

全血改进线性指数聚合酶链式反应用于 焦磷酸测序检测基因多态性

项 铮¹ 刘云龙² 邢晓清¹ 初亚男² 宋沁馨^{* 1 2} 周国华^{1 2}

¹(药物质量与安全预警教育部重点实验室, 中国药科大学, 南京 210009)

²(南京大学医学院附属金陵医院药理科, 南京 210002)

摘 要 焦磷酸测序是目前基因多态性检测的主要方法之一, 但是其前期的样本制备工作较为繁琐, 限制了其在临床检测中的应用。为了简化焦磷酸测序的流程, 本研究根据不对称 PCR 原理, 改进了线性指数聚合酶链式反应(LATE-PCR) 的引物设计方法, 增加过量引物的长度和浓度, 并结合全血直接扩增技术, 建立了基于普通 rTaq 聚合酶和高 pH 缓冲液(HpH Buffer) 的全血改进 LATE-PCR(Improved LATE-PCR, imLATE-PCR) 方法。考察了方法的最优扩增体系、血液抗凝剂对其影响以及全血模板量。采用单管、一步法直接扩增出单链测序模板, 成功地对 24 例临床血样的乙醇脱氢酶基因多态性进行了检测, 检测结果可用于指导临床个体化用药。24 例样本的基因型分别为 ADH1B 位点 AA 纯合 6 例、AG 杂合 14 例、GG 纯合 4 例; ADH1C 位点 GG 纯合 20 例、AG 杂合 4 例、AA 纯合 0 例。

关键词 全血直接扩增; 线性指数聚合酶链式反应; 焦磷酸测序; 基因多态性; 酒精代谢

1 引 言

随着基因组学及后基因组学的发展, 人们意识到基因多态性在阐明疾病的发生和发展、毒物的易感性及耐受性、疾病临床表现的多样性以及对药物治疗的反应上都起着重要作用, 而单核苷酸多态性是目前最受关注的一类多态性。

焦磷酸测序技术是通过核苷酸和单链模板结合后释放焦磷酸引发酶级联反应, 促使荧光素发光并进行检测的一种核酸测序技术^[1~3], 用于基因多态性检测^[4]、微生物分型^[5]、基因甲基化检测^[6]等领域, 尤其是在大规模 DNA 测序中^[7]的应用, 使测序技术发生了革命性变化。但是目前焦测序的单链模板制备主要采用固相微球法^[8], 该方法操作步骤繁琐且效率较低; 使用生物素标记引物、链亲和素包被微球增加了检测的成本; 同时, 单链制备过程中容易引起样品的交叉污染, 以上不足极大地妨碍了焦测序技术的临床应用^[9]。

为了解决单链模板制备问题, 可以采取不对称 PCR 直接产生单链产物^[10], 但常规不对称 PCR 方法扩增单链的效率低, 无法得到广泛使用。线性指数 PCR(Linear-after-the exponential-polymerase chain Rreaction, LATE-PCR) ^[11]在不对称 PCR 的基础上, 通过优化引物浓度和 T_m 值, 可获得接近对称 PCR 的扩增效率, 产生大量单链 DNA 产物, 能够满足基于单链核酸序列的杂交、实时荧光 PCR 等反应的需要^[12]。但是 LATE-PCR 引物设计要求严格, 且随着 PCR 的进行, 非限制性引物与扩增产物产生竞争, 若扩增片段较长则得到的单链 DNA 产率会降低。改进的 LATE-PCR 方法(Improved LATE-PCR, imLATE-PCR) ^[13]弥补了 LATE-PCR 的不足, 增加非限制性引物长度, 减少限制性引物长度, 使两者的 T_m 差值更大, 引物的设计相较于 LATE-PCR 更为宽泛, 产生扩增片段长度也更长, 扩大了不对称 PCR 的实际使用范围。

为了提高基因检测速度, 降低样本污染的可能性, 本研究将全血直接扩增和 imLATE-PCR 技术相结合, 建立了基于普通 rTaq 聚合酶和“高 pH 缓冲液(HpH Buffer) ”的全血 imLATE-PCR 扩增方法。本方

2014-05-06 收稿; 2014-09-09 接受

本文系江苏省科技支撑计划社会发展项目(No. BE2012744); 中国博士后科学基金特别资助项目(No. 2013T60962); 南京军区南京总医院院内课题(No. 2013053); 江苏省青蓝工程资助

* E-mail: songqinxin@sina.com

法具有以下优点: (1) 检测速度快, 操作简便。采用全血直接作为扩增单链 DNA 测序的模板, 省去了 DNA 提取和单链模板制备两个繁琐的步骤, 极大提高了检测速度, 简化了操作过程, 缩短了检测时间; (2) 成本低, 经济环保。无需制备 DNA 单链可以避免使用生物素修饰引物和磁性微球, 无需 DNA 提取可以省去大量有机试剂和实验耗材, 降低了成本; (3) 污染少。避免了 DNA 提取和模板制备过程中反复打开管盖进行加液、移液等操作, 减少了平行测多份样品时交叉污染的可能性; (4) 灵敏度高。实验表明, 0.1 μL 全血即采用指尖取血即可得到较好的测序结果, 应用于临床检测方便、快速^[14]。采用本方法对酒精代谢相关基因 ADH1B、ADH1C 进行了基因多态性焦测序检测, 用于临床快速评估人体酒精代谢能力, 对于预防与饮酒行为相关的多种疾病, 以及常规体检监测有重要意义。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

EDC-10 基因扩增仪(东胜创新生物科技有限公司); 小型焦测序仪(日本 Hitachi 公司)。

三磷酸腺苷硫酸化酶(ATP-sulfurylase)和 Klenow 聚合酶为实验室自表达; rTaq DNA 聚合酶、500 bp DNA Ladder marker(日本 Takara 公司); 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、QuantiLum[®] 重组荧光素酶(美国 Promega 公司); 腺苷三磷酸双磷酸-Ⅶ(Apyrase-Ⅶ)、腺苷-5'-磷酸硫酸(Adenosine 5'-phosphosulfate, APS)、牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA)(美国 Sigma 公司); Sepharose Beads(美国 GE Healthcare 公司); α -硫化三磷酸腺苷(dATP α S)、三磷酸脱氧胞苷酸(dCTP)、三磷酸脱氧鸟苷酸(dGTP)、三磷酸脱氧胸腺苷酸(dTTP)(美国 Amersham Pharmacia 公司); 其它试剂均为分析纯; 实验用水均为灭菌二次蒸馏水。

所有引物由上海 Invitrogen 公司合成, 具体引物名称及序列见表 1。

2.2 实验方法

2.2.1 imLATE-PCR 引物设计 本研究选取与酒精代谢相关的乙醇脱氢酶(ADH)基因中中国人较常见位点进行扩增。扩增引物使用 Primer 5.0 软件进行设计, 引物设计原则: $T_m^E - T_m^L \geq 5$ $^{\circ}\text{C}$; $T_m^A - T_m^E \leq 13$ $^{\circ}\text{C}$ ^[13] (T_m^E 为过量引物 T_m 值, T_m^L 为限制性引物 T_m 值, T_m^A 为扩增产物 T_m 值)。 T_m 值计算采用 OligoAnalyzer 3.1 软件(地址: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>)。本实验中所用到的 PCR 扩增引物见表 1。

表 1 检测乙醇脱氢酶 ADH1B、ADH1C 基因多态性的 imLATE-PCR 引物

Table 1 Sequences of improved linear-after-the-exponential polymerase chain reaction (imLATE-PCR) primers for alcohol dehydrogenase gene ADH1B, ADH1C

引物名称 Primers	引物序列(5'-3') Sequence of primer	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	浓度 Con. ($\mu\text{mol/L}$)	$T_m^E - T_m^L$ ($^{\circ}\text{C}$)	产物长度 Length of product (bp)	T_m^A ($^{\circ}\text{C}$)
ADH1B-P _E	CTTCTCCAACACTCTCCACGAT	65.5	1	5.6	236	84.8
ADH1B-P _L	GGATTAGTAGCAAAAACCTCAAA	59.9	0.1			
ADH1C-P _E	ACAAGCCAGGTAACAAAAAGATGA	65.1	1	4.4	205	83.7
ADH1C-P _L	AAAGGAAATGACTGATGGAGGT	60.7	0.1			

T_m^E 为过量引物 T_m 值, T_m^L 为限制性引物 T_m 值, T_m^A 为扩增产物 T_m 值。

T_m^E : T_m of excess primer, T_m^L : T_m of limiting primer, T_m^A : T_m of PCR product.

2.2.2 全血 imLATE-PCR 扩增 取抗凝外周全血样本 1 μL (本研究中血样均来源于南京军区总院受试者, 受试者已签署知情同意书并获得伦理委员会同意。除特别说明, 抗凝血所用抗凝剂均为 EDTA 二钾。)直接用于 ADH1B、ADH1C 位点的目的片段扩增。PCR 反应体系包括用于全血 PCR 反应的 H_pH Buffer(100 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, pH 9.3~9.5) 5.35 μL , 2 mmol/L Mg²⁺, dNTPs 100 $\mu\text{mol/L}$, 过量引物(P_E) 1 $\mu\text{mol/L}$, 限制性引物(P_L) 0.1 $\mu\text{mol/L}$, Taq 酶 2.5 U, 适当 PCR 添加剂(10% BSA 和 5% 吐温 20), 全血模板 1 μL , 加水补充至 50 μL 。ADH1B 位点 PCR 反应条件: 3 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; 55 $^{\circ}\text{C}$, 3 min); 65 个循环(90 $^{\circ}\text{C}$, 10 s; 53 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 20 s)。ADH1C 位点 PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 65 个循环(90 $^{\circ}\text{C}$, 10 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 20 s)。

2.2.3 单链扩增产物处理以及焦磷酸测序 imLATE-PCR 扩增产物除了大量单链 DNA 可用做测序模板, 还含有过量的 dNTPs、延伸产生的 PPi、部分未完全延伸的产物等, 这些成分都会对后续的焦测序反应造成影响。因此, 扩增产物需经过处理后方可进行焦测序反应。本研究使用自制的焦测序反应液^[15]对产物进行处理, 主要成分为 0.1 mol/L Tris-HAc (pH 7.7), 2 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Mg(Ac)₂, 0.1% BSA, 1 mmol/L DTT, 80 μmol/L APS, 0.4 mmol/L D-虫萤光素, 60 U/mL ATP-sulfurylase, 1.6 U/mL Apyrase-VII, 18 U/mL Klenow 聚合酶, 适量荧光素酶。反应液中的 APS 可以和延伸产生的 PPi 作用生成 ATP, 过量的 dNTPs 和少量的 ATP 可以在 Aprase-VII 作用下发生降解, 从而减少对焦测序反应的影响^[10]。具体步骤为: 取 3 μL imLATE-PCR 扩增产物, 加入自制焦测序反应液, 置于小型焦磷酸测序仪中, 室温反应 5 min; 加入 10 pmol 测序引物, 常温下退火 5 min, 再循环加入 dATPαS, dCTP, dTTP 和 dGTP 进行焦测序反应。测序引物如下: ADH1B: 5'-ATGGTGGCTGTAGGAATCTGTC-3', ADH1C: 5'-TTTCGTTTGAAGTCATCGGTC-3'。

3 结果与讨论

3.1 PCR 扩增体系对全血 imLATE-PCR 的影响

以全血代替 DNA 作为模板, 其中的免疫球蛋白 G、血红蛋白和乳铁蛋白等成分会抑制 PCR 反应, 且常用血液抗凝剂 EDTA 或肝素也会抑制 PCR 反应。所以, 采用全血代替 DNA 作为 PCR 反应模板时, 需要调整 PCR 反应体系。本实验室之前报道的“HpH Buffer”体系可以很大程度上减少全血成分对 PCR 扩增的影响, 主要由于高 pH 值的缓冲体系可以使蛋白质表面带负电, 抑制其与带负电的基因组 DNA 相互作用, 从而降低对 PCR 反应的抑制作用^[16]。

图 1 为以全血和基因组 DNA 为模板, 采用常规 PCR 扩增体系(T-mix Buffer: 10 × Buffer, 10 mmol/L dNTP和 25 mmol/L MgCl₂, pH 8.5 ~ 8.8) 和“HpH Buffer”体系进行 PCR 扩增的效果。结果表明: 以全血

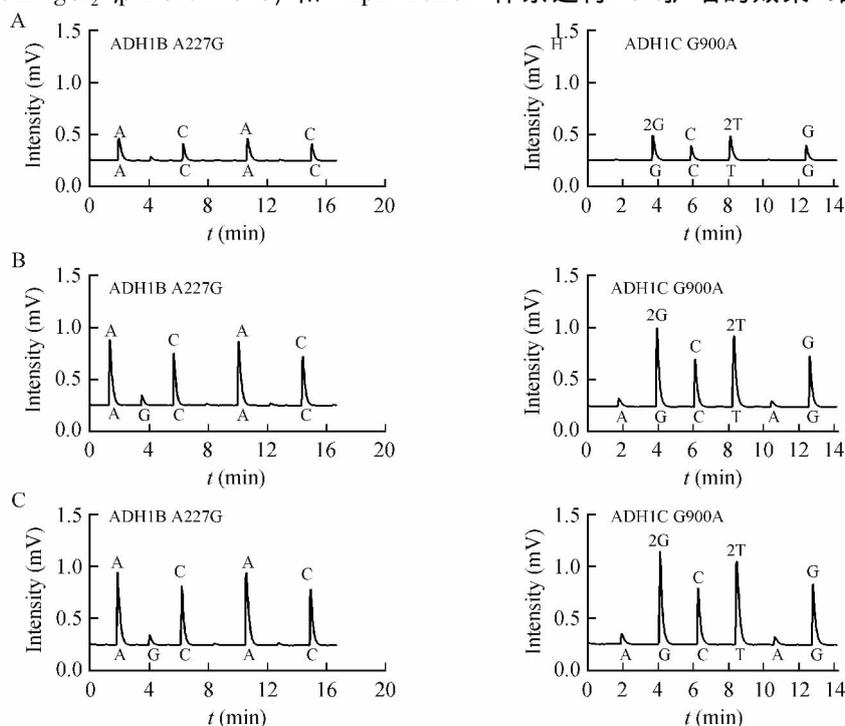


图 1 ADH1B 基因 A227G 位点和 ADH1C 基因 G900A 位点采用不同 PCR 扩增体系的焦测序结果(A. 全血为模板, 普通 PCR 扩增体系; B. 纯化的基因组 DNA 为模板, 含 HpH Buffer 的 PCR 扩增体系; C. 全血为模板, 含 HpH Buffer 的 PCR 扩增体系)

Fig. 1 Pyrosequencing results of the ADH1B A227G and ADH1C G900A with different PCR amplification buffer (A. Whole blood as template, T-mix PCR amplification buffer; B. Genomic DNA as template, HpH PCR amplification buffer; C. Whole blood as template, HpH PCR amplification buffer); HpH: high pH.

为模板时,采用常规 PCR 扩增体系(图 1A)的扩增效率较低,焦测序峰信号较低,无法进行准确的 SNP 分型。采用 HpH Buffer 进行 PCR 扩增,以基因组 DNA(图 1B)和全血(图 1C)为模板都可以得到较好的扩增效果,焦测序峰信号强度大,可以准确进行 SNP 分型。

3.2 全血 imLATE-PCR 扩增血液模板量考察

考察了上述方法在进行全血 imLATE-PCR 扩增时 0.05, 0.10, 0.50, 1.00 和 2.00 μL 5 个模板加入量对扩增和测序结果的影响。结果表明 50 μL 扩增体系中加入 0.10~2.00 μL 的 EDTA 抗凝全血作为模板进行扩增,扩增产物经处理后进行焦测序,均可得到良好的焦测序结果(图 2),扩增产物的检测平均单碱基信号值分别为 0.629、0.794、0.879、0.883,均可进行准确的 SNP 分型。由此证明,本方法仅需 0.10 μL 全血样本就可对乙醇脱氢酶的两个 SNP 位点进行焦测序检测并分型,大大减少了对病人的创伤。

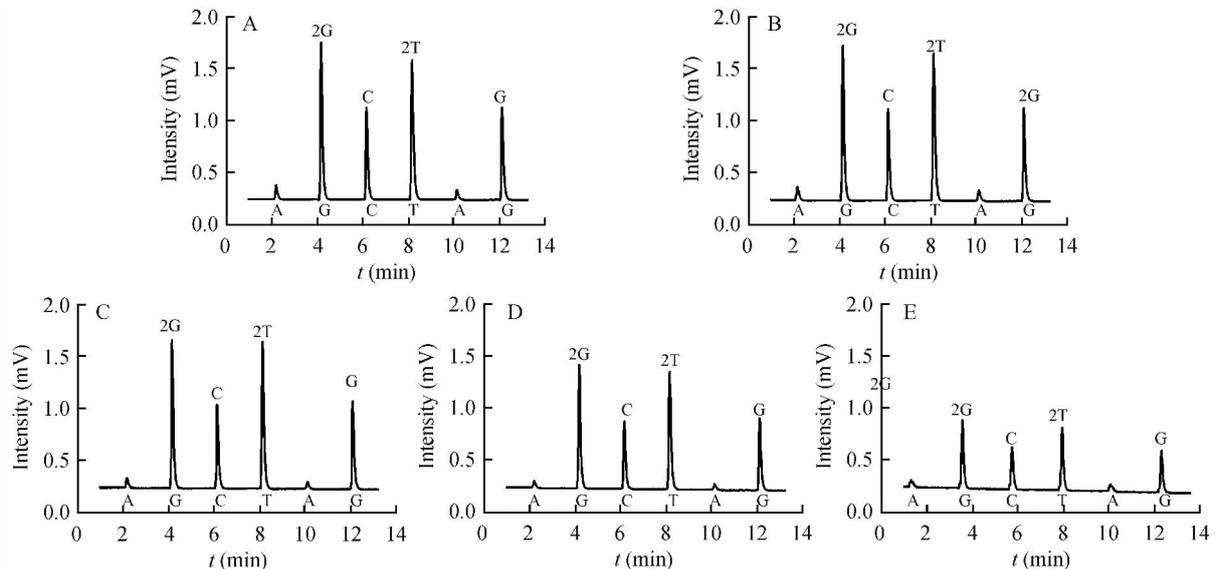


图 2 ADH1C 基因 G900A 不同血液模板量的焦测序检测结果(A. 2.00 μL ; B. 1.00 μL ; C. 0.50 μL ; D. 0.10 μL ; E. 0.05 μL 全血作为焦测序模板)

Fig. 2 Pyrosequencing results of ADH1C G900A with different amount of anticoagulated blood PCR amplicons (A. 2.00 μL ; B. 1.00 μL ; C. 0.50 μL ; D. 0.10 μL ; E. 0.05 μL whole blood were used as template, respectively)

3.3 乙醇脱氢酶 ADH1B、ADH1C 基因 SNP 位点检测

对收集到的 24 例临床血样的乙醇脱氢酶基因 ADH1B、ADH1C 的多态性检测结果(图 3)显示,本方法测序结果较好,测序信号强度高,可以进行准确的 SNP 分型。24 例样本的基因型测序结果如表 2 所示,其中 ADH1C 位点 AA 纯合型本实验中未检测到,而 NCBI 数据库也显示了亚洲人群中 AA 型基因频率接近于 0。为了验证测序结果的准确性,从 24 例样本中抽取 10 例进行 Sanger 测序(图 4)结果与本实验的测序结果完全一致,证明了本方法的准确性。ADH1B 位点的 AA 型和 ADH1C 位点的 GG 型的患者酒精代谢能力较强,可加快乙醇向乙醛转化的速度,易产生面红、恶心等反应,使饮酒者对乙醇耐受性降低,一定程度上可以避免产生酗酒或酒精依赖^[17]; ADH1B 位点的 GG 纯合型和 ADH1C 位点的

表 2 24 例临床全血样本的基因分型结果

Table 2 Genotyping results of two SNPs in 24 clinical samples by the proposed method

基因 Genes	单碱基突变位点 Single nucleotide polymorphism sites (SNPs)	位点基因型 Genotypes	样本数 Sample numbers (n)
ADH2* 2(ADH1B* 2)	A227G	Homozygote(AA)	6
		Homozygote(GG)	14
		Heterozygote(AG)	4
ADH3* 2(ADH1C* 2)	G900A	Homozygote(GG)	20
		Homozygote(AA)	0
		Heterozygote(GA)	4

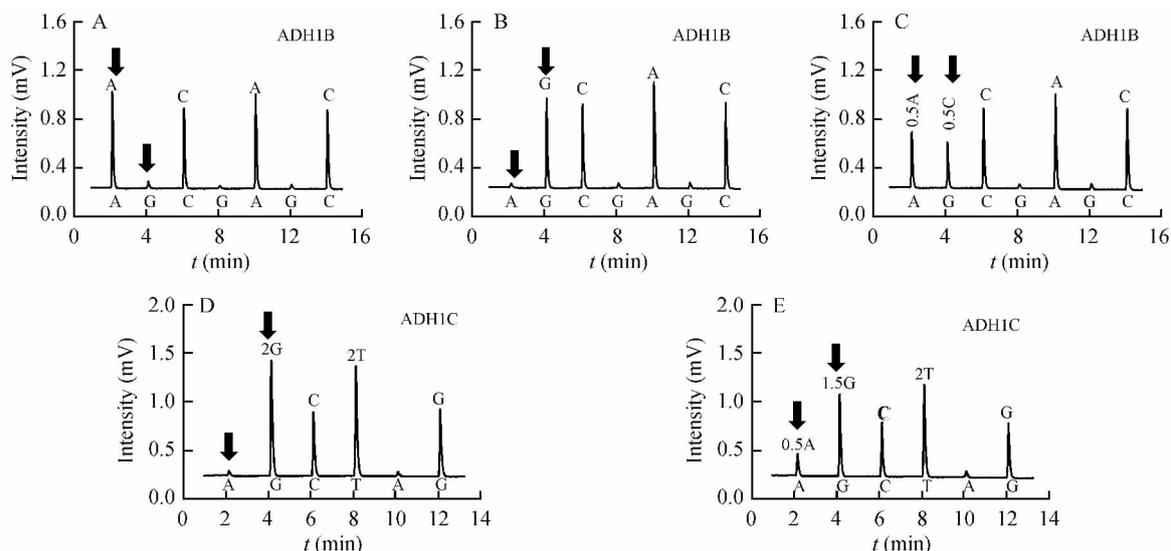


图 3 ADH1B 基因 A227G 多态性(A. AA 纯合; B. GG 纯合; C. AG 杂合)和 ADH1C 基因 G900A 多态性(D. GG 纯合; E. GA 杂合)的典型焦测序结果

Fig. 3 Typical pyrograms of ADH1B A227G polymorphisms (A. AA homozygote; B. GG homozygote; C. AG heterozygote) and Typical pyrograms of ADH1C G900A polymorphisms (D. GG homozygote; E. GA heterozygote)

AA 型患者的乙醇代谢能力较弱,易产生酒精依赖和酒精滥用,临床应建议减少酒精的摄入^[18]。

考察了临床上常用的 3 种血液抗凝剂 EDTA 二钾、柠檬酸钠和肝素钠对全血 imLATE-PCR 扩增的影响。结果表明,3 种抗凝剂对扩增无明显影响,均能够得到准确的测序结果。

3.4 本方法与传统焦测序检测方法的比较

表 3 是本实验方法和传统焦磷酸测序检测方法^[20,21]在耗时和成本方面的比较。本方法以全血作为模板省去了 DNA 提取过程,从收到样本到得到 PCR 扩增产物可在 2 h 内完成,同时降低了样品间交叉污染的可能性;另外,高灵敏的焦磷酸测序在保证检测准确性的前提下仅使用 0.10 μL 全血或 3.00 μL PCR 产物,与传统焦磷酸测序方法相比,成本下降了约 40%。

表 3 全血 imLATE-PCR 方法与传统方法的耗时和成本比较

Table 3 Comparison of labour and cost between the present method and conventional method

	传统方法 Conventional PCR-based pyrosequencing		全血 imLATE-PCR 方法 Whole-blood imLATE-PCR-based pyrosequencing	
	耗时 Time (h)	成本(元) Cost (RMB)	耗时 Time (h)	成本(元) Cost (RMB)
基因组 DNA 提取 gDNA extraction ^a	~0.5	24.0		
PCR 扩增 PCR amplification ^b	~2.0	5.0	~2.0	5.0
单链模板制备 ssDNA preparation ^c	~0.5	15.0	—	—
焦磷酸测序 Pyrosequencing ^d	~0.5	54.0	~0.5	54.0
总计 Total	~3.5	98.0	~2.5	59.0

^a基因组 DNA 提取使用 QIAamp DNA 血液提取试剂盒。^b传统 PCR 方法和全血 imLATE-PCR 方法均使用 rTaq DNA 聚合酶。^c传统基于 PCR 的焦测序方法单链 DNA 制备使用链亲和素琼脂糖珠。^d传统基于 PCR 的焦测序方法采用 PyroMark Gold Q24 焦测序试剂。

^aQIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) was used for gDNA extraction. ^brTaq DNA polymerase (TaKaRa) was used for conventional PCR and whole blood-imLATE-PCR. ^cStreptavidin Sepharose beads (GE Healthcare) were used for ssDNA preparation in conventional PCR-based pyrosequencing. ^dPyroMark Gold Q24 Reagents (QIAGEN) were used for conventional PCR-based pyrosequencing.

4 结 论

乙醇脱氢酶基因多态性导致乙醇在不同个体中的代谢速率不同。研究表明,急性酒精中毒、酒精性肝病、胰腺炎、心脑血管疾病、肝癌以及结直肠癌等一些癌症都与乙醇脱氢酶基因多态性有关^[17,18]。乙醇对许多肿瘤是一种促癌剂,已有报道表明乙醇代谢酶基因多态性与肿瘤发生密切相关^[19]。所以检测酒精代谢相关基因的多态性,评估人体酒精代谢能力,可用于预防与饮酒相关疾病,对人类健康有着非

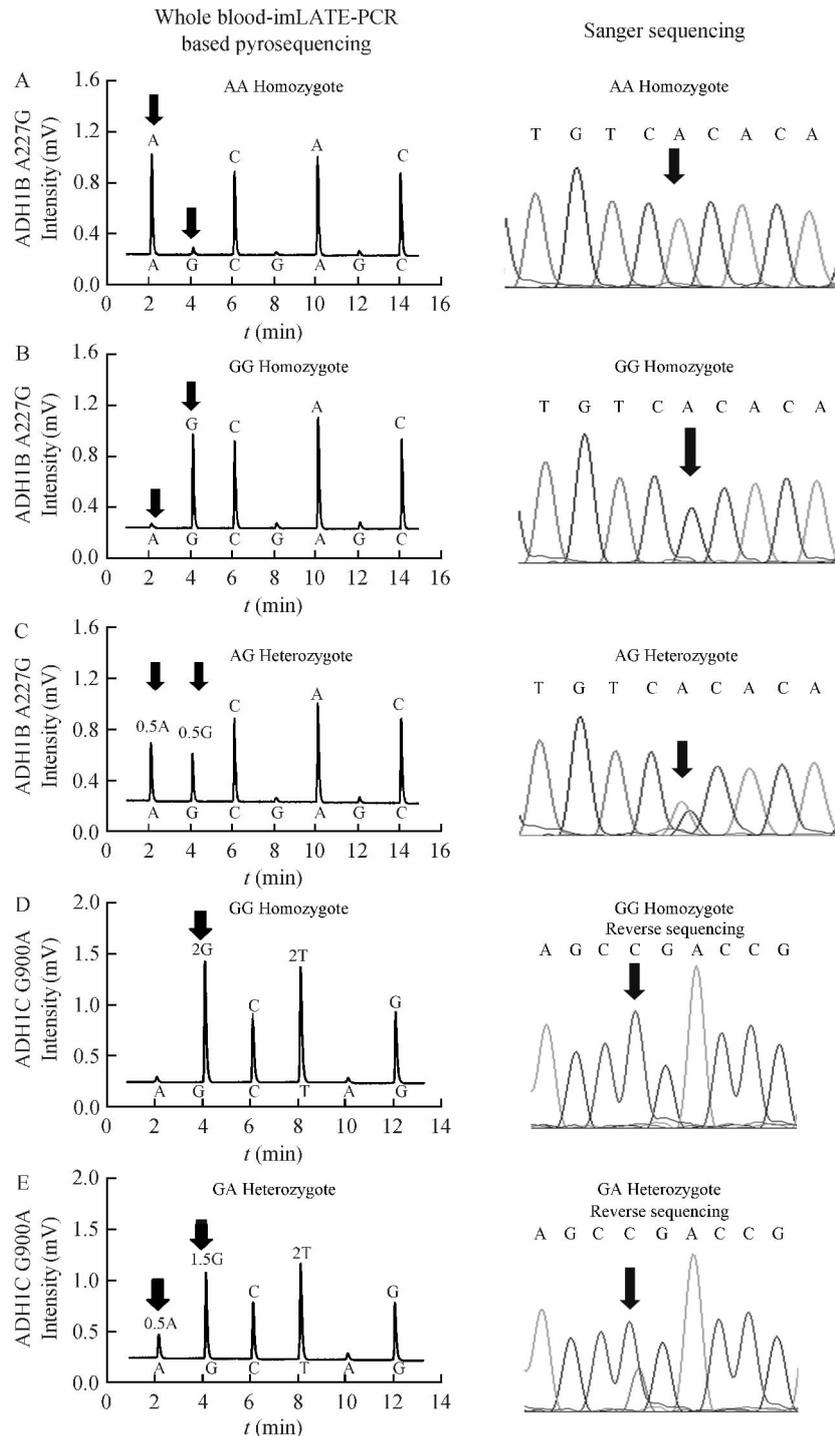


图4 ADH1B 基因 A227G 多态性 (A. AA 纯合; B. GG 纯合; C. AG 杂合) 和 ADH1C 基因 G900A 多态性 (D. GG 纯合; E. GA 杂合) 全血 imLATE-PCR 方法与 Sanger 测序法测序结果

Fig.4 Results of ADH1B gene A227G polymorphism (A. AA homozygote; B. GG homozygote; C. AG heterozygote) and ADH1C gene G900A polymorphism (D. GG homozygote; E. AG heterozygote) of the Whole blood-imLATE-PCR based pyrosequencing and Sanger sequencing

常重要的意义。

本研究改进了 LATE-PCR 方法,采用“HpH Buffer”以全血为模板直接扩增,建立了全血 imLATE-PCR 方法,该方法具有检测速度快、灵敏度高、污染少、成本较低等优点,为临床上检测基因多态性和疾病早期预警提供了新手段。

References

- 1 Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. *Science*, **1998**, 281(5375): 363 – 365
- 2 CHEN Zhi-Yao, ZHOU Guo-Hua. *Progress in Modern Biomedicine*, **2008**, 8(8): 1573 – 1576
陈之遥, 周国华. *现代生物医学进展*, **2008**, 8(8): 1573 – 1576
- 3 YE Hui, LIU Yun-Long, ZOU Bing-Jie, WU Hai-Ping, ZHOU Guo-Hua. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2013**, 41(9): 744 – 748
叶卉, 刘云龙, 邹秉杰, 武海萍, 周国华. *分析化学*, **2013**, 41(9): 744 – 748
- 4 Chen Z Y, Fu X Y, Zhang X D, Liu X Q, Zou B J, Wu H P, Song Q X, Li J H, Kajiyama T, Kambara H, Zhou G H. *Chem. Commun.*, **2012**, 48(18): 2445 – 2447
- 5 Yang H Y, Huang H, Wu H P, Zou B J, Zhou G H, Kajiyama T, Kambara H. *Anal. Methods*, **2011**, 3(11): 2517 – 2523
- 6 Brakensiek K, Wingen L U, Langer F, Kreipe H, Lehmann U. *Clin. Chem.*, **2007**, 53(1): 17 – 23
- 7 Schuster S C. *Nat. Methods*, **2008**, 5(1): 16 – 18
- 8 Diggle M A, Clarke S C. *Mol. Biotechnol.*, **2003**, 24(2): 221 – 224
- 9 Royo J L, Hidalgo M, Ruiz A. *Nat. Protoc.*, **2007**, 2(7): 1734 – 1739
- 10 YANG Hui-Yong, XI Tao, LIANG Chao, CHEN Zhi-Yao, XU Ding-Bang, ZHOU Guo-Hua. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2009**, 37(4): 489 – 494
杨会勇, 奚涛, 梁超, 陈之遥, 徐定邦, 周国华. *分析化学*, **2009**, 37(4): 489 – 494
- 11 Salk J J, Sanchez J A, Pierce K E, Rice J E, Soares K C, Wangh L J. *Anal. Biochem.*, **2006**, 353(1): 124 – 132
- 12 Liu Y L, Wu H P, Ye H, Chen Z Y, Song Q X, Zou B J, Rui G J, Zhou G H. *Anal. Methods*, **2014**, 6(5): 1384 – 1390
- 13 Song Q X, Yang H Y, Zou B J, Kajiyama T, Kambara H, Zhou G H. *Analyst*, **2013**, 38(17): 4991 – 4997
- 14 LIU Yun-Long, CHEN Zhi-Yao, WU Hai-Ping, ZHOU Guo-Hua. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2012**, 40(7): 1037 – 1042
刘云龙, 陈之遥, 武海萍, 周国华. *分析化学*, **2012**, 40(7): 1037 – 1042
- 15 Wu H P, Wu W J, Chen Z Y, Wang W P, Zhou G H, Kajiyama T, Kambara H. *Anal. Chem.*, **2011**, 83(9): 3600 – 3605
- 16 Bu Y, Huang H, Zhou G H. *Anal. Biochem.*, **2008**, 375(2): 370 – 372
- 17 ZENG Fang-Fang, LIU Sheng-Yuan, WANG Bin-You. *Chin. J. Dis. Control Prev.*, **2008**, 12(2): 164 – 167
曾芳芳, 刘盛元, 王滨有. *疾病控制杂志*, **2008**, 12(2): 164 – 167
- 18 Yamauchi M, Maezawa Y, Mizuhara Y, Ohata M, Hirakawa J, Nakajima H, Toda G. *Hepatology*, **1995**, 22(4): 1136 – 1142
- 19 ZHANG Zhu-Mei, BIAN Jian-Chao. *Chin. J. Med. Genet.*, **2001**, 18(1): 62 – 65
张竹梅, 边建超. *中华医学遗传学杂志*, **2001**, 18(1): 62 – 65
- 20 Royo J L, Hidalgo M, Ruiz A. *Nat. Protoc.*, **2007**, 2(7): 1734 – 1739
- 21 Royo J L, Galan J J. *Methods Mol. Biol.*, **2009**, 578: 123 – 133

Genotyping of Alcohol Dehydrogenase Gene by Pyrosequencing Coupled with Improved Linear-after-the-Exponential Polymerase Chain Reaction Using Human Whole Blood as Starting Material

XIANG Zheng¹, LIU Yun-Long², XING Xiao-Qing¹, CHU Ya-Nan², SONG Qin-Xin^{*1,2}, ZHOU Guo-Hua^{1,2}

¹(Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance of Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

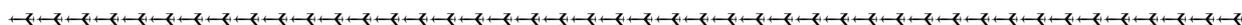
²(Department of Pharmacology, Jinling Hospital, Nanjing University School of Medicine, Nanjing 210002, China)

Abstract Pyrosequencing is one of the important genetic polymorphism detection methods currently, but the complicated pretreatment procedure limits its application in clinical test. To simplify the whole process of

pyrosequencing, on the basis of the linear-after-the-exponential-polymerase chain reaction (LATE-PCR), we improved the primer design method of LATE-PCR, increased the length and the concentration of the excess primer, applied direct amplification technology with whole blood, and established a whole blood-imLATE-PCR method based on common rTaq polymerase and "HpH Buffer" (High pH buffer). The amplification system was optimized, and the influences of blood anticoagulant and the amount of whole blood template were investigated. The single stranded template for the pyrosequencing was obtained by PCR amplification using a single tube in one-step process, and the alcohol dehydrogenase gene polymorphisms of 24 clinical blood samples were then detected successfully. The results could be used to guide clinical individualized medication. The genotypes of ADH1B locus of 24 samples were 6 cases of AA homozygote, 14 cases of AG heterozygote, and 4 cases of GG homozygote. The genotypes of ADH1C were 20 cases of GG homozygote, 4 cases of AG heterozygote, and no cases of AA homozygote.

Keywords Whole blood-polymerase chain reaction; Linear-after-the-exponential-polymerase chain reaction; Pyrosequencing; Gene polymorphism; Ethanol metabolism

(Received 6 May 2014; accepted 9 September 2014)



中国化学会第十二届全国分析化学年会 (第一轮通知)

中国化学会和国家自然科学基金委主办、华中师范大学承办的“第十二届全国分析化学年会”定于 2015 年 5 月 8 日至 11 日在武汉洪山大礼堂召开。这是我国分析化学领域三年一届的盛会,会议将就我国自上届学术会议以来分析化学学科的新成就、新进展进行学术交流和研讨,会议将组织分析化学前沿的大会报告、分组报告和讨论,并邀请部分国外学者和海外华裔学者与会。热忱欢迎广大的分析化学工作者踊跃投稿和参加会议。现将有关事项通知如下:

一、征文内容

(1) 原子光谱分析; (2) 分子光谱分析; (3) 色谱法与分离科学; (4) 电分析化学; (5) 波谱分析(包括顺磁、核磁共振); (6) 质谱分析; (7) 显微成像分析; (8) 微流控芯片分析; (9) 联用方法与自动化分析; (10) 形态、表面及结构分析; (11) 生物分析化学; (12) 药物和代谢物分析; (13) 环境分析化学; (14) 食品分析; (15) 蛋白质分析; (16) 核酸分析; (17) 纳米分析化学; (18) 分析仪器及装置; (19) 质量控制; (20) 化学计量学与生物信息学。凡已在刊物上发表或在全国会议上报告过的论文不在应征之列。此外,本次会议的交流形式包括大会报告、邀请报告、口头报告和墙报交流,并设优秀墙报奖,诚挚欢迎积极参与(<http://ac.ccnu.edu.cn>)。

二、征文要求

应征论文须用 Word 软件编辑,包括题目、作者、单位、必要的图表、结果和讨论、主要参考文献(2~5 篇),用 A4 纸,版心尺寸为 15 cm × 24 cm,标题用小三号黑体,正文用小四号宋体,全文(包括图表)一般为 1 页,请勿超过 2 页。文末须附英文题目、作者姓名和单位。截稿日期:2015 年 3 月 15 日。

三、收稿地址

网上投稿和会议注册将于 2014 年 10 月 1 日开通,请尽量网上投稿。如果通过电子邮件投稿,请发至: ac2015china@163.com,并在邮件中注明“会议征文”和论文第一作者及通讯联系人的姓名、职称、工作单位、邮编、联系电话及 E-mail。同时,为便于分类,请在邮件主题中注明稿件类别(如 1 原子光谱分析; 2 分子光谱分析; 3 色谱法与分离科学; 4 电分析化学; 5 波谱分析; 6 质谱分析等)。

有关稿件的处理意见、会议具体日程、注册费用、住宿安排等项事宜请见第二轮通知。会议筹备组联系人:

杨光富: 027-67867800, gfyang@mail.ccnu.edu.cn;

钟鸿英: 027-67862616, hyzhong@mail.ccnu.edu.cn

张爱东: 027-67867635, adzhang@mail.ccnu.edu.cn

徐 晖: 027-67867953, huixu@mail.ccnu.edu.cn

本会欢迎国内外分析仪器公司、厂商到会介绍和展出产品,有关具体事宜请与筹备组联系。

第十二届全国分析化学年会筹备组