

# 直接半巢式PCR结合测序鉴定ApoE基因型的方法的建立

黄振辉<sup>1\*</sup>, 尹明星<sup>2\*</sup>, 游娟<sup>2#</sup>, 何震宇<sup>2#</sup>

<sup>1</sup>广东药科大学药学院, 广东 广州

<sup>2</sup>广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广东 广州

收稿日期: 2022年4月25日; 录用日期: 2022年11月15日; 发布日期: 2022年11月24日

## 摘要

目的: 建立一种直接使用口腔上皮细胞为模板PCR扩增ApoE基因rs429358和rs7412位点从而采用桑格法测序鉴定ApoE基因型的方法。方法: 自行设计3条引物, 以口腔上皮细胞粗处理物为模板, 通过半巢式PCR扩增包含ApoE基因2个SNP位点的靶片段, PCR产物经桑格法测序鉴定样本基因型。结果: 所检样本能扩增出预期大小的PCR产物, 测序峰图清晰。结论: 成功建立了一种直接半巢式PCR结合测序鉴定ApoE基因型的方法, 有良好的应用前景。

## 关键词

ApoE基因, 直接半巢式PCR, 测序

# Establishment of Method for Identifying ApoE Genotype by Direct Semi-Nested PCR Combined with Sequencing

Zhenhui Huang<sup>1\*</sup>, Mingxing Yin<sup>2\*</sup>, Juan You<sup>2#</sup>, Zhenyu He<sup>2#</sup>

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

<sup>2</sup>School of Life Science and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong

Received: Apr. 25<sup>th</sup>, 2022; accepted: Nov. 15<sup>th</sup>, 2022; published: Nov. 24<sup>th</sup>, 2022

## Abstract

**Objective:** To establish a method for identifying ApoE genotype by PCR and Sanger sequencing di-

\*共同第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 黄振辉, 尹明星, 游娟, 何震宇. 直接半巢式 PCR 结合测序鉴定 ApoE 基因型的方法的建立[J]. 生物过程, 2022, 12(4): 199-204. DOI: 10.12677/bp.2022.124022

rectly using oral epithelial cells. **Methods:** Self-designed three primers were used to amplify the target fragments containing two SNP loci of ApoE gene by semi-nested PCR. The PCR products were sequenced to identify the genotype of the samples. **Results:** The PCR products of the expected size can be amplified from the tested samples, and the sequencing peak diagram is clear. **Conclusion:** A method of direct semi-nested PCR combined with sequencing to identify ApoE gene was successfully established, which has a certain application value.

## Keywords

Apolipoprotein E Gene, Direct Semi-Nested PCR, Sequencing

Copyright © 2022 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. 引言

载脂蛋白 E (Apolipoprotein E, ApoE)参与机体血脂的运输、存储和排泄,具有重要的生物学功能,其编码基因存在两个主要的功能性 SNP 即 c.388T > C (rs429358)和 c.526C > T (rs7412),它们构成 3 种单倍型,分别是 E2 (388T-526T)、E3 (388T-526C)、E4 (388C-526C)。3 种单倍型构成 6 种不同的基因型即 E2/E2、E3/E3、E4/E4、E2/E3、E2/E4 和 E3/E4 [1]。研究表明, ApoE 基因多态性与阿尔茨海默症[2] [3] [4]、心血管疾病[5] [6] [7]及他汀类降脂药的个体化用药[8] [9] [10]都有密切关系。尽管现有多种 SNP 检测方法可用于 ApoE 基因分型,但测序是业内一致公认的金标准。本研究旨在建立一种通过直接 PCR 获得 ApoE 基因靶片段用于桑格法测序的方法, 以期为临床和相关基础研究服务。

## 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;聚合酶购自生工生物工程(上海)股份有限公司; DNA Marker I 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司; 测序委托北京擎科生物科技有限公司(广州)完成。

### 2.2. 样本

来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

2720 型基因扩增仪(美国 ABI 公司), DYY-6B 型稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂), 凝胶成像系统(英国 Syngene 公司), 5804 R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司)等。

## 3. 实验内容

### 3.1. 引物设计

根据 GenBank 中 ApoE 基因序列信息(登录号: NG\_007084.2)及 rs429358、rs7412 两个多态位点的序列信息,采用引物设计软件初筛引物,再人工加以修改,设计的 3 条引物 P1、P2 和 P3 见图 1,其中 P1 序列与相应的框中序列一致, P2、P3 与相应的框中序列反向互补。

P1、P2 引物对扩增获得的 PCR 产物可以作为模板, 用 P1、P3 引物对进行扩增, 获得的靶片段同时囊括 rs429358、rs7412 两个多态位点。

```

7741 ctcggccgca gggcgctgat ggacgagacc atgaaggagt tgaaggccta caaatcgga
P1
7801 ctggaggaac aactgacccc ggtggcggag gagacgcggg cacggctgtc caaggagctg
7861 caggcggcgc aggcccgct gggcgcgac atggaggacg tggcggccg cctggtgcag
rs429358 位点 T>C
7921 taccgcgcg aggtgcagc catgctcggc cagagcaccg aggagctgcg ggtgcgctc
7981 gcctcccacc tgcgcaagct gcgtaagcgg ctctccgcg atgccgatga cctgcagaag
8041 gcctggcag tgtaccagc cggggcccgc gagggcgccg agcgcggcct cagcgcctc
rs7412 位点 C>T
8101 cgcgagccc tggggcccct ggtggaacag ggcccgctgc gggcccacc tgtggctcc
8161 ctggccgcc agccgctaca ggagcggcc caggcctggg gcgagcggct gcgcgcggc
8221 atggaggaga tggcgagcgc gaccgcgac cgcctggacg aggtgaagga gcaggtggcg
8281 gagtgccgc ccaagctgga ggagcaggcc cagcagatac gcctgcagc cgaggccttc
8341 caggccgccc tcaagagctg gttcgagcc cctggtggaag acatgcagc ccagtggcc
P3
8401 gggctggtgg agaaggtgca ggctcccgtg ggcaccagc cggcccctgt gccacgac
8461 aatcactgaa cgccgaagcc tgcagccatg cgaccccacg ccaccccgtg cctctgctc
P2

```

**Figure 1.** Schematic diagram of primers for amplifying two polymorphic loci of ApoE gene  
**图 1.** 扩增 ApoE 基因两个多态位点的引物示意图

### 3.2. PCR 扩增

第一轮 PCR	反应体系	总体积为 20 $\mu\text{L}$ , 包括口腔上皮细胞粗处理物 2 $\mu\text{L}$ , GC-rich PCR Master Mix 10 $\mu\text{L}$ , 浓度为 10 pmol/ $\mu\text{L}$ 的引物 P1、P2 各 0.5 $\mu\text{L}$ , dd H <sub>2</sub> O 7 $\mu\text{L}$
	反应条件	94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 35 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min
第二轮 PCR	反应体系	总体积为 25 $\mu\text{L}$ : 第一轮 PCR 产物 2 $\mu\text{L}$ , GC-rich PCR Master Mix 12.5 $\mu\text{L}$ , 浓度为 10 pmol/ $\mu\text{L}$ 的引物 P1、P3 各 0.5 $\mu\text{L}$ , MgSO <sub>4</sub> 1 $\mu\text{L}$ , dd H <sub>2</sub> O 8.5 $\mu\text{L}$
	反应条件	94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 63 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min

### 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 4  $\mu\text{L}$  第二轮 PCR 产物于 150 V 电泳 30 min, 用紫外透射仪观察结果, 并拍照保存。

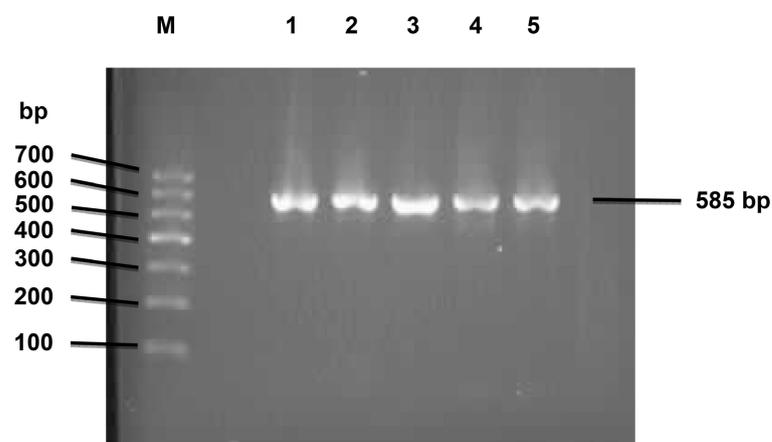
### 3.4. PCR 产物的序列测定

将上述第二轮扩增成功的 PCR 产物委托北京擎科生物科技有限公司测序, 测序引物为前述的引物 P3。

## 4. 实验结果

### 4.1. PCR 产物的电泳鉴定

图 2 的 1~5 号分别为 5 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(585 bp)相符, 表明 PCR 取得成功。

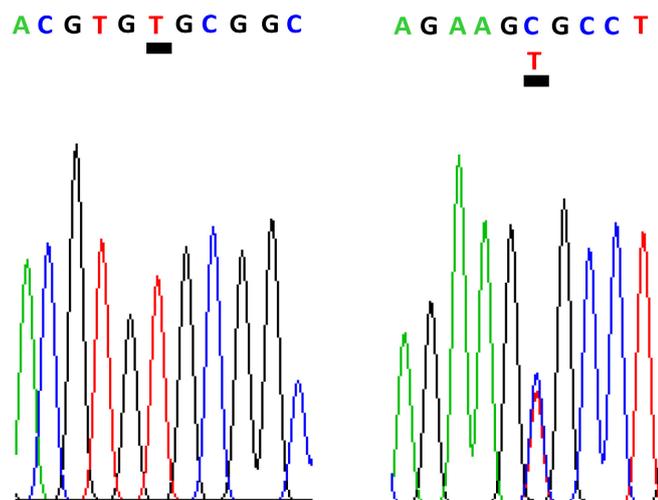


M: DNA 分子量标记 Marker I, 1~5 为不同样本的 PCR 产物。

**Figure 2.** Agarose gel electrophoresis of the semi-nested PCR products  
**图 2.** 半巢式 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

## 4.2. 基因测序结果

ApoE 基因 rs9263726 位点附近的序列为……acgtgYgcggc……, rs7412 位点附近的序列为……agaagYgcctg……, 图 3 的测序峰图不仅能清晰地显示这些序列, 而且能准确地判断基因型, rs9263726 位点基因型为 TT, rs7412 位点基因型为 CT, 两者综合起来为 E2/E3 基因型。



**Figure 3.** Sequencing peak map of two polymorphic loci of ApoE gene  
**图 3.** ApoE 基因两个多态位点的测序峰图

## 5. 讨论

ApoE 基因分型目前在基础和临床研究领域具有广泛的需求, 其分型方法种类繁多, 有的操作复杂, 有的需要贵重仪器, 有的成本很高, 不一而足。

本研究采用直接 PCR 结合测序的方法进行 ApoE 基因的分型, 具有以下几个特点:

1) 直接 PCR 意味着 PCR 使用的模板不需要提纯的 DNA, 而常规的 ApoE 基因分型在 DNA 提取环节往往需要从静脉血中分离白细胞, 然后提纯其 DNA 作模板[11] [12], 本研究采用半巢式 PCR 技术, 第

1 轮 PCR 直接以口腔上皮细胞为模板, 节约了提取基因组 DNA 的时间成本和经济成本, 此外, 不涉及抽血, 采样无创依从性好, 且节约了相关的耗材。

2) ApoE 基因 GC 含量非常高, 而高 GC 含量 DNA 的 PCR 扩增困难重重学界已达成共识[13] [14]。其难点在于模板 DNA 形成的二级结构比较难变性, 94℃ 下可能变性不完全; 退火时引物与模板不能很好地结合, 容易形成错配; 延伸过程也不能很好地进行, 从而使扩增效率大大降低[15] [16], 因此对 PCR 反应条件进行优化十分费劲。本研究前期使用一些常规的 PCR Master Mix 进行实验, 根本无法获得扩增产物, 后来选用了一款名为 GC-rich PCR Master Mix 的扩增预混液, 它包含 DNA polymerase、dNTP、MgSO<sub>4</sub>, GC-rich PCR buffer and stabilizers, 只需加入模板、引物和水就能建立反应体系。本研究在反应体系中使用引物对 P1、P2 和口腔上皮细胞进行 PCR 时, 尽管大部分情况下能获得目的条带(不妨用 P1P2 表示), 但产量明显不足, 因为使用如此粗放且高 GC 含量的模板, PCR 产物的产量不足自然在情理之中。为了解决这个问题, 使用了一条代号为 P3 的引物, 它与 P1 组合使用, 利用 P1P2 做模板进行第 2 轮扩增即所谓的半巢式 PCR, 半巢式 PCR 不仅大幅提高了 PCR 效率而且还提高了 PCR 扩增的特异性。

3) 由于引物设计的巧妙, 本研究用于测序的 PCR 产物包含两个 SNP 位点, 即一个测序反应可以获得 2 个 SNP 位点的序列信息, 既提高了测序环节的效率, 又节约了经济成本。

## 6. 结论

本研究使用简便易得的口腔上皮细胞作为模板直接进行半巢式 PCR 获得包含 ApoE 基因两个主要多态位点的靶片段, 该靶片段可以用于桑格法测序鉴定样品的 ApoE 基因型, 在临床检测和相关的基础研究上具有良好的应用前景。

## 基金项目

广东药科大学 2020 年线上线下混合式一流本科课程立项建设项目; 广东省 2019 年大学生创新训练项目(编号: S201910573042)。

## 参考文献

- [1] Ilveskoski, E., Järvinen, O., Sisto, T., *et al.* (2000) Apolipoprotein E Polymorphism and Atherosclerosis: Association of the Epsilon4 Allele with Defects in the Internal Elastic Lamina. *Atherosclerosis*, **153**, 155-160. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(00\)00388-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(00)00388-9)
- [2] 王琪, 李颖, 秦伟, 等. 阿尔茨海默病患者载脂蛋白 E3 种分型方法的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(2): 156-160.
- [3] Serrano-Pozo, A., Das, S. and Hyman, B.T. (2021) ApoE and Alzheimer's Disease: Advances in Genetics, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. *The Lancet Neurology*, **20**, 68-80. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30412-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30412-9)
- [4] Belloy, M.E., Napolioni, V. and Greicius, M.D. (2019) A Quarter Century of ApoE and Alzheimer's Disease: Progress to Date and the Path Forward. *Neuron*, **101**, 820-838. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.056>
- [5] 刘璵瑜, 张少轲, 谈畅. ApoE 基因多态性与缺血性卒中的相关性研究[J]. 东南大学学报(医学版), 2019, 38(6): 941-946.
- [6] Marais, A.D. (2019) Apolipoprotein E in Lipoprotein Metabolism, Health and Cardiovascular Disease. *Pathology*, **51**, 165-176. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2018.11.002>
- [7] 任家孚, 李婧. ApoE 基因多态性与心血管疾病的研究进展[J]. 心脏杂志, 2022(2): 232-238.
- [8] 高辉, 王杨, 陈婉婷. SLC01B1 和 ApoE 基因多态性与他汀类药物疗效的相关性[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(14): 2300-2303.
- [9] Wang, Y., Du, X., Zhao, R., *et al.* (2021) Association of ApoE Polymorphisms with Lipid-Lowering Efficacy of Statins in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *Annals Academy of Medicine Singapore*, **50**, 474-480. <https://doi.org/10.47102/annals-acadmedsg.2020505>

- [10] Cooper-DeHoff, R.M., Niemi, M., Ramsey, L.B., *et al.* (2022) The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for SLCO1B1, ABCG2, and CYP2C9 Genotypes and Statin-Associated Musculoskeletal Symptoms. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **111**, 1007-1021. <https://doi.org/10.1002/cpt.2557>
- [11] Rihn, B.H., Berrahmoune, S., Jouma, M., *et al.* (2009) ApoE Genotyping: Comparison of Three Methods. *Clinical and Experimental Medicine*, **9**, 61-65. <https://doi.org/10.1007/s10238-008-0012-2>
- [12] Rasmussen, K.L., Tybjaerg-Hansen, A., Nordestgaard, B.G., *et al.* (2020) APOE and Dementia—Resequencing and Genotyping in 105,597 Individuals. *Alzheimers Dement*, **16**, 1624-1637. <https://doi.org/10.1002/alz.12165>
- [13] Mamedov, T.G., Pienaar, E., Whitney, S.E., *et al.* (2008) A Fundamental Study of the PCR Amplification of GC-Rich DNA Templates. *Computational Biology and Chemistry*, **32**, 452-457. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2008.07.021>
- [14] Mousavian, Z., Sadeghi, H.M., Sabzghabae, A.M., *et al.* (2014) Polymerase Chain Reaction Amplification of a GC Rich Region by Adding 1,2 Propanediol. *Advanced Biomedical Research*, **3**, 65. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.125846>
- [15] 邢玉华, 戴素琴, 刘体颜. 高 GC 含量 DNA 模板的 PCR 扩增[J]. 生物技术通讯, 2013, 24(5): 645-649.
- [16] Green, M.R. and Sambrook, J. (2019) Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification of GC-Rich Templates. *Cold Spring Harbor Protocols*, 436-457. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095141>