



七种常见MBL基因单倍型标准质粒的构建

甘露聚糖结合凝集素(mannan-binding lectin, MBL)是天然免疫系统中的关键分子,可识别并结合多种病原体表面的甘露聚糖或类似的糖结构,通过激活补体凝集素途径和调理吞噬作用清除病原体及受感染细胞[1][2]。MBL结构基因上存在多个点突变,其中第一外显子CGT52TGT、GGC54GAC、GGA57GA A等3个密码点突变(分别称为D、B、C,相应的野生型称为A)对MBL的结构和功能有至关重要的影响,可能造成MBL蛋白结构的改变,从而使其不能形成多聚体而容易被降解。还发现启动子区对MBL水平影响较大的是-550H/L、-221X/Y和+4P/Q等3个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点[3][4]。1条染色体上MBL基因启动子区等位基因型(H/L、Y/X和P/Q)结合结构基因等位基因型(A、B、C和D)构成单倍型,2条单倍型即构成基因型,如HYPA/LYPB。按照排列组合规律,这6个SNP位点可随机组合成26(64)种单倍型,但由于结构基因3个SNP位点与不同启动子单倍型连锁不平衡,至今只检测到7种常见的单倍型:HYPA、LXPA、LYQA、LYPA、LYPB、HYPD和LYQC[5][6]。近来也发现一些罕见的单倍型,如LYPD[7]、HXPA[8]。不同的基因型决定了不同的MBL表达,而MBL发挥免疫防御功能有赖于其一定的血清浓度,其血清水平低下被认为是机体易患感染性疾病的主要危险因素之一[9][10]。已有学者对非洲、欧洲和亚洲多个人群的MBL基因变异频率和分布情况进行了研究[11][12][13],发现MBL基因型在不同种族人群中的分布存在明显的差异[14],可能与种族和种族迁徙有关。

MBL基因SNP及其单倍型的检测方法包括聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(poly-merase chain reaction-restriction fragment length poly-morphism, PCR-RFLP)、PCR-单链构象多态性分析(PCR-single strand conformation polymorphism analysis, PCR-SSCP)、PCR-序列特异性寡核苷酸杂交技术(PCR-sequence specific oligonucleotide hybridization, PCR-SSO)、序列特异性引物PCR(sequence specific primers-PCR, SSP-PCR)及real-time PCR等,一般需要以确认的DNA样品进行方法的建立、评价以及大批量试验的阳性对照和质量控制等,但由于DNA样品本身的限制性,其作为大规模筛查的标准品有其自身很多的不足之处。因此,需要克隆相应的质粒作为标准品[15]。本研究中,我们采用直接克隆和定点突变的方法构建了MBL基因7种常见的单倍型标准质粒,作为研究MBL基因相应多态性位点的标准对照。

1 材料与方法

1.1 材料

DNA定点突变试剂盒(MutanBEST Kit)、Taq DNA聚合酶、dNTP、DNA Markers购自大连TaKaRa公司。引物和pUCm-T载体购自上海博亚生物技术公司。DNA凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司。大肠杆菌TOP10F'由本室保存。其它试剂为国产分析纯商品。

1.2 MBL基因单倍型HYPA、LXPA、LYQA、LYPA及LYPB标准质粒的构建

我们在MBL基因SNP的群体研究中发现单倍型HYPA、LXPA、LYQA、LYPA和LYPB较为常见,因此,通过SSP-PCR技术直接从DNA样本中筛选出相应的单倍型,然后克隆至T载体即可获得相应的标准质粒。

1.2.1 扩增策略和引物设计 扩增策略见图1。根据已发表的MBL基因的全基因序列(GenBank X15422), 采用Primer premier 5.0软件, 设计3条引物。-550L: 5'-TGCTTACCCAGGCAAGCCTGTC-3'; -550H: 5'-T GCTTACCCAGGCAAGCCTGTG-3'; A1: 5'-CAGGC AGTTTCTCTGGAAGG-3'。上游引物-550H、-550L的3'端碱基分别特异于MBL基因启动子区-550位等位基因H/L, 上游引物-550H和-550L分别与下游通用引物A1配对, 扩增等位基因H/L位点至第一外显子57位点突变下游区域之间约884 bp的DNA片段, 其中包含了MBL基因上6个重要的SNP位点及其它一些常见多态性位点。

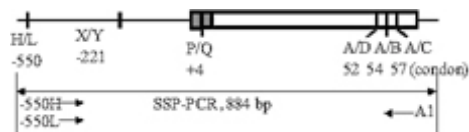


图1 用SSP-PCR扩增MBL基因单倍型目的片段示意图

Fig.1 Schematic representation of amplification of MBL gene haplotypes with SSP-PCR

1.2.2 PCR扩增 以筛选出来的DNA样本为模板, 分别以-550H~A1及-550L~A1为上下游引物, 进行SSP-PCR。PCR体系为50 μ l, 其中高保真Taq DNA聚合酶1.5 U、上下游引物各0.15 μ mol/L、KCl 50 μ mol/L、Tris-HCl 10 μ mol/L (pH8.0)、MgCl₂ 1.5 μ mol/L、dNTP 各0.25 μ mol/L、DNA模板50~500 ng。PCR参数: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s、60 $^{\circ}$ C退火20 s、72 $^{\circ}$ C延伸60 s, 10个循环; 94 $^{\circ}$ C变性30 s、58 $^{\circ}$ C退火20 s、72 $^{\circ}$ C延伸60 s, 25个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸2 min。取5 μ l PCR扩增产物在1%琼脂糖凝胶中进行电泳分析鉴定。

1.2.3 各单倍型的克隆 采用DNA凝胶回收试剂盒回收PCR扩增产物, 将其与pUCm-T载体连接, 转化感受态细菌, 涂平板培养过夜, 通过蓝白斑筛选阳性克隆。

1.3 MBL基因单倍型HYPD及LYQC标准质粒的构建

由于我们在MBL基因SNP的群体研究中未发现单倍型HYPD和LYQC 单倍型, 因此采用定点突变技术对单倍型HYPA及LYQA标准质粒进行点突变, 分别构建单倍型HYPD及LYQC标准质粒。

1.3.1 引物设计 根据应用PCR进行定点突变的原理(参照TaKaRa公司产品说明)及MBL基因的序列, 设计2对引物, 分别在单倍型标准质粒HYPA及LYQA中导入第一外显子52位密码点突变和57位密码点突变, 变异导入引物的5'端必须与对应PCR引物5'端相邻接。2对引物序列如下: Mutant57-F: 5'-GAAGAAAAGGGGGAACCAGG-3', Mutant57-R: 5'-C TTGGTGCCATCACGCCCAT-3'; Mutant52-F: 5'-GTG TGATGGCACCAAGGGAG-3', Mutant52-R: 5'-CCAT CTTGCCTGGGAAGC-3'。带A或T者为引入突变碱基。

1.3.2 PCR扩增 分别以单倍型标准品质粒HYPA和LYQA为模板, 相应以Mutant57-F、Mutant57-R和Mutant52-F、Mutant52-R为引物, 进行PCR扩增反应。PCR体系50 μ l, 其中Pyrobest DNA聚合酶1.5 U、上下游引物各0.2 μ mol/L、10 \times Pyrobest Buffer 5 μ l、dNTP 各0.25 μ mol/L、模板1~50 μ g。PCR参数: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 58 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸3 min, 共35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR扩增产物进行1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.3 单倍型HYPD及LYQC的克隆 采用凝胶回收纯化试剂盒回收目的DNA片段, 按TakKaRa MutantBEST Kit操作指南进行平末端及5'末端磷酸化。取约0.25 pmol (5 μ l)经处理的DNA片段于新的微量离心管中, 加入5 μ l Ligation Solution I, 混合均匀, 于16 $^{\circ}$ C反应1 h进行连接反应。反应液全量转化至100 ml感受态细菌中, 涂平板培养过夜, 通过蓝白斑筛选阳性克隆。

1.4 标准质粒的鉴定

按常规步骤挑取阳性克隆, 采用质粒提取试剂盒提取质粒, 以其为模板采用相应特异性引物进行PCR鉴定, 取PCR阳性菌株分别送上海博亚生物技术公司和大连TaKaRa公司同时进行序列测定。将2家公司的测序结果进行BLAST比对, 同时与MBL基因全序列进行比对。

2.1 MBL基因单倍型HYPA、LXPA、LYQA、LYPA及LYPB标准质粒的构建

上游SSP引物-550H和-550L分别与下游通用引物A1配对，扩增MBL基因启动子区H/L位点至第一外显子57位密码点突变下游区域之间约884 bp的DNA片段。如图2所示，PCR特异性好，产量高。将PCR扩增产物与pUCm-T载体连接，转化感受态细菌，通过蓝白斑筛选阳性克隆，以阳性克隆质粒为模板，用相应SSP扩增获得产物(图3)。2家公司测序的BLAST比对结果在克隆目的片段部分序列完全吻合。由于MBL基因上除了上述6个重要多态性位点外，还存在其它多态性位点，故与MBL基因DNA序列(GenBank X15422)BLAST比对，标准质粒的序列除MBL基因上相应的多态性位点外其它序列基本吻合。因此，获得了MBL基因单倍型标准质粒HYPA、LXPA、LYQA、LYPA及LYPB，但其插入片段上还含有MBL基因启动子区和第一外显子上的其它多态性位点。

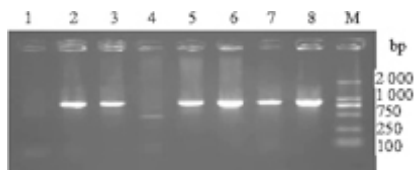


图2 SSP-PCR扩增MBL基因目的片段

Fig.2 SSP-PCR product of MBL gene

Lanes 1, 2: -550H~A1 primer, -550L~A1 primer, the DNA samples with genotypes LYPA/LYPA of MBL gene; Lanes 3, 4: -550H~A1 primer, -550L~A1 primer, the DNA samples with genotypes HYPA/HYPA of MBL gene; Lanes 5, 6: -550H~A1 primer, -550L~A1 primer, the DNA sample with genotypes HYPA/LXPA of MBL gene; 7, 8: -550H~A1 primer, -550L~A1 primer, the DNA sample with genotypes HYPA/LYQA of MBL gene; M: DNA Marker DL2000

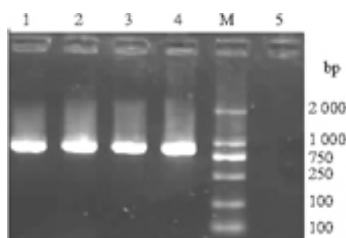


图3 SSP-PCR鉴定构建的MBL单倍型标准质粒

Fig.3 Identification of the plasmids of MBL gene haplotype by SSP-PCR

Lanes 1-4: -550H~A1 primer or -550L~A1 primer, the plasmids of MBL gene haplotypes; Lane 5: Negative control; M: DNA Marker DL2000.

2.2 MBL基因单倍型HYPD及LYQC标准质粒的构建

采用引物对Mutant-52F~Mutant-52R、Mutant-57F~Mutant-57R分别扩增上述所获质粒HYPA和LYQA，成功扩增出相应的PCR产物(图4)。回收目的DNA片段经处理后进行连接反应，转化感受态细菌，通过蓝白斑筛选获得阳性克隆，以阳性克隆质粒为模板，用上述引物对进行PCR验证，结果如图5所示，扩增良好，相对分子质量大小符合理论值。测序结果经过BLAST与原质粒进行比对，证明成功插入了单碱基突变，获得了MBL基因单倍型HYPD及LYQC标准质粒。图6为单倍型HYPD、LYPB及LYQC质粒插入片段的MBL基因第一外显子52、54及57位密码子点突变区域的测序图谱，可以直观地看到3个标准质粒的相应位点的碱基为突变型碱基。

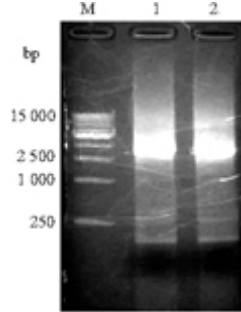


图4 PCR扩增MBL基因单倍型HYPD和LYQC质粒

Fig.4 PCR products of the standard plasmids of MBL gene haplotypes HYPD and LYQC

M: DNA Marker DL15 000; Lane 1: PCR product of the plasmid containing MBL gene haplotype HYPD amplified by Mutant-52F~Mutant-52R primer pair; Lane 2: PCR product of the plasmid containing MBL gene haplotype LYQC amplified by Mutant-57F~Mutant-57R primer pair

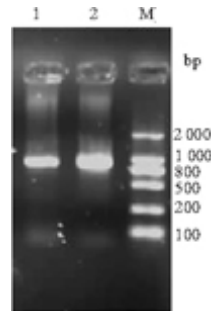


图5 SSP-PCR鉴定MBL单倍型质粒HYPD和LYQC

Fig.5 Identification of the plasmids containing MBL gene haplotypes HYPD and LYQC by SSP-PCR

Lane 1: PCR product of the plasmid containing MBL gene haplotype HYPD; Lane 2: PCR product of the plasmid containing MBL gene haplotype LYQC;M: DNA Marker DL20 000

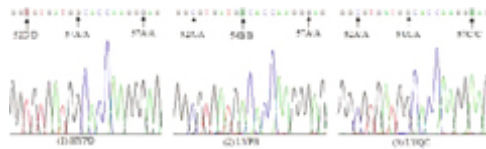


图6 标准质粒HYPD、LYPB及LYQC的测序图谱

Fig.6 Sequencing map of the standard plasmids HYPD, LYPB and LYQC

3 讨论

SNP作为人类基因组的遗传学标记，具有高密度、遗传稳定、可高通量自动化分析等特点，已获前所未有的重视，其重点是研究与人类健康息息相关的基因功能。人类DNA序列变异约90%表现为SNP，估计在人类基因组中每1 000个核苷酸有1个以上SNP，共有300万以上的SNP，其中约有20万存在于编码区[17]。SNP直接以序列的差异作为标记，比其它遗传标记更能真实地反映人种、人群及个体之间的遗传差异。一个基因的多个关键SNP位点组成其单倍型和基因型，如MBL基因上的6个位点，组成

MBL基因不同的单倍型和基因型，这些单倍型和基因型对应不同的MBL血清水平，对MBL的研究有重要意义。近年SNP相关研究飞速发展，其中来自美国、英国、中国、日本等国的科学家和资助机构合作开展的国际人类基因组单体型图计划(简称HapMap计划)，就是基于人类基因组中的重要SNP位点来确定单倍型，旨在确定和编目人类遗传的相似性和差异性。研究人员利用HapMap获得的信息将能够发现与人类健康、疾病以及对药

物和环境因子的个体反应差异相关的基因[18]。

MBL作为人体重要的天然免疫分子，其血清水平低下或缺陷可引起或与多种疾病相关。其中对MBL血清水平有重要影响的是其基因序列上的多个SNP位点。因此，分析MBL基因上的SNP位点及其单倍型和基因型具有重要的意义和临床价值。通常分析MBL基因SNP采用的方法有PCR-RFLP、核酸探针等，以及我们所采用的方法如SSP-PCR、real-time PCR等[19]，但这些方法一般需要标准品作为实验的对照以确定实验条件，以及作为实验的质量控制。一般采用的是经过验证的DNA标本作为标准品，但是由于DNA样品不易保存，同时存在大量干扰序列，因此其作为基因分型的标准品存在明显的不足之处。而采用质粒作为PCR及real-time PCR的标准品，具有目标序列确定，准确性高，特异性好，易于保存和复制扩增等优点。因此，我们克隆了MBL基因7种常见的单倍型标准质粒HYPA、LXPA、LYQA、LYPA、LYPB，还通过定点突变获得了标准质粒HYPD、LYPC。这些标准质粒克隆包含了MBL基因6个重要的SNP位点的所有等位基因，作为对大规模不同人群MBL基因进行基因分型的标准品。同时，由于这些克隆中的插入片段是来自于基因组的序列，因此这些克隆序列上还存在多个其它多态性位点，包括启动子区缺失、其它SNP位点等。因此，这些标准品单倍型质粒亦可作为检测其它MBL基因多态性位点的标准对照。这些标准质粒已用于我们的后续研究，如采用SSP-PCR结合real-time PCR分子灯塔技术分析MBL基因6个重要的SNP位点及其单倍型与基因型，在实验条件的优化、探针质量的确定中起了重要的作用，并作为实验的阳性对照及质量控制，使我们进行MBL基因分型更为准确和快捷。

(责任编辑：吴锦雅)

参考文献：

- [1]陈政良, 谢佩蓉. 甘露聚糖结合蛋白[J]. 国外医学·免疫学分册, 1997, 20(1): 16-9.
- [2]陈政良. 补体激活第三途径—凝集素途径[J]. 国外医学·分子生物学分册, 1999, 21(5): 295-8.
- [3]Petersen SV, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding lectin path-way of complement activation: biology and disease association[J]. Mol Immunol, 2001, 38(2-3): 133-49.
- [4]Turner MW, Hamvas RM. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations[J]. Immunogenet, 2000, 2(3): 305-22.
- [5]王方勇, 陈政良. 甘露聚糖结合凝集素基因启动子区多态性及其意义[J]. 国外医学. 免疫学分册, 2002, 25(5): 269-72.
- [6]Steffensen R, Hoffmann K, Varming K. Rapid genotyping of MBL2 gene mutations using real-time PCR with fluorescent hybridisation probes[J]. J Immunol Methods, 2003, 278(1-2): 191-9.
- [7]Boldt AB, Petzl-Erlner ML. A new strategy for mannose-binding lectin gene haplotyping. Hum Mutat, 2002, 19(3): 296-306.
- [8]Sullivan KE, Wooten C, Goldman D, et al. Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 1996, 39(12): 2046-51.
- [9]Madsen HO, Garred P, Thiel S, et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein[J]. J Immunol, 1995, 155(6): 3013-20.
- [10]Summerfield JA, Sumiya M, Levin M, et al. Association of mutations in mannose-binding protein with childhood infection in consecutive hospital series[J]. BMJ. 314(7089): 1229-32.
- [11]Turner MW, Hamvas RM. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations[J]. Immunogenet, 2000, 2(3): 305-22.
- [12]Madsen HO, Satz ML, Høgh B, et al. Different molecular events result in low

protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America[J]. J Immunol, 1998, 161(6): 169-75.

[13]Minchinton RM, Dean MM, Clark TR, et al. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype MBL levels and function in an Australian blood donor population[J]. Scand J Immunol, 2002, 56(6): 630-41.

[14]Steffensen R, Thiel S, Varming K, et al. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers[J]. J Immunol Methods, 2000, 241(1-2): 33-42.

[15]罗勇军, 刘 昕. 实时荧光定量PCR 标准品的制备及应用[J]. 重庆医学, 2005, 34(3): 414-5.

Luo YJ, Liu X. The method of preparation for the standard plasmids of real-time PCR and its application in the experiments[J]. Chongqing Med J, 2005, 34(3): 414-5.

[16]江小工, 徐 兵, 许文娟, 等. 荧光定量PCR检测TCR V γ I-J γ 基因重排标准品质粒及标准曲线的构建[J]. 实用医学杂志, 2004, 20(2): 115-7.

Jiang XG, Xu B, Xu WJ, et al. Construction of recombinant plasmid and standard curve for detection of TCR V γ I-J γ gene rearrangement by real-time quantitative PCR[J]. J Pract Med, 2004, 20(2): 115-7.

[17]Wang DG, Fan JB, Siao CJ, et al. Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome[J]. Science, 1998, 280(5366): 1077-82.

[18]The International HapMap Consortium. The International HapMap Project[J]. Nature, 426(6968): 789-96.

[19]吕成伟, 陈政良, 刁志宏, et al. 广东地区汉族人MBL基因启动子区SNP的研究[J]. 第一军医大学学报. 2003, 23(11): 1165-8.

Lu CW, Chen ZL, Diao ZH, et al. Investigation of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of mannan-binding lectin gene in a Han population from Guangdong[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(11): 1165-8.