

• 论 著 •

高分辨率熔解曲线在 ABO 血型基因 526 位点单核苷酸多态性检测中的应用*

黄琬婷¹, 罗赛群², 曹微微¹, 覃婉元¹, 沈亚梅¹, 李碧娟¹, 李 宁^{1△}

(1. 中南大学湘雅医院输血科, 长沙 410008; 2. 中南大学生命科学学院生物学实验中心, 长沙 410078)

摘要:目的 建立高分辨率熔解(HRM)曲线检测 ABO 血型基因 526 位点单核苷酸多态性(SNP)的方法。方法 随机提取 35 例待检血型标本的 DNA, 运用 HRM 曲线检测 ABO 血型基因 526 位点的 SNP, 通过 PCR-DNA 测序以及血型血清学试验验证 HRM 检测结果的准确性。结果 35 例血型标本中, 共检出 526 位点杂合子 13 例, 纯合子 22 例。经测序分析和血清学试验验证 13 例 G/C 杂合中 B 型 8 例、AB 型 5 例, 22 例 CC 纯合子中 A 型 10 例, O 型 12 例。HRM 法检测结果与测序结果及血清学结果相符。结论 HRM 法是一种低成本、简便、准确的 SNP 检测技术, 有望成为临床 ABO 血型基因分型的新方法。

关键词: 高分辨率熔解; ABO 血型; 单核苷酸多态性; 测序

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.18.006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)18-2567-03

SNP detection of 526 locus in ABO gene with high resolution melting curve*

HUANG Wanting¹, LUO Saiqun², CAO Weiwei¹, QIN Wanyuan¹, SHEN Yamei¹, LI Bijuan¹, LI Ning^{1△}

(1. Department of Blood Transfusion of Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China;

2. Biological Experiment Center, Life Science College, Central South University, Changsha, 410008, China)

Abstract: Objective To establish a method for detecting single nucleotide polymorphism(SNP) of 526 locus in ABO gene by using high resolution melting(HRM) curve. **Methods** Genomic DNA was extracted from blood samples of 35 individuals randomly, whose ABO blood types were going to be detected. The HRM method was then used to test the polymorphism at 526 gene locus of genomic DNA in 35 individuals. The accuracy of results was further verified by PCR-DNA sequencing and ABO blood type serological test. **Results** Among 35 samples, 13 cases were heterozygote and 22 cases were homozygote. Verified by sequencing and serological tests, 13 cases of G/C heterozygote included 8 cases of B blood type and 5 cases of AB blood type respectively, while 22 cases of CC homozygote included 10 cases of A blood type and 12 cases of O blood type. The results of HRM analysis were consistent with the results of DNA sequencing and serological tests. **Conclusion** The HRM method is accurate, convenient, efficient and economical, which is expected to be a new method for genotyping ABO blood group.

Key words: high resolution melting; ABO blood type; single nucleotide polymorphism; sequencing

近年来,随着 ABO 血型分子水平研究的逐步深入,越来越多的研究认为单核苷酸多态性(SNP)是导致 ABO 表型的改变或者亚型的一个关键原因^[1-3]。当前血型检测主要使用的血清学方法无法检测血型的基因型,在抗原减弱、正反定型不合等情况下它具有局限性^[4-5]。因此建立一个有效的检测 ABO 血型基因 SNP 的方法,对于确定疑难血型、指导临床用血、司法鉴定等领域都具有重要意义。高分辨率熔解(HRM)曲线是一种新的 SNP 和突变研究工具,因其操作简便、成本低、通量高而成为当前常用来检测 SNP 新的有效方法。该技术不需要探针,只需在反应中加入饱和荧光染料,整个过程闭管操作,避免了污染^[6],而且更易于检测单碱基突变、小片段插入或缺失^[7],可以根据 ABO 血型系统各血型分子基础上的差异,通过检测 SNP 来确定 ABO 血型。现已有文献报道 HRM 在某些人类血型,如 Duffy, Kidd 检测中的应用^[8],但在 ABO 血型检测中的应用未见报道。本文旨在建立检测 ABO 血型基因 526 位点 SNP 检测的 HRM 法,为 ABO 血型基因分型奠定实验基础,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 随机选取本院 2014 年 10~12 月 35 例拟进行血型检测的标本。

1.2 仪器与试剂 全血基因组 DNA 提取试剂盒购自康为世纪公司, Nanodrop2000 微量蛋白核酸检测仪为赛默飞世尔科技公司产品, 荧光定量 PCR 仪为 ABI Vii7 实时荧光定量 PCR 仪。HRM 试剂 MeltDoctor HRM Master Mix, 购自赛默飞世尔科技公司, 琼脂糖为 life 公司产品。血型卡为瑞士达亚美公司生产的凝胶卡, 反定型红细胞试剂由本实验室配制。

1.3 方法

1.3.1 DNA 抽提和定量 用全血基因组 DNA 提取试剂盒提取全血 DNA, 严格按照试剂说明书进行。DNA 浓度和纯度通过 Nanodrop2000 微量蛋白核酸检测仪检测, A260/A280 为 1.7~2.0, 并经琼脂糖凝胶电泳鉴定合格的 DNA 样本, 浓度统一调整到 20 ng/ μ L 作为反应模板, 于 -20 °C 保存备用。

1.3.2 引物设计及合成 NCBI 上查找 ABO 基因序列, 使用 primer premier5.0 软件设计针对 526 位点的 HRM 特异性引物, 引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。引物序列为 F: 5'-CGC GTG ACG CTG GGG ACC GGT C-3', R: 5'-GAA GCG CCG CTC GCA GAA GTC AC-3'。

1.3.3 普通温度梯度 PCR 在进行 HRM 之前首先通过普通温度梯度 PCR 进行退火温度的摸索。根据引物解链温度(Tm)值, 将温度梯度设为 6 个, 依次为 57、58、60、62、64、66

* 基金项目: 中南大学中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2015zzts304)。

作者简介: 黄琬婷, 女, 在读研究生, 主要从事临床检验诊断学的研究。△ 通讯作者, E-mail: nxli1970@126.com。

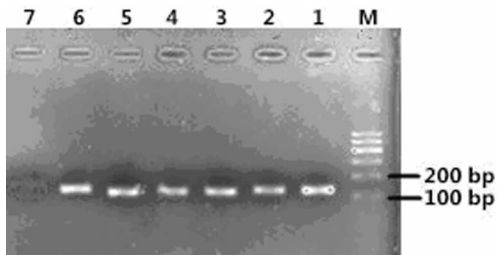
℃。PCR 体系为 20 μL,组成如下:2×GC 缓冲液 10 μL,2 μL dNTP(2.5 mmol/L),正、反向引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,1 μLDNA,0.2 μL LaTaq 酶,6 μL ddH₂O。PCR 反应程序:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 30 s,退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,35 个循环;72 ℃延伸 5 min。产物于 1.8% 琼脂糖凝胶电泳,150 V 恒压电泳 30 min,置于凝胶成像系统下观察拍照,根据电泳条带的清晰度和特异性确定退火温度。将 PCR 产物送华大基因科技股份有限公司进行测序验证。

1.3.4 HRM 检测 HRM 反应选用 20 μL 体系,其中 Melt-Doctor HRM Master Mix 10 μL,正反向引物(10 μmol/L)各 0.8 μL,DNA 模板 1 μL,ddH₂O 7.4 μL。HRM 检测按照 ABI Vii7 内置参数,熔解曲线数据收集 60~95 ℃的荧光信号,0.05 ℃/s。

1.3.5 血型血清学实验 将上述标本采用微柱凝胶试验检测血型,方法按照标准操作流程进行^[9]。取血型凝胶卡一张,标注患者姓名及编号,正定型孔、Rh D 孔及 Ctrl 孔分别加入 0.8% 患者红细胞悬液 50 μL;反定型孔先分别加入 A、B 标准红细胞悬液 50 μL,然后加入患者血清 100 μL,卡式离心机 1 000 r/min 离心 10 min 后观察结果。

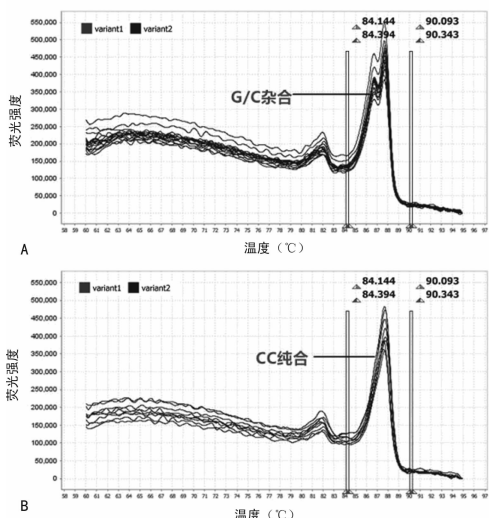
2 结 果

2.1 普通 PCR 普通 PCR 后电泳检测产物,目的片段长度为 120 bp,1~6 各泳道均能扩增出目的条带,条带清晰,特异性好,泳道 7 为阴性对照。泳道 6 扩增条带最清晰明亮,故选取 66 ℃为退火温度,见图 1。



注:1~6 泳道的 PCR 退火温度依次为 57、58、60、62、64、66 ℃;7 泳道为阴性对照。

图 1 普通 PCR 产物的电泳检测



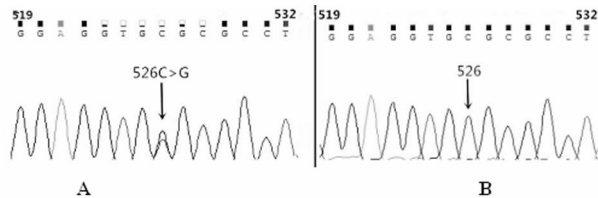
注:A 为 G/C 杂合子(双峰);B 为 CC 纯合子(单峰)。

图 2 HRM 曲线分析

2.2 HRM 检测 A 型(A101 和 A102)和 O 型(O01 和 O02) 526 位点为 C,而 B 型(B101)526 位点为 G。35 例血型标本

中,526 位点共检出 G/C 杂合子 13 例,CC 纯合子 22 例。本实验未发现 GG 纯合子。HRM 分析见图 2。

2.3 基因测序结果及血清学结果 部分 PCR 测序结果见图 3。结合血型血清学结果,13 例 G/C 杂合子中 B 型 8 例,AB 型 5 例;22 例 CC 纯合子中 O 型 12 例,A 型 10 例。测序结果、血清学结果与 HRM 结果一致。



注:A 为 G/C 杂合子;B 为 CC 纯合子。

图 3 部分基因测序结果

3 讨 论

HRM 分析是新近发展起来的高效基因检测技术,可以检测扩增模板中的序列变化。该方法是通过检测与双链 DNA 结合的饱和荧光染料在变性升温过程中随着 DNA 解链时游离到体系中发生的荧光强度的减弱而实现的。与传统 PCR 以及测序相比,HRM 法更为灵敏,并能有效检测特定位点的突变^[10]。ABO 基因位点定位于人类 9 号染色体上,有 A、B、O 3 个等位基因。它们的差别在于单个碱基的变化,即 O 基因缺失 cDNA 第 261 位核苷酸(G),A 基因和 B 基因在 cDNA 的第 297、526、657、703、769、803、930 等位点核苷酸有多态性^[11]。因此检测出这些位点的 SNP 有助于正确鉴定 ABO 血型。目前存在的检测基因突变或 SNP 的方法较多,包括测序、Taqman 探针法、单链构象多态性分析法等。新近报道的 HRM 法与这些方法相比,具有灵敏度高、特异性强、高通量和成本低廉等优点,非常适合单个碱基或几个碱基的变化检测^[12]。

基于上述遗传学基础,本课题组针对 ABO 基因的 526 位点设计了 HRM 序列特异性引物。据 NCBI 上查找到的 ABO 基因序列,A101、A201 型及 O01、O02 型中 526 位点碱基均为 C,而在 B101 型则为 G。本研究 HRM 检测的 35 例标本的 ABO 血型基因 526 位点 SNP 的结果与基因测序结果完全一致,而且与该位点碱基应表达的血型表型也完全一致,表明 HRM 检测技术完全可以应用于 ABO 血型基因 SNP 位点的检测。同时也提示对于临床上血清学结果不明确的标本,HRM 法亦可用作辅助诊断手段,明确患者的 ABO 血型。如临床上多见的直接抗人球蛋白试验和间接抗人球蛋白试验均阳性的标本,ABO 血型的检测常常会受到影响,血清学方法操作繁琐,利用 HRM 方法可辅助实验室快速鉴定血型。仅单个 SNP(如 526 位点)即可鉴别其为杂合子或者纯合子,区别 B 型与其他血型。以便提高临床疑难 ABO 血型标本定型的准确性,确保临床输血安全。

虽然目前已经有较多的 ABO 基因分型方法,但大都检测费用昂贵,实验周期也较长。本实验建立的 HRM 方法仅再针对其他几个 ABO 基因的重要多态性位点设计引物就可以把绝大多数的临床标本进行基因分型。该方法可以在 2 h 左右完成标本的 ABO 血型基因分型,成本较低,操作简单,非常适合用于临床血清学定型有疑问标本的辅助判断。

本研究通过对 ABO 基因 SNP 已知位点进行检测,首次成功地建立了 ABO 基因 SNP 的 HRM 检测体系,并且验证了它的准确性和灵敏度。该方法对大多数临床疑难标本都将能够很好地进行分子定型,是一种非常实用、快捷的 ABO 血型基因定型手段,值得在临床输血相关实验室推广应用。(下转第 2572 页)

细胞亚群数量、功能和异常活化状态没有改变,特别是 Th1、Th2 和调节性 T 细胞的数量和功能没有明显改善,所以引起复发较多。比较而言,疏风清热、活血化瘀法调节了患者的淋巴细胞亚群数量和功能,改善了患者的免疫功能,纠正了异常活化状态,所以临床症状控制明显,复发较少且较轻。提高患者生活质量,防止病情反复。

综上所述,疏风清热、活血化瘀法治疗 HSP,对患者的外周血白细胞总数、淋巴细胞数、淋巴细胞亚群、Th1/Th2 及调节性 T 细胞的干预作用明显,对患者的免疫功能的调节作用明确,临床效果显著,极大地提高了临床诊疗能力。同时,可以早期纠正 HSP 的免疫功能紊乱状态,减少 HSP 的复发且减轻复发时的临床症状。值得临床关注和推广。

参考文献

- [1] Haxhinasto S, Mathis D, Benoist C. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4⁺ Foxp3⁺ cells [J]. *J Exp Med*, 2008, 205(3): 565-574.
- [2] 许洲斌, 曾萍, 曾华松, 等. 玉屏风散对儿童过敏性紫癜细胞亚群的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(2): 513-515.
- [3] Long M, Park SG, Strickland I, et al. Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor [J]. *Immunity*, 2009, 31(6): 921-931.
- [4] Lal G, Bromberg JS. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression [J]. *Blood*, 2009, 114(18): 3727-3735.
- [5] Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, et al. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate [J]. *Nature*, 2010, 463(7282): 808-812.

- [6] 王强, 任淑红, 董巍, 等. 转录因子 T-bet, GATA-3 和 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞及其转录因子 FoxP3 在儿童过敏性紫癜(HSP)发病机制中的作用 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2012, 20(1): 133-136.
- [7] 陈祚珈, 高雅懿, 李志远, 等. FOXP3⁺ 调节性 T 细胞 [J]. *生命科学*, 2010, 22(6): 515-527.
- [8] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance [J]. *Cell*, 2008, 133(5): 775-787.
- [9] Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 845-858.
- [10] Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, et al. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(2): 194-202.
- [11] 王蓓红. 儿童过敏性紫癜 T 细胞亚群和免疫球蛋白水平的变化与分析 [J]. *实用临床医药杂志*, 2007, 11(1): 93-94.
- [12] Kim JK, Klinger M, Benjamin J, et al. Impact of the TCR signal on regulatory T cell homeostasis, function, and trafficking [J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6580.
- [13] 杨军, 李成荣, 王国兵, 等. Th17 细胞与调节性 T 细胞在儿童过敏性紫癜发病机制中的作用 [J]. *临床儿科杂志*, 2011, 27(7): 645-647.
- [14] 陈洁, 曹筱筱, 徐蓉, 等. 银屑病血热及血瘀证患者外周血 Th1/Th2 细胞表达差异研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(1): 46-50.
- [15] 姚金晶, 陈宜涛. Th1/Th2 平衡调节与疾病发生的研究进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(13): 2597-2600.

(收稿日期: 2016-01-25 修回日期: 2016-03-28)

(上接第 2568 页)

参考文献

- [1] Huang Y, Lin JJ, Zhu SY. Genetic sequencing analysis of the A307 subgroup of ABO blood group [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(6): 9585-9589.
- [2] Lee HY, Park MJ, Kim NY, et al. Rapid direct PCR for ABO blood typing [J]. *J Forensic Sci*, 2011, 56(1): S179-S182.
- [3] 曾学平, 王恭, 陆理, 等. ABO 血型 A201 等位基因表达 A 抗原活性的分析 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2014, (23): 2000-2002.
- [4] 郑凌, 马玲, 刘衍春, 等. 2 例 Di(a+b-) 血型的血清学及 PCR-SSP 检测分析 [J]. *临床血液学杂志(输血与检验)*, 2014, 11(5): 903-905.
- [5] 陈青, 李平, 陆乐, 等. 分子生物学鉴定急性白血病患者 ABO 血型抗原 [J]. *临床血液学杂志(输血与检验)*, 2015, 12(1): 91-93.
- [6] Venables SJ, Mehta B, Daniel R, et al. Assessment of high resolution melting analysis as a potential SNP genotyping technique in forensic casework [J]. *Electrophoresis*, 2014, 35(21/22): 3036-3043.

- [7] 王冬梅, 李俊, 杨红敏, 等. 高分辨率溶解曲线 HRM 在 SNP 检测中的应用 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(4): 892-895.
- [8] Tanaka M, Takahahi J, Hirayama F, et al. High-resolution melting analysis for genotyping Duffy, Kidd and Diego blood group antigens [J]. *Leg Med(Tokyo)*, 2011, 13(1): 1-6.
- [9] 刘景汉, 兰炯采. 输血免疫血液学实验技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 37.
- [10] 夏金晶, 白浩, 熊丽纹, 等. 高分辨率溶解曲线法在 BIM 基因 2 903 bp 片段插入/缺失检测中的应用 [J]. *中国肺癌杂志*, 2014, 17(3): 238-242.
- [11] Novaretti MC, Domingues AE, Manhani R, et al. ABO genotyping in leukemia patients reveals new ABO variant alleles [J]. *Genet Mol Res*, 2008, 7(1): 87-94.
- [12] Lin M, Jiao JW, Zhan XH, et al. High resolution melting analysis: a rapid screening and typing tool for common β -thalassemia mutation in Chinese population [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e102243.

(收稿日期: 2016-02-12 修回日期: 2016-04-18)