

Screening of Endonucleases for Identification of A1298C Locus of *MTHFR* Gene by PCR-RFLP

Zhenyu He

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong
Email: jdbshzy@163.com

Received: May 23rd, 2019; accepted: Jun. 5th, 2019; published: Jun. 12th, 2019

Abstract

The aim is to search restrictive endonuclease with suitable price for the genotyping of A1298C locus of *MTHFR* gene by PCR-RFLP. According to the sequence of A1298C locus of *MTHFR* gene in dbSNP database, various on-line restriction site analysis tools were used to select the enzymes that could identify the site, and then through price comparison and analysis of whether there were interference sequences in the upstream and downstream of the polymorphic locus, the candidate enzymes were determined. A cheap enzyme, *Hinf*I, has the potential to identify A1298C locus by PCR primer introduced restriction analysis, which laid a foundation for the joint detection of A1298C locus and C677T locus of *MTHFR* gene.

Keywords

Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene, A1298C Locus, Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism, Created Restriction Site

基于PCR-RFLP法鉴定*MTHFR*基因A1298C位点的内切酶的筛选

何震宇

广东药科大学生物化学与分子生物学系, 广东 广州
Email: jdbshzy@163.com

收稿日期: 2019年5月23日; 录用日期: 2019年6月5日; 发布日期: 2019年6月12日

摘要

寻找价格适宜的限制性内切酶，以期用于PCR-RFLP法对*MTHFR*基因A1298C位点的分型。根据dbSNP数据库中*MTHFR*基因A1298C位点的序列，通过各种在线酶切位点分析工具，查找可鉴定该位点的酶，再通过价格对比和分析多态位点上、下游是否存在干扰序列，从而确定候选酶。结合PCR创造酶切位点技术，一种价格便宜的常用酶HinfI具有鉴别该位点的潜力，不仅为该位点的独立检测并且为其与*MTHFR*基因C677T位点的联合检测奠定了基础。

关键词

*MTHFR*基因，A1298C位点，PCR-RFLP，创造酶切位点

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

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

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



Open Access

1. 引言

亚甲基四氢叶酸还原酶(Methylene tetrahydrofolate reductase, *MTHFR*)是叶酸代谢通路的关键酶，其活性受基因多态性影响[1]。A1298C位点是*MTHFR*基因一个主要的功能性多态位点，它会引起一系列疾病的发病风险增加，包括神经系统疾病[2]、出生缺陷[3]及心血管疾病[4]等，故对该位点的基因分型具有重要的临床意义。PCR-RFLP是一种经典的基因分型方法，操作简单，但限制性核酸内切酶的成本往往会影响到其推广应用，本研究旨在筛选一种可用于*MTHFR*基因A1298C位点分型的便宜限制性内切酶，以降低该位点的基因分型成本。

2. 方法

通过*MTHFR*基因A1298C位点在GenBank的dbSNP数据库中的相应ID号rs1801131查询其相关的基因组DNA序列，截取多态位点上游、下游各20个碱基用于后续分析，相关序列为：GGAGGAGCTGACCAGTGAAG[M]AAGTGTCTTTGAAGTCTTCG，M为多态位点碱基，M = A/C。在此基础上，运用如下在线酶切位点分析工具寻找相关的限制性核酸内切酶。

1) WatCut (http://watcut.uwaterloo.ca/template.php?act=snp_new)，使用序列TGAAG[A/C]AAGTG进行分析。

2) dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>)

用于分析的序列如下：

野生型等位基因序列：GGAGGAGCTGACCAGTGAAGAAAGTGTCTTT

突变型等位基因序列：GGAGGAGCTGACCAGTGAAGCAAGTGTCTTT

3) Enzyme Finder (<https://enzyme finder.neb.com/#/!#nebheader>)，使用包含多态位点的几个碱基或者多态位点前的几个碱基进行分析。

3. 结果

WatCut分析结果显示，有20余种酶具有鉴定*MTHFR*基因A1298C位点的潜力，见表1，其中有一些为同裂酶，如：*BisI*和*BlsI*；*CviAII*、*FaeI*和*FatI*。dCAPS Finder分析结果显示，在通过PCR改变1个碱基后，有11种酶具有鉴定*MTHFR*基因A1298C位点的潜力，其中*DrdIII*、*HinfI*、*MwoI*、*TfiI*、*Tth1111I*

五种酶与表 1 中的酶不重复或者没有对应的同裂酶。Enzyme Finder 只能通过精确的碱基序列来查找相应的内切酶，获取的信息有限，见表 3。

Table 1. The analysis result of WatCut
表 1. WatCut 分析结果

限制性核酸内切酶	识别序列	SNP 位点/突变	碱基改变数量
<i>AarI</i>	CACCTGCN4^	TGAAG C AGGTG	1
<i>AcvI</i>	CAC^GTG	TGAAG C ACGTG	1
<i>BisI</i>	GC^NGC	TGCAG C AAGTG	1
<i>BlsI</i>	GCN^GC	TGCAG C AAGTG	1
<i>BspMI</i>	ACCTGCN4^	TGAAG C AGGTG	1
<i>BstBAI</i>	YAC^GTR	TGAAG C ACGTG	1
<i>BstC8I</i>	GCN^NGC	TGAAG C AAGCG	1
<i>BstNSI</i>	RCATG^Y	TGAAG C ATGTG	1
<i>BstVI1</i>	GCAGCN8^	TGCAG C AAGTG	1
<i>CviAII</i>	C^ATG	TGAAG C ATGTG	1
<i>FaeI</i>	CATG^	TGAAG C ATGTG	1
<i>FaiI</i>	YA^TR	TGAAG C ATGTG	1
<i>FatI</i>	^CATG	TGAAG C ATGTG	1
<i>HgaI</i>	GACGCN5^	TGACG C AAGTG	1
<i>HpyI88III</i>	TC^N2GA	TCAAG A AAGTG	1
<i>HpyAV</i>	CCTTCN6^	TGAAG A AGGTG	1
<i>HpyCH4V</i>	TG^CA	TGATG C AAGTG	1
<i>LpnPI</i>	CCDGN10^	TGAAG C AGGTG	1
<i>MboII</i>	GAAGAN8^	TGAAG A AAGTG	0
<i>MspJI</i>	CN2RN9^	TGAAG C AAGTG	0
<i>MunI</i>	C^AATTG	TGAAG C AATTG	1
<i>SfaNI</i>	GCATCN5^	TGATG C AAGTG	1
<i>SgeI</i>	CN2GN9^	TGAAG C AAGTG	0
<i>TseI</i>	G^CWGC	TGCAG C AAGTG	1
<i>TspDTI</i>	ATGAAN11^	TGATG A AAGTG	1

Table 2. The analysis result of dCAPS Finder
表 2. dCAPS Finder 分析结果

限制性核酸内切酶	识别序列	碱基改变(加框)	识别的等位基因(加下划线)
<i>HpyI78III</i>	TCNNGA	GGAGGAGCTGACCAGT C AAGA	A
<i>BbvI</i>	GCAGC	GGAGGAGCTGACCAGT C AGC	C
<i>CviRI</i>	TGCA	GGAGGAGCTGACCAGTGA T GCA	C
<i>DrdII</i>	GAACCA	GGAGGAGCTGACCAGTGA C CA	C

Continued

<i>Fnu4HI</i>	GCNGC	GGAGGAGCTGACCAAGTGCAGC	C
<i>HgaI</i>	GACGC	GGAGGAGCTGACCAAGTGAAGC	C
<i>HinI</i>	GANTC	GGAGGAGCTGACCAAGTGAATC	C
<i>MwoI</i>	GCNNNNNNNGC	GGAGGAGCTGCCAGTGAAGC	C
<i>TfiI</i>	GAWTC	GGAGGAGCTGACCAAGTGAATC	C
<i>TseI</i>	GCWGC	GGAGGAGCTGACCAAGTGCAGC	C
<i>Tth111II</i>	CAARCA	GGAGGAGCTGACCAAGTCAAGC	C

Table 3. The analysis result of Enzyme Finder

表 3. Enzyme Finder 分析结果

用于查询的碱基序列 (括号中加下划线的序列)	内切酶	切割位点和序列	说明
GAAGA (TGAAGAAAGTG)	<i>MboII</i>	GAAGAN7↑N↓	识别野生型等位基因 A
GAAGA (TGAAGAAAGTG)	<i>BbsI</i>	GAAGACNN↓NNNN↑	将多态位点 3'端相邻的第一个碱基 改为 C 后, 可识别野生型等位基因 A
GA (TGAAGMAAGTG, M = A/C)	<i>HinI</i>	G↓ANT↑C	将多态位点 5'端相邻的第一个碱基 改为 T 后, 可识别突变型等位基因 C
GA (TGAAGMAAGTG, M = A/C)	<i>TfiI</i>	G↓AWT↑C	将多态位点 5'端相邻的第一个碱基 改为 T 后, 可识别突变型等位基因 C

4. 讨论

对表 1、表 2 和表 3 中的酶进行梳理, 有同裂酶者合并后只保留其中一种, 显示潜在的可用于检测 *MTHFR* 基因 A1298C 位点的限制性核酸内切酶有 *AarI*、*AcvI*、*BbsI*、*BisI*、*BspMI*、*BstBAI*、*BstC8I*、*BstNSI*、*BstV1I*、*CviAII*、*DrdII*、*FaiI*、*HgaI*、*HinI*、*Hpy188III*、*HpyAV*、*HpyCH4V*、*LpnPI*、*MboII*、*MspJI*、*MunI*、*PfeI*、*SfaNI*、*SgeI*、*TfiI*、*TseI*、*Tth111II*、*TspDTI* 等。在上述这些酶里, *MboII* 曾被用于 *MTHFR* 基因 A1298C 位点的分型, 但是它的价格较贵, 每个样品单次酶切用酶成本在 8 元以上, 更主要的是在多态位点下游不远处的另一个多态位点 T1317C 有可能形成 *MboII* 识别序列, 从而干扰基因分型, 那就是当 A1298C 位点的等位基因为 A 时, T1317C 位点的等位基因为 C 时, 序列 GAAG[1298A/C]AAGTGTCTTTGAAGTCTT[1317T/C]GT 为 GAAGAAAGTGT↑CT↓TTGAAGTCTTCGT, 加下划线的 GAAGA 为正向的 *MboII* 识别序列, 加下划线的 TCTTC 为反向的 *MboII* 识别序列, 它们的切割位点几乎重叠在一起(箭头处) [5], 因此 *MboII* 并不适合用于 *MTHFR* 基因 A1298C 位点的分型。在余下的酶中, 除 *HinI* 和 *AcvI* 外, 其他的酶都较贵, 每个样品单次酶切用酶成本均会超过 5 元。*HinI* 和 *AcvI* 是两种价格相对较为便宜的酶, 使用 *HinI* 每个样品单次酶切的用酶成本在 1 元左右, 使用 *AcvI* 每个样品单次酶切用酶成本在 3 元左右, 因此针对 *MTHFR* 基因 A1298C 位点用 *HinI* 分型更具成本优势。值得一提的是, *MTHFR* 基因另一个常见的功能性多态位点 C677T 通常采用 *HinI* 分型 [6], 故使用 *HinI* 具备一次性联合检测 *MTHFR* 基因 C677T 和 A1298C 位点两个位点的潜力, 将会大大节约 *MTHFR* 基因的分型成本和时间。

目前有多种在线酶切位点分析工具, 经由它们分析所得的酶不完全相同, 彼此之间具有相互补充的作用, 比如本实验筛选到的廉价限制性核酸内切酶 *HinI*, 如果仅通过 WatCut 软件是无法发现的, 提示我们在寻找价格便宜的限制性核酸内切酶以降低实验成本时, 一定要尝试采用多种在线酶切位点分析工具进行综合分析, 方有可能获得比较满意的结果。

基金项目

广东省科技计划项目(公益研究与能力建设专项资金项目)(2015A030401098)资助。

参考文献

- [1] Du, B., Tian, H., Tian, D., Zhang, C., Wang, W., Wang, L., Ge, M., Hou, Q. and Zhang, W. (2018) Genetic Polymorphisms of Key Enzymes in Folate Metabolism Affect the Efficacy of Folate Therapy in Patients with Hyperhomocysteinaemia. *The British Journal of Nutrition*, **119**, 887-895. <https://doi.org/10.1017/S0007114518000508>
- [2] Fekih Mrissa, N., Mrad, M., Klai, S., Zaouali, J., Sayeh, A., Mazigh, C., Nsiri, B., Machgoul, S., Gritli, N. and Mrissa, R. (2013) Association of Methylenetetrahydro Folate Reductase A1298C Polymorphism but Not of C677T with Multiple Sclerosis in Tunisian Patients. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, **115**, 1657-1660. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2013.02.025>
- [3] Yu, D., Zhuang, Z., Wen, Z., Zang, X. and Mo, X. (2017) MTHFR A1298C Polymorphisms Reduce the Risk of Congenital Heart Defects: A Meta-Analysis from 16 Case-Control Studies. *Italian Journal of Pediatrics*, **43**, 108. <https://doi.org/10.1186/s13052-017-0425-1>
- [4] Ehsani, M., Imani, A. and Moravveji, A. (2018) Prevalence of Factor V Leiden, MTHFR C677T and MTHFR A1298C Polymorphisms in Patients with Deep Vein Thrombosis in Central Iran. *Molecular Biology Reports*, **45**, 621-624. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4201-0>
- [5] Allen, R.A., Gatalica, Z., Knezetic, J., Hatcher, L., Vogel, J.S. and Dunn, S.T. (2007) A Common 1317TC Polymorphism in MTHFR Can Lead to Erroneous 1298AC Genotyping by PCR-RE and TaqMan Probe Assays. *Genetic Testing*, **11**, 167-173. <https://doi.org/10.1089/gte.2006.0513>
- [6] Al-Shahrani, H., Al-Dabbagh, N., Al-Dohayan, N., Arfin, M., Al-Asmari, M., Rizvi, S. and Al-Asmari, A. (2016) Association of the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Polymorphism with Primary Glaucoma in Saudi Population. *BMC ophthalmology*, **16**, 156. <https://doi.org/10.1186/s12886-016-0337-7>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-5426, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjcb@hanspub.org