技师, 主要从事精神疾病的遗传学研究。 [△] 通讯作者, E-mail: 12589345@qq.com。

CNV 报道,然后将该区段设置为参考序列。(3)引物合成。3 个检测区段及 3 个参考片段的引物均委托上海生工生物工程公司合成。引物序列,见表 1。

片段的竞争性 PCR 模板根据各自引物的扩增产物进行设计,并在其中插入 2 个碱基,最终由上海生工生物工程公司做全基因合成。模板序列,见表 2。

1.3.3 竞争性模板的设计与合成 3 个检测片段和 3 个参考

表 1 3 个检测区段及 3 个参考片段引物序列及产物大小

位点名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	产物大小(pb)
VIPR2-1	FAM-ATC ATC CTG GTG TGC TCC TC	AAT GCA CAG ATA CGC TGG TG	170
VIPR2-2	FAM-CTG GGA ACG TCT CTG ACC AT	GGA CTA GGA GGG CAA GGA AG	217
VIPR2-3	FAM-AAG CTT CCA GGC AAT GAG TG	CTG GAG GAA TTC CCA GCA TA	247
Chr5	FAM-TGA TCC TAC TAC ACG GCA GA	CAG CTT TAG AGT GTG GCA ATA G	348
Chr10	FAM-CCG TGT TAA CCA GGA TAG TCT	TGT ATT GAC TCT ATG GAC CAT TG	149
ChrX	FAM-CTG GAT AGG GAG CTC AGT GG	CCA CTT CCA TTC CAC ATC CT	372

表 2 6 个竞争性 PCR 模板序列及产物大小

位点名称	全基因合成竞争性 PCR 模板序列	产物长度(pb)
VIPR2-1	ATC ATC CTG GTG TGC TCC TCC ATC CTT CCA CCT TCC TGA TCA TGT GGA CCT CTA ATT CCT TCA CCT TCA TCT CCC TCC CATT AGG AGA ATC TTC CCT AGC GGA TTA TCC TTT AGA ACT TAA AGA ACT TGG AGA CCC AAT CGC CAT CCC CAG GCA CCA GCG TAT CTG TGC ATT	172
VIPR2-2	CTG GGA ACG TCT CTG ACC ATC CGT CAC TCG TAC AGT TTT TGC TTA TGT TTC CTG GAA AGT GAA GTT CAG ATA TTT TAT CTG CAA GTC CAT GAA AAC TGG CCT TAG AAG GGA CCT TAG TCC GTG CTG AGC CCG TGC TCT ATA TTA AAA TGC TTC CCA CAC CCA GGG GTC AGC TAG GAG ACA GGA CTG CCA CTC AAA AAA CCT TCC TTG CCC TCC TAG TCC	219
VIPR2-3	AAG CTT CCA GGC AAT GAG TGA CTT TTC AAT GTA GAC TGG CAG TGG TGG CTT CCT AAT TTT TGC TTG AAA ATC AGC TTA GTC TCC TGA AAA AGA CAC TGT AGA CTA AGT CGT TCA GAA AAA CGG ACC CTG TGA TGG TGA TCA GCC TTC CGA CAT TTC TGA GGC TTC ACA GCA TTT TCA ACG GAA TAC ACA GGG TTT GGG AAA GGC TGC TGC TTG AAC AAG TTC TTA CCG GTA TGC TGG GAA TTC CTC CAG	249
Chr5	TGA TCC TAC TAC ACG GCA GAC ACT GCT GTA CTA GGA TTG TCT TAT TCA ATT TAC TTA AGG TCT ATG GTT ATC TGA TTC TAC CGT TTA AGA AGC AGA AGC TAA GGA GAC AAC AAG TCA AAC ATA CAG TTC TGG AAA ATA AGT TAT TAA ACA TAT ATT TCT GAT GTT CTA TAT GGG TAC TGT CAC CAG AGA AAG ACT AGA AAA GGT TCT CTG GGA TTT AGG TTT TAC CAC TGT GTA TTA GAT AGG CCA TAA TAA TAT ATT GCA TTA TAA CCT TCT TAT CAC TGT AGA AAG AAC TGT CAT CTT CAA AAT AGG TTC TGC CTG ACC TTT CCT CCT ATT GCC ACA CTC TAA AGC TG	350
Chr10	CCG TGT TAA CCA GGA TAG TCT CAA TCT CCT GAC CTT GTG ATC TGC CCG CCT CGA CCT CCC AAA GTG CTG GGA TTA CAG GCG TAT GAG CCA CCG CGC CCA GCC CCA TTA TTA CCA TTT TAA TGA CTA TCC AAT GGT CCA TAG AGT CAA TAC A	151
ChrX	CTG GAT AGG GAG CTC AGT GGC TTC TTG TGT AGT GGC AGC CTG AGT TGC TGC TGC TTC AAA TGA TAG GAC TTT CTC TTT CAT GGA TTC ACT TAC TCT TAA TTT AGA ATA ACA AAT TTT CAG CAG CTG TCG GGA GAA TAT GAT AAA CTG GGG TGC AAG ATG AGT GTA TAT CCA TGA TAA ATG AAA GTG CTT CTG CTT TTT ACA ACT ATC AAG AGA AAG GCA GAC AGT GGC AAG AAC AGA TGT GTG GGT TCA GAT TGT AGG GTA TAG GAA CCC CTT CCC TCT TCT TGA GCT TTA GAG CAG CAG CTA ATC CAG GTT GTT GTG TGT TTT TAT TTT TTG GCT TGT TTA TTT ACA CCT GAG AGG ATG TGG AAT GGA AGT GG	374

注:黑体带下划线的部分是插入的碱基。

1.3.4 PCR 反应体系与反应条件 (1)确定全基因竞争性模板的稀释梯度。全基因合成的 PCR 竞争性模板需分别与终浓度 10 ng/ μ L 的样本同时进行扩增,确定各个竞争性 PCR 的稀释梯度。(2)PCR 反应体系。PCR 反应总体系为 20 μ L,包括 1 $\times$ 缓冲液 2 μ L,3 mmol/L MgCl₂ 2.4 μ L,2 mmol/L dNTP 2 μ L,Taq 酶 1 U,稀释后竞争性模板 1 μ L,样本 DNA 模板 1 μ L,1 pmol/ μ L 引物混合液 2 μ L,ddH₂O 补足至 20 μ L。循环参数:预变性 95 $^{\circ}$ C 2 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,59 $^{\circ}$ C 90 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,27 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.3.5 检测 取多重 PCR 扩增产物 2 μ L,15 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离,3730 型核酸测序仪进行检测,Genemapper V4.0 软件获取各位点相应的峰面积数据进行计算。

1.3.6 计算 a1、a2、b1、b2 分别表示分型样本的检测位点峰面积、检测位点竞争性 PCR 模板峰面积、Chr10 参考片段峰面积及其竞争性 PCR 模板峰面积;A1、A2、B1、B2 分别表示已知拷贝数样本的检测位点峰面积、检测位点竞争性 PCR 模板峰面积、Chr10 参考片段峰面积及其竞争性 PCR 模板峰面积。分型样本检测位点拷贝数计算公式为:[(a1/a2)/(b1/b2)]/[(A1/A2)/(B1/B2)]。

1.3.7 质量控制 (1)本试验用 Chr5、Chr10 及 ChrX 的保守片段序列作为内参,选择 Chr10 试验数据作为内参进行计算,Chr5 试验数据可作为质量控制,因为二者的拷贝数相同;另

外,男性被检者 ChrX 为 1 拷贝,试验结果应接近 1,女性被检者 ChrX 为 2 拷贝,试验结果应接近 2,通过被检者性别差异可判断试验结果的可靠性。(2)在每个检测区段设置相对应的竞争性 PCR 模板,二者仅在序列长度上(2 个碱基的插入)存在一些差异,因此在 PCR 反应过程中,两组模板的扩增效率接近一致。两者扩增产物的比值可以直观地反映待测样本和参考片段初始模板量的比值。(3)在进行 CNV 分型试验时,需每板 PCR 样本中加入 1 个已知分型结果的样本,该样本经过微阵列比较基因组杂交(aCGH)试验已获取全基因组 CNV 数据。结果计算时,每个样本与其进行比较,保证试验结果的可比性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理及统计学分析,计数资料采用百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结 果

精神分裂症组 VIPR2 拷贝数变异检测阳性率为 0.97% (3/310),健康对照组 VIPR2 拷贝数变异检测阳性率为 0.00% (0/300),两组比较差异无统计学意义($\chi^2 = 1.275, P = 0.259$)。3 个 VIPR2 拷贝数变异检测位点,Chr5、Chr10、ChrX 检测区段及其相对应竞争性 PCR 模板,经多重 PCR 扩增,产物经电泳分离并通过 Genemapper V4.0 软件获取各位点相应的峰面积数据,分型截图见图 1。

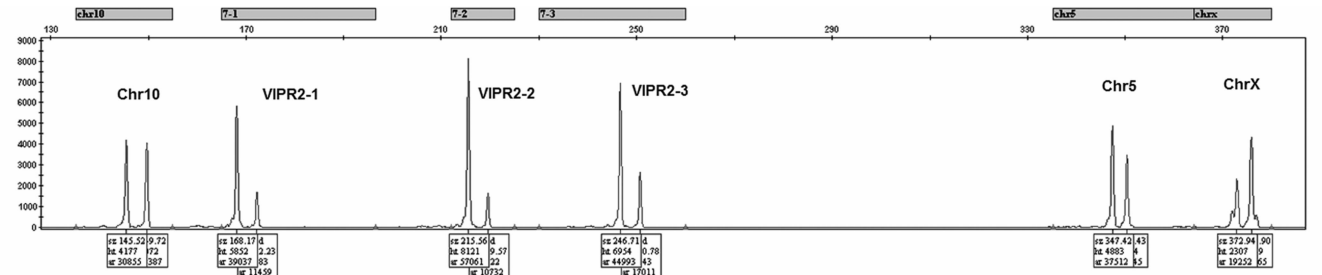


图 1 各位点及相应竞争性模板分型截图

3 讨 论

VIPR2 基因位于 7q36.3,起于 158513627,止于 158630410,全长 116 783 pb。VIPR2 基因编码 VPAC2 受体,VPAC2 是由血管活性肠肽(VIP)的首字母 V 和垂体腺苷酸环化酶活性肽(PACAP)前三个字母 PAC 合并而成。VPAC2 受体是前面两个神经肽的共同受体,PACAP、VIP 与 VPAC2 结合,受体蛋白构象发生改变而活化,经鸟苷酸结合蛋白介导激活腺苷酸环化酶,引起细胞内环腺苷酸(cAMP)水平增高,从而激活 cAMP 依赖的蛋白激酶,导致细胞产生一系列代谢变化,介导 PACAP、VIP 的生物效应。有研究发现 VIP、PACAP 与精神分裂症相关^[6-8],文献^[1-2]几乎同时报道了 VIPR2 拷贝数重复与精神分裂症相关,因此,VPAC2 被认为可能成为治疗精神分裂症潜在的靶位点,VIPR2 基因也成为精神分裂症研究的新热点。

拷贝数变异的检测方法主要有基于芯片的 CNV 检测技术与 PCR 技术两大类。基于芯片的 CNV 检测技术主要包括 aCGH 和单核苷酸多态性芯片^[9-10],这两种技术有利于发现与疾病有关的新的拷贝数变异,但由于成本高而限制了两种技术的广泛使用。PCR 技术主要包括实时荧光定量 PCR 法与多重 PCR 法两种。针对已知单个目的 DNA 区段的拷贝数变异,通常采用实时荧光定量 PCR 法,该方法准确性高,但检测通量低,只能对单一的位点进行检测。而对与疾病相关的已知多区

段多位点拷贝数变异的验证与分析,通常采用多重 PCR 法,主要有多重连接探针扩增 (MLPA) 和多重可扩增探针杂交 (MAPH)^[11-12],MLPA 及 MAPH 探针设计灵活,可同时检测多个位点;探针较小(100~500 pb),可检测微缺失和微重复;操作简单,设备要求低,一般实验室均能开展。鉴于多重 PCR 法的优点,本研究使用多重竞争性 PCR 法快速、准确地检测 VIPR2 拷贝数变异。

VIPR2 微重复是与精神分裂症相关的罕见变异。Vacic 等^[1]采用 Affymetrix SNP Array 6.0 方法检测 VIPR2 拷贝数变异,研究结果显示精神分裂症组与健康对照组的 VIPR2 拷贝数阳性率分别为 0.35% (29/8 290)、0.03% (2/7 431),两组比较差异有统计学意义($P=4.0\times10^{-5}$)。Levinson 等^[2]采用同样的方法,结果显示精神分裂症组与健康对照组的 VIPR2 拷贝数阳性率分别为 0.25% (10/3 945)、0.01% (2/2 3611),两组比较差异有统计学意义($P=0.03$)。本研究结果与上述两研究比较,VIPR2 拷贝数变异阳性率略高,这可能是由于抽样误差造成的。精神分裂症组拷贝数阳性率高于上述两研究,但与健康对照组相比,比较差异无统计学差异($P=0.259$),是因为这种罕见变异需要在更大的样本数中才能有统计效率。

本研究对 3 种精神分裂症患者 VIPR2 拷贝数变异进行了成功验证,并且这一方法是由 aCGH 试验获得的已知拷贝数推算而来,结果真实可靠。因此,多重竞争性 PCR 法用于多位

点拷贝数变异分型,简便快速,可用于相关疾病的大样本罕见拷贝数变异的验证分析。

参考文献

[1] Vacic V, McCarthy S, Malhotra D, et al. Duplications of the neuropeptide receptor gene VIPR2 confer significant risk for schizophrenia[J]. *Nature*, 2011, 471(7339): 499-503.

[2] Levinson DF, Duan J, Oh S, et al. Copynumber variants in schizophrenia: confirmation of five previous findings and new evidence for 3q29 microdeletions and VIPR2 duplications[J]. *Am J Psychiatry*, 2011, 168(3): 302-316.

[3] 赵亚丽, 张克让, 许琪, 等. 代谢型谷氨酸受体 7 基因的拷贝数变异与精神分裂症的相关性[J]. *中国医学科学院学报*, 2009, 31(6): 664-668.

[4] 陈碧媛, 邹小兵, 章钧, 等. 中国儿童孤独症 SHANK3 拷贝数变异及临床表型特征[J]. *中华儿科杂志*, 2011, 49(8): 607-611.

[5] 张海南, 廖冰, 聂利珞, 等. PINK1 基因外显子拷贝数分析方法建立及应用[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2010, 27(2): 158-161.

[6] Katayama T, Hattori T, Yamada K, et al. Role of the PACAP-PAC1-DISC1 and PACAP-PAC1-stathmin1 systems in schizophrenia and bipolar disorder: novel treatment mechanisms[J]. *Harmacogenomics*, 2009, 10(12): 1967-1978.

[7] Matsuzaki S, Tohyama M. Regulation of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP, ADCYAP1; adenylyl cyclase-activating polypeptide1) in the treatment of schizophrenia[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2008, 12(9): 1097-1108.

[8] Moody TW, Ito T, Osefo N, et al. VIP and PACAP: recent insights into their functions/roles in physiology and disease from molecular and genetic studies[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2011, 18(1): 61-67.

[9] Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 1997, 20(4): 399-407.

[10] Pfeifer D, Pantic M, Skatulla I, et al. Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays[J]. *Blood*, 2007, 109(3): 1202-1210.

[11] Schouten JP, Mcelgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(12): 57.

[12] Armour JA, Sismani C, Patsalis PC, et al. Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(2): 605-609.

(收稿日期: 2014-03-12 修回日期: 2014-05-26)

(上接第 2823 页)

在预测 BMD 值的特异度和阳性预测率方面还需提高。本研究通过回归分析, 进一步发现二者的回归方程 r^2 仅为 0.2 左右, 由此推断 OSTA 运用于绝经后 T2DM 患者骨质疏松的初筛可能存在较大的漏诊率, OSTA 并不适合该人群。国内研究中也存在类似结论^[9]。因此, 基层医院可以采用多种简易筛查工具联合使用以提高骨质疏松的检出率。

综上所述, 本研究对 OSTA 指数与骨质疏松的相关性进行了分析, 其相关系数较低, OSTA 指数作为绝经后 T2DM 患者骨质疏松疾病筛查工具尚需进一步研究。且本研究仅纳入了体质量和年龄两个危险因素, 纳入样本较少, 在研究结果方面存在一定的局限性, 因此在筛选 T2DM 骨质疏松的工具方面还有待深入研究。

参考文献

[1] Kung Aw, Ho Ay, Ross Po, et al. Development of a clinical assessment tool in indentifying Asian men with low bone mineral density and comparison of its usefulness to quantitative bone ultrasound[J]. *Osteoporos Int*, 2005, 16(7): 849-855.

[2] Koh LKH, Ben W, Sedrine A. Simple tool to identify asian women atIncreased risk of osteoporosis[J]. *Osteoporos Int*, 2001, 12(8): 699-705.

[3] 张萌萌, 张维奇, 梁斌斌, 等. 13629 例女性初潮年龄, 生育次数, 绝经年龄, 绝经年限于骨密度相光性研究[J]. *中国*

骨质疏松杂志, 2010, 16(3): 170-172.

[4] 吴秀云. 原发性骨质疏松危险自我测评工具筛检效果系统评价[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(12): 1102-1105.

[5] Ensurd KE, Ewing MS, Stone kL, et al. Intentional and unintentional weight loss increase bone loss and hip fracture risk in older women[J]. *J Am Geriatr Soc*, 2003, 51(12): 1740-1747.

[6] Shuler FD, Conjeski J. Defining bone health and fracture risk in West Virginia: the World Health Organization FRAX assessment tool[J]. *W V Med J*, 2011, 107(5): 12-17.

[7] Lynn Hs, WooJ, Leung Pc, et al. An evaluation of osteoporosis, screening tools for the osteoporotic fractures in men(MrOs) study[J]. *Osteoporos Int*, 2008, 19(7): 1087-1092.

[8] Saetung S, Ongphiphadhanakul B, Rajatanavin R. The relationship of an Asian-specific screening tool for osteoporosis to vertebral deformity and osteoporosis[J]. *J Bone Miner Metab*, 2008, 26(1): 47-52.

[9] 黄琪仁, 章振林. 上海市绝经后妇女低骨量的简易筛选方法的建立和验证[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(12): 808-811.

(收稿日期: 2014-02-22 修回日期: 2014-05-27)