

# 巢式PCR-RFLP检测rs9263726位点的 实验研究

钟柳英<sup>1</sup>, 张泳<sup>2</sup>, 顾取良<sup>3\*</sup>, 何震宇<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>广东药科大学药学院, 广东 广州

<sup>2</sup>广东药科大学临床医学院, 广东 广州

<sup>3</sup>广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广东 广州

Email: 1144744278@qq.com, 1051977797@qq.com, \*qulianggu@126.com, \*yuhezhen@gdpu.edu.cn

收稿日期: 2021年6月30日; 录用日期: 2021年7月28日; 发布日期: 2021年8月5日

## 摘要

目的: rs9263726位点(G>A)之A等位基因是预测别嘌醇致严重不良反应风险的遗传标记, 本研究旨在建立一种直接使用口腔上皮细胞进行PCR结合FokI酶切检测该位点基因型的方法。方法: 自行设计扩增产物包含FokI内对照识别序列的引物, 以样本的口腔上皮细胞粗处理物为模板, 通过巢式PCR扩增跨越rs9263726位点的靶片段, 进而根据PCR产物的FokI酶切图谱判断样本基因型。结果: 所检样本均能扩增出预期大小的PCR产物, 3种基因型的酶切图谱特征明显, 且经测序验证结果一致。结论: 初步建立了一种基于巢式PCR-RFLP检测rs9263726位点的改良方法, 具有简便、快速、准确、低成本等特点。

## 关键词

巢式PCR-RFLP, rs9263726位点, 别嘌醇, 个体化用药

# Study on the Detection of rs9263726 Locus by Nested PCR-RFLP

Liuying Zhong<sup>1</sup>, Yong Zhang<sup>2</sup>, Quliang Gu<sup>3\*</sup>, Zhenyu He<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong

<sup>2</sup>School of Clinical Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong

<sup>3</sup>School of Life Science and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong

Email: 1144744278@qq.com, 1051977797@qq.com, \*qulianggu@126.com, \*yuhezhen@gdpu.edu.cn

Received: Jun. 30<sup>th</sup>, 2021; accepted: Jul. 28<sup>th</sup>, 2021; published: Aug. 5<sup>th</sup>, 2021

\*通讯作者。

## Abstract

**Objective:** The A allele of rs9263726 locus (G>A) is a genetic marker for predicting the risk of serious adverse reactions caused by allopurinol. The purpose of this study is to establish a method to detect this locus using a combination of direct PCR from oral epithelial cells with *FokI* restriction digestion. **Methods:** Using innovational self-designed primers, a target fragment spanning the rs9263726 locus and upstream containing the *FokI* internal control restriction site was amplified by nested PCR from crudely-treated oral epithelial cells, and the genotype of the samples was determined by *FokI* digestion restriction map of PCR products. **Results:** The PCR products of expected size could be amplified from all samples, and the digestion patterns of three different genotypes were clearly distinguished, which were consistent with the sequencing results. **Conclusion:** An improved method based on nested PCR-RFLP to detect rs9263726 locus has been preliminarily established. It is simple, rapid, accurate and at low cost.

## Keywords

Nested PCR-RFLP, rs9263726 Locus, Allopurinol, Individualized Medication

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 背景介绍

别嘌醇作为抑制尿酸生成的首选药物被广泛应用，但在临床实践中该药物有许多副作用，其中别嘌醇致严重皮肤不良反应(SCARs)不容忽视，如史蒂文斯-约翰逊综合征(SJS)、中毒性表皮坏死松解症(TEN)和药物超敏反应综合征(DRESS)等，病死率高达 30% [1] [2]。大量研究表明，*HLA-B\*58:01* 等位基因与别嘌醇致严重不良反应(SCARs)有强相关性[3] [4] [5] [6]。不同民族的人群中该等位基因的携带率具有一定的差异，且 *HLA* 等位基因的分布频率在南方民族中显著高于北方民族，但在不同性别间无显著性差异[7]，因此在痛风患者使用别嘌醇药物之前，有必要进行 *HLA-B\*58:01* 等位基因的检测。

*HLA* (human leucocyte antigen)复合体是人类多态性最丰富的遗传系统，定位于第 6 号染色体短臂 6p21.31 区，长 3600 kb，遗传特征主要有多态性、多基因型，其多样性决定了 *HLA* 等位基因的检测方法具有复杂性[8]。越来越多的研究显示，位于 6 号染色体的银屑病易感基因 1 候选基因 1 (Psoriasis susceptibility 1 candidate 1, *PSORS1C1*)的 rs9263726 位点和别嘌醇导致的 SJS/TEN 有很大关联[9] [10]，可替代难于分型检测的 *HLA-B\*58:01* 基因，用于别嘌醇个体化用药的指导。

聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)技术是最经典的 SNP 分型方法，常用于基因突变的快速检测[11]。Keiko Maekawa [12]、曾大勇[13]等使用同样的 PCR-RFLP 法成功检测了 rs9263726 位点多态性(见表 1)，其以静脉血来源的 DNA 为模板，扩增 260 bp 的目的片段，用限制性内切酶 *FokI* 酶切分型。

传统 PCR-RFLP 检测基因型的主要不足之处在于酶切不完全的情况下，会残留 PCR 产物从而导致基因型误判[14]，具体到 rs9263726 位点，使用表 1 的引物，一个 AA 型样品，其完全酶切的条带为 141 bp、119 bp，当酶切体系含有未发生酶切的 260 bp 的 PCR 产物时，将出现 260 bp、141 bp、119 bp 的条带，与杂合子 GA 的带型一致，从而被误判为 GA 型。

**Table 1.** The existing PCR-RFLP methods for detecting rs9263726 locus  
**表 1.** 已有的检测 rs9263726 位点的 PCR-RFLP 方法

引物序列	上游引物	下游引物
	5'-AAGCTCCATCCACCCCTGGT-3'	5'-ACACATTGGGTGGGGGACAT-3'
判断 3 种基因型样品的依据 (酶切条带)	野生型纯合子 GG	260 bp
	杂合子 GA	260 bp、141 bp、119 bp
	突变型纯合子 AA	141 bp、119 bp

本研究旨在对上述的传统方法加以改进,不提纯基因组 DNA 而是直接使用口腔上皮细胞粗处理物作为模板,以提高操作的简便性,同时通过合理巧妙地设计引物,在 PCR 产物中引入内对照酶切位点以提高分型的准确性。

## 2. 实验材料和仪器

### 2.1. 试剂

引物由北京擎科生物科技有限公司(广州)合成;聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司;庄盟 50 bp Ladder 和 DNA marker I 购自广州左臣生物科技有限公司;限制性内切酶 *FokI* 购自昂科生物医学技术(苏州)有限公司,测序由北京擎科生物科技有限公司(广州)完成。

### 2.2. 样本

采自广东药科大学本科生志愿者,均签署知情同意书,按照本实验室的样本处理流程处理后备用。

### 2.3. 主要仪器

BIO-RAD T100 基因扩增仪购自上海伯乐生命医疗产品公司;DYY-6B 型稳压稳流电泳仪和 WD-9403F 紫外仪购自北京市六一仪器厂;三用恒温水箱购自姚奥特仪表有限公司;北京大龙手动单道移液器式移液购自上海高致精密仪器有限公司。

## 3. 实验内容

### 3.1. 引物设计

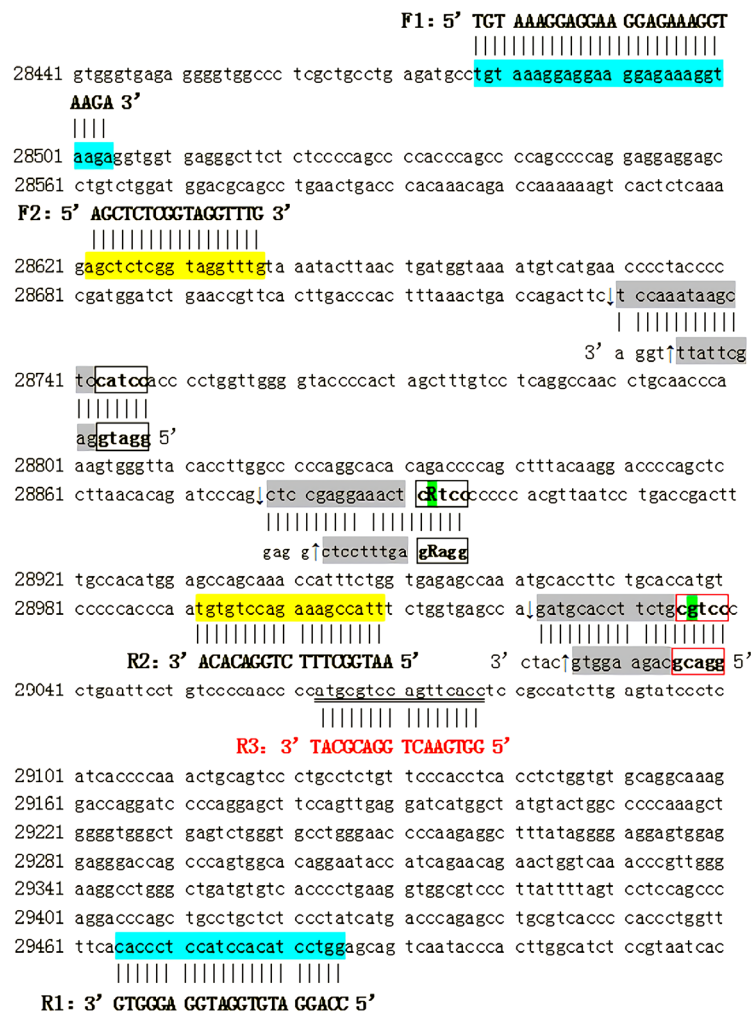
根据 GenBank 中 *PSORS1C1* 基因全序列(登录号: NG\_021348.1, 其中 28892 位的碱基 R 为多态位点碱基, R = G 或 A)及 db SNP 数据库的序列信息,采用 primer premier 5.0 软件设计外引物对 F1、R1 和内引物对 F2、R2, 见图 1。巢式 PCR 产物理论长度为 388 bp, 突变型等位基因 A 的 PCR 产物在多态位点含有限制性核酸内切酶 *FokI* 识别位点, 野生型等位基因 G 的 PCR 产物在多态位点不含 *FokI* 识别位点, 此外, 两者均在多态位点上游含有一个天然的内对照酶识别位点(28743-28747 位的 catcc)。

### 3.2. PCR 扩增

第一轮 PCR: PCR 反应体系为 5  $\mu$ l: 口腔上皮细胞粗处理物 0.5  $\mu$ l, 2 $\times$ TransDirect<sup>®</sup> PCRSuperMix (+dye) 2.5  $\mu$ l, 外引物 F1、R1 各 0.2  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 1.6  $\mu$ l。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 8 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。

第二轮 PCR: PCR 反应体系为 25  $\mu$ l: 第一轮 PCR 产物 0.2  $\mu$ l, 2 $\times$ EasyTaqPCRSuperMix 12.5  $\mu$ l, 内引物 F2、R2 各 0.2  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 11.9  $\mu$ l。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性, 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 退火

30 s, 72°C延伸 15 s, 30 个循环, 72°C再延伸 5 min。



**Figure 1.** Schematic diagram of designing nested PCR outer and inner primers  
**图 1.** 巢式 PCR 外、内引物设计示意图

### 3.3. PCR 产物鉴定

用胶染法制备含溴化乙锭(EB)的 1.5%琼脂糖凝胶, 取 2 μl 第二轮 PCR 产物于 150 V 电泳 25 min, 用紫外透射仪观察结果, 并拍照保存。

### 3.4. PCR 产物酶切消化

酶切反应体系为 30 μl, 其中 PCR 产物 2 μl, 10×FastDigestGreen Buffer 2 μl, FastDigest *FokI* 0.5 μl, ddH<sub>2</sub>O 25.5 μl, 37°C水浴 15 min。

### 3.5. 酶切片段电泳分型

用胶染法制备含溴化乙锭(EB)的 2.5%琼脂糖凝胶, 取 18 μl 酶切产物于 180 V 电泳 25 min, 用紫外透射仪观察结果, 并拍照保存。

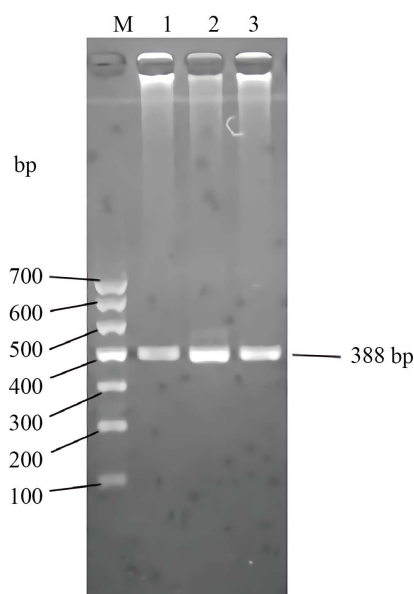
### 3.6.3 种基因型样品的测序验证

取3种基因型样品各1例,扩增388 bp的靶序列送至擎科基因公司测序,测序引物为上游内引物F2。

## 4. 实验结果

### 4.1. 巢式 PCR 产物电泳结果

图2的1~3号分别为3个不同样品的PCR产物电泳条带,条带单一,与预期产物片段大小(388 bp)相符,表明PCR取得成功。



M: DNA 分子量标记 Marker I, 1~3 为不同样本的 PCR 产物。

**Figure 2.** Agarose gel electrophoresis of the nested PCR products

**图 2.** 巢式 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

### 4.2. 酶切产物电泳结果

图3为本实验室保存的已知的3种基因型样品的酶切图谱。预期条带如下:

野生型纯合子 GG: 278 bp、110 bp

杂合子 GA: 278 bp、148 bp、130 bp、110 bp

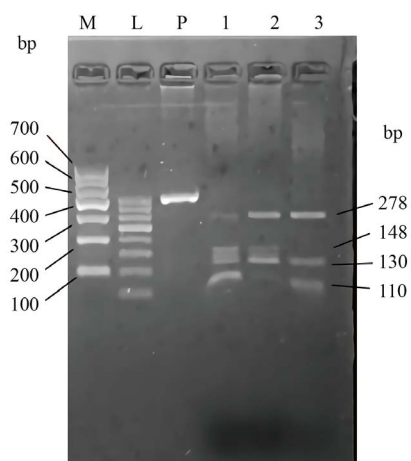
突变型纯合子 AA: 148 bp、130 bp、110 bp

图3实验结果与预期完全一致。

图4为10个随机样品的酶切图谱,尽管PCR产物有不同程度的残留,但通过278 bp、148 bp两条特征条带仍然能分辨3种基因型。

### 4.3. 基因测序结果

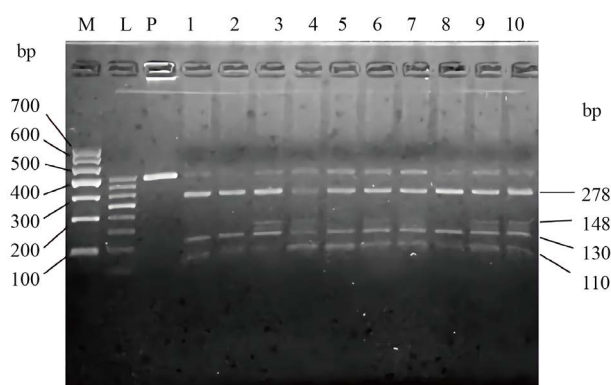
*PSORS1C1* 基因 rs9263726 位点附近的序列为.....ACTCRTCCCC.....,3种基因型样品的测序结果与本法的分型结果完全一致,见图5,证明了方法的准确性。



M: DNA 分子量标记 Marker I, L: DNA 分子量标记 50 bp Ladder, P: PCR 产物, 1: AA 型, 2: GA 型, 3: GG 型。

**Figure 3.** Electrophoresis of the *FokI*-digested nested PCR products of three different genotypes

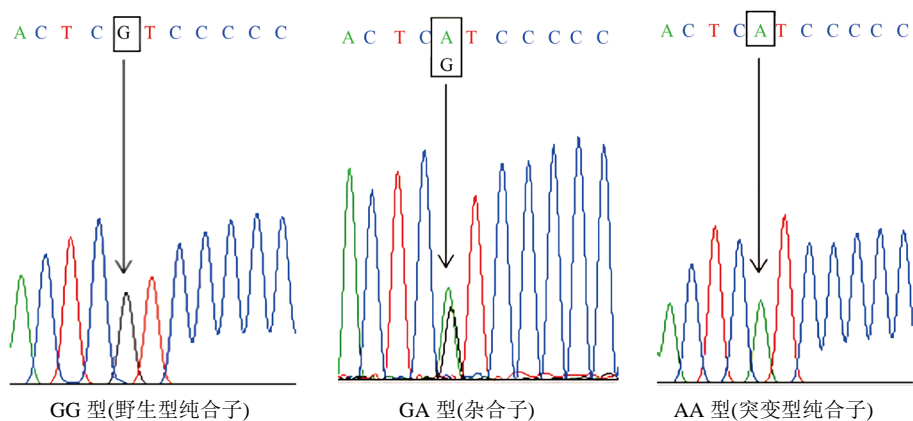
**图 3.** 3 种基因型样品巢式 PCR 产物的酶切产物电泳图



M: Marker I, L: 50bp ladder Marker, P: PCR 产物对照; 1-2、5、8: GG 型, 3、6-7、9-10: GA 型, 4: AA 型。

**Figure 4.** Electrophoresis of digested products of 10 random samples

**图 4.** 10 个随机样品酶切产物电泳图



**Figure 5.** Sequencing peak map of three genotypes of rs9263726 locus

**图 5.** rs9263726 位点三种基因型样品测序峰图

## 5. 讨论

传统的限制性核酸内切酶识别序列一般为“回文”结构,且酶切位点位于识别序列处或者旁边。*FokI*酶属于限制性内切酶家族中的 II<sub>s</sub> 型酶[15]。特异性地识别 DNA 上特定的非对称识别位点[16],即 DNA 上的特定序列 5'-GGATG-3'或者前者的互补序列 5'-CATCC-3',然后非特异性地剪切一条链上距离识别位点 9 个碱基距离处的磷酸二酯键,另一条链(互补链)上距离识别位点 13 个碱基距离处的磷酸二酯键。rs9263726 位点中 28743~28747 位的序列为 *FokI* 酶的识别序列,它是野生型等位基因 G 和突变型等位基因 A 都拥有的序列,可作为内对照识别序列,无论哪种等位基因来源的 PCR 产物都能在该识别位点对应的切割位点发生切割,从而可用作提示酶切的程度。在酶切完全的情况下,所有切割后的条带都应小于原来的 PCR 产物;如果出现 PCR 产物残留,则提示酶切不完全。在没有内对照酶切位点的情况下,酶切不完全残留的 PCR 产物会被当作 G 等位基因对待,造成 AA 型样品被误判为 GA 型样品;而本研究中即便酶切不完全、有 PCR 产物残留,也可通过特征条带对基因型进行判断,其中 G 等位基因的特征条带为 278 bp, A 等位基因的特征条带为 148 bp,故图 4 的 10 个样品,虽然有 PCR 产物残留,但基因型都能正确判断。

本研究所用的 *FokI* 价格比较昂贵,公司网站报价为 1019 元/100 次反应(<https://www.thermofisher.cn/order/catalog/product/FD0874#/FD0874>),每次反应推荐用酶 1 μl。为了节省实验成本,本研究中,把每个样品的酶切体系中的 *FokI* 的用量减半即改为 0.5 μl,虽然会造成一定程度的酶切不完全,但丝毫不影响结果判断,有赖于巧妙的内对照酶切识别位点的设计。

值得一提的是,148 bp 的条带是在多态位点和内对照酶切位点识别序列对应的切割位点均发生切割后形成的中间片段,*FokI* 这种酶在酶切反应完成后很容易与 DNA 片段粘在一起,从而影响 DNA 片段对核酸染料的结合,造成该条带观察起来略显暗淡,但通过对图片的亮度、对比度加以调整或者对图片进行反色处理,是能够看得非常清楚的,而且它与 5'端切割产生的 130 bp 片段有较好的区分度。

本研究前期的引物设计筛选过程中发现,如果将内引物对的下游引物设在现有的 R2 引物的下游(见图 1 之 R3),部分 PCR 产物酶切后在得到预期条带的同时,还出现了一些非特异性条带。PCR 产物测序的结果发现,图 1 之 29035~29039 位的基因组原碱基序列 CGTCC 在产物中变为了 CATCC,从而形成了新的 *FokI* 识别序列,导致酶切条带出现异常。这提示运用 PCR-RFLP 法进行基因分型具有一定的局限性,设计的引物需经实践验证,以避免 PCR 产物中带有可能的突变而干扰基因分型。

## 6. 结论

本研究对现有的基于 PCR-RFLP 法检测 rs9263726 位点的方法进行了成功的改良,可以使用简便易得的口腔上皮细胞作为模板直接进行巢式 PCR 获得靶序列;靶序列带有 *FokI* 的内对照酶切识别序列,可提高 RFLP 分型的准确性,并且可以节省 *FokI* 的用量,降低成本;直接 PCR 和快速核酸内切酶的应用还能缩短检测周期。故本研究建立的方法在指导别嘌呤醇的个体化用药方面有良好的应用前景。

## 基金项目

- 1) 广东药科大学 2018 年教育教学改革项目。
- 2) 广东省 2019 年大学生创新训练项目(编号: S201910573027)。

## 参考文献

- [1] 孙雪林, 康薇, 田晓鑫, 胡欣, 刘德军. 人类白细胞抗原相关的药物超敏反应[J]. 中国临床保健杂志, 2020, 23(3): 423-428.

- [2] 郭俊荣, 刘曼, 王旭红. 124 例药源性中毒性表皮坏死松解症不良反应病例分析[J]. 中国药物应用与监测, 2020, 17(5): 329-332.
- [3] 王胜男, 何鑫, 佟力军, 戴玉鑫, 孟令娜, 张丹, 等. 别嘌醇致严重皮肤不良反应与内蒙古各民族人群 *HLA-B\*58:01* 等位基因的相关性分析[J]. 中国民族医药杂志, 2020, 26(9): 68-69.
- [4] 刘威, 黎颖然, 张文渊, 等. 中国汉族人群 *HLA-B\*58:01* 等位基因与别嘌醇引起严重皮肤不良反应关联性的 Meta 分析[J]. 今日药学, 2019, 29(3): 177-181.
- [5] 方玲, 董敏, 汪燕燕. *HLA-B\*58:01* 基因检测在别嘌醇严重过敏反应评价的应用分析[J/OL]. 中国药物警戒, 2020: 1-11. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5219.R.20201223.1618.002.html>, 2020-12-23.
- [6] Tohkin, M., Kaniwa, N., Saito, Y., Sugiyama, E., Kurose, K., Nishikawa, J., *et al.* (2013) A Whole-Genome Association Study of Major Determinants for Allopurinol-Related Stevensâ Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis in Japanese Patients. *The Pharmacogenomics Journal*, **13**, 60-69. <https://doi.org/10.1038/tpj.2011.41>
- [7] 马骁, 张志欣, 蔡剑平, 潘芹芹, 樊甦, 王晓艳, 等. 中国高尿酸血症患者 *HLA-B\*58:01* 基因的人群分布[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(24): 3395-3399.
- [8] 康星. 严重药疹反应相关分子标志物 *HLA-B\*58:01* 和 *HLA-B\*15:02* 检测方法的建立及应用[D]: [硕士学位论文]. 西安: 西北大学, 2015.
- [9] Saksit, N., Nakkam, N., Konyoung, P., Khunarkornsiri, U., Tassaneeyakul, W., Chumworathayi, P., *et al.* (2017) Comparison between the *HLA-B\*58:01* Allele and Single-Nucleotide Polymorphisms in Chromosome 6 for Prediction of Allopurinol-Induced Severe Cutaneous Adverse Reactions. *Journal of Immunology Research*, **2017**, Article ID: 2738784. <https://doi.org/10.1155/2017/2738784>
- [10] Chen, Z., Zhang, S., Zhang, J., Zhang, Y., Xue, L. and Miao, L. (2015) rs9263726 Is a Specific Genetic Marker for Allopurinol-Induced Severe Cutaneous Adverse Reactions in Chinese Patients. *Personalized Medicine*, **12**, 585-592. <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/pme.15.38>
- [11] 王玉明, 李冬梅, 赵莹, 詹淑芬, 韩林. 巢式 PCR-RFLP 法检测 Cystatin C 基因多态性的实验研究[J]. 昆明医学院学报, 2008, 29(4): 33-36.
- [12] Maekawa, K., Nishikawa, J., Kaniwa, N., *et al.* (2012) Development of a Rapid and Inexpensive Assay for Detecting a Surrogate Genetic Polymorphism of HLA-B\*58:01: A Partially Predictive but Useful Biomarker for Allopurinol-Related Stevens-Johnson Syndrome/toxic Epidermal Necrolysis in Japanese. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **27**, 447-450. <https://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-11-NT-120>
- [13] 曾大勇, 王长连, 黄品芳, 刘亦伟, 陈丹丹. 别嘌醇引发严重皮肤不良反应标志基因 *HLA-B\*58:01* 的检测方法研究[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(6): 700-704.
- [14] 何震宇, 顾取良, 游娟. 改良 PCR-RFLP 法检测 MTHFR 基因 C677T 位点多态性[J]. 广东药科大学学报, 2019, 35(5): 669-673.
- [15] Sugisaki, H. and Kanazawa, S. (1981) New Restriction Endonucleases from *Flavobacterium okeanoicoites* (*FokI*) and *Micrococcus luteus* (*MluI*). *Gene*, **16**, 73-78. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(81\)90062-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(81)90062-7)
- [16] 王悦君. 限制性内切酶 *FokI* 作用机制研究及动力学分析[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海交通大学, 2007.