

亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性的检测方法评价及人群调查

许 慧 岳志刚 郑利民 范秀琴 贾 静 桑 华 蒋 莹 王 虹 黄 燕

摘 要 **目的** 对实时荧光定量 PCR 方法(FQ-PCR)检测亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)进行方法学评价,同时进行大规模的人群 MTHFR C677T 基因多态性调查。**方法** RT-PCR 方法检测结果与测序法比较来验证准确性。将同一份标本分 20 天检测 20 次,以 C_p 值的变异来检测该方法的精密度。用 FQ-PCR 方法与聚合酶链反应-限制性酶片段长度多态性(PCR-RFLP)方法同时检测 50 例患者的 MTHFR C677T 基因型进行方法学比对。验证 FQ-PCR 方法的线性范围。以 FQ-PCR 方法对人群 MTHFR C677T 基因多态性进行大规模调查。**结果** FQ-PCR 方法与测序法 100% 符合。批内、批间精密度的变异系数分别为 1.38%、1.48%。FQ-PCR 在 $6.2 \times 10^2 \sim 6.2 \times 10^4 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 浓度范围内具有良好的线性。两种方法的比对结果没有统计学差异。人群调查发现 MTHFR C677T 基因型 CC、C/T、TT 频率在男女性别中分别为 41.8%、30.9%、27.3% 和 38.3%、32.2%、29.5%,等位基因的频率分别为 57.2%、42.8% 和 54.4%、45.6%。性别之间基因型频率和等位基因频率没有统计学差异。**结论** FQ-PCR 方法可以替代测序法和 PCR-RFLP 方法,是一种快速、便捷、准确、稳定的检测 MTHFR 基因多态性的方法,适用于大规模的检测。

关键词 实时荧光定量 PCR 亚甲基四氢叶酸还原酶 基因多态性

Evaluation of the Method for Polymorphism of Methylenetetrahydrofolate Reductase and Survey the Gene Frequency in a Massive Population. Xu Hui, Yue Zhigang, Zheng Limin, Fan Xiuqin, Jia Jing, Sang Hua, Jiang Ying, Wang Hong, Huang Yan. Laboratory Department, Beijing General Coal Hospital, Beijing 100028, China

Abstract **Objective** To evaluate the method of real-time fluorescent qualitative PCR for polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) C 677 T mutation. To survey the gene frequency of MTHFR C677T in a massive population. **Methods** Sequencing was performed to confirm the accuracy of FQ-PCR. The precision was checked by detecting the same sample 20 times in a period of 20 days and the C_p value was used to describe the variation. FQ-PCR and polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) were compared by detecting 50 samples at the same time. The linearity was verified. **Results** The results of FQ-PCR were in full concordance with that of sequencing. The method could detect human DNA in the range of $6.2 \times 10^2 \sim 6.2 \times 10^4 \text{ pg}/\mu\text{l}$ reaction. There is no significant difference between FQ-PCR and PCR-RFLP method. The inter-group and intra-group CVs of C_p value were 1.38% and 1.48% respectively. The frequency of CC, C/T and TT genotypes of MTHFR C677T was 41.8%, 30.9%, 27.3% and 38.3%, 32.2%, 29.5% in male and female Chinese people respectively, and the allele frequency was 57.2%, 42.8% and 54.4%, 45.6% respectively. There was no significant difference between genders. **Conclusion** The combined merits of reliability, flexibility and simplicity should make the method of FQ-PCR instead of sequencing and PCR-RFLP suitable for routine clinical testing and large scale genotyping.

Key words Real-time fluorescent qualitative PCR; Methylenetetrahydrofolate reductase; Polymorphism

人类亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)是同型半胱氨酸再甲基化过程中的关键酶,它的第 677 个碱基位点易发生突变:由 C 到 T。该基因多态性的检测通常采用聚合酶链反应-限制性酶切片段长度多态性(PCR-RFLP)方法。该方法操作复杂,步骤多,耗时长,不易在临床

大规模使用。实时荧光定量 PCR 方法用于基因多态性研究具有很多优势,本研究旨在评价该方法用于 MTHFR 基因多态性检测的准确性、精密度、稳定性及线性范围,并将其用于人群 MTHFR 的基因型频率及等位基因频率的临床调查。

材料与方法

1. 试剂与仪器:PCR-RFLP 和荧光定量 PCR 试剂(深圳奥萨),基因测序(北京诺赛生物技术有限公司)。PCR 扩增仪(Light-cycler 480, Roche 公司),紫外分光光度计(752 型,

上海),凝胶成像系统(Bio-rad Gel Doc XR,美国)。

2. PCR 产物的直接测序:DNA 样本经荧光定量 PCR 扩增后,直接将产物送北京诺赛生物技术有限公司进行双向测序,仪器(ABI 3730xI,美国)测序结果用 Chromas 软件进行分析。

3. PCR-RFLP 方法:①取 EDTA 抗凝全血样本 100 μ l,裂解红细胞和白细胞,37 $^{\circ}$ C 水浴 5min;②加入 35 μ l 预冷的蛋白沉淀液,高速振荡后 12000r/min 离心。将上清液全部移入装有 100 μ l-20 $^{\circ}$ C 预冷的异丙醇的离心管中,混匀后 12000r/min 离心 90s;③弃上清,加入 100 μ l 预冷的 75% 乙醇,离心后弃上清液,干燥 3min,加入保存液即为基因组 DNA;④PCR 反应体系:PCR 反应液 21.8 μ l, Taq 酶 0.2 μ l,混匀后按 22 μ l/管分装。分别加入阳性对照、阴性对照或样品 DNA 各 3 μ l。加矿物油 15 μ l;⑤PCR 扩增程序如下:94 $^{\circ}$ C 3min,94 $^{\circ}$ C 30s,65 $^{\circ}$ C 45s,72 $^{\circ}$ C 45s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 7min;⑥酶切反应:按每份检测取酶切缓冲液 4.7 μ l、限制性内切酶 0.3 μ l,加入 10 μ l PCR 产物。置于 37 $^{\circ}$ C 酶切 1h;⑦琼脂糖凝胶电泳鉴定基因型,凝胶成像系统观察电泳结果进行基因型分析。

4. 荧光定量 PCR:①PCR 反应体系:PCR 混合液 10 μ l、探针 0.5 μ l、染料 0.4 μ l, ddH₂O 5.1 μ l;②样本处理;③取 25 μ l 全血经沉淀裂解后振荡混匀;④加样:加入阴性对照、阳性对照、待检 DNA 样品各 4 μ l,混匀并短暂离心;⑤PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C 2min,95 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 1min,40 个循环,40 $^{\circ}$ C 冷却 15s;⑥基因多态性分析:靠近 X 轴的是 VIC 信号(430~530nm)(纯合子 CC),靠近 Y 轴的是 FAM 信号(530~780nm)(纯合子 TT),靠近对角线位置的样品既有 FAM 信号也有 VIC 信号(杂合子 C/T)。

5. 重复性和准确性试验:同一标本,进行批内精密密度试验,重复测定 20 次,取 C_p 值进行结果分析。批间精密密度,在 20 个工作日内重复测定同一标本 20 次,取 C_p 值进行统计学分析,计算批内和批间的 C_p 值的均值和变异系数来评价其精密密度。准确性是通过本法与测序结果相比较,PCR 扩增产物直接送测序。

6. 检测体系的线性范围:经测序结果确定的基因型 PCR 扩增产物经纯化后紫外分光光度计测定其浓度,经无菌水稀释成浓度梯度,经 PCR 扩增后取其 C_p 值与 DNA 浓度水平的对数绘制线性范围的曲线,拟合回归方程,计算相关系数。

7. 两种方法的比对试验:将 50 份样本同时用 PCR-RFLP 法和荧光定量 PCR 法进行基因分型,结果用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

8. 人群基因多态性检测:检测 671 份标本的 MTHFR 基因型,统计人群 3 种基因型的数量,计算不同性别人群不同基因型分布比例,初步分析人群 MTHFR 基因型在性别之间是否存在差异。

结 果

1. 重复性和准确性试验:批内精密密度经同一标本重复测定 20 次,得 C_p 值 24.48 ± 0.34 , CV% 为 1.38%。批间精密密度经 20 个工作日重复测定标本 20 次,得 C_p 值 24.35 ± 0.36 , CV% 为 1.48%。在 20 个工作日内重复测定 C_p 值变化不大。试剂多次冻融对 C_p 值影响小。20 个标本经测序确定基因型 100% 正确(图 1)。

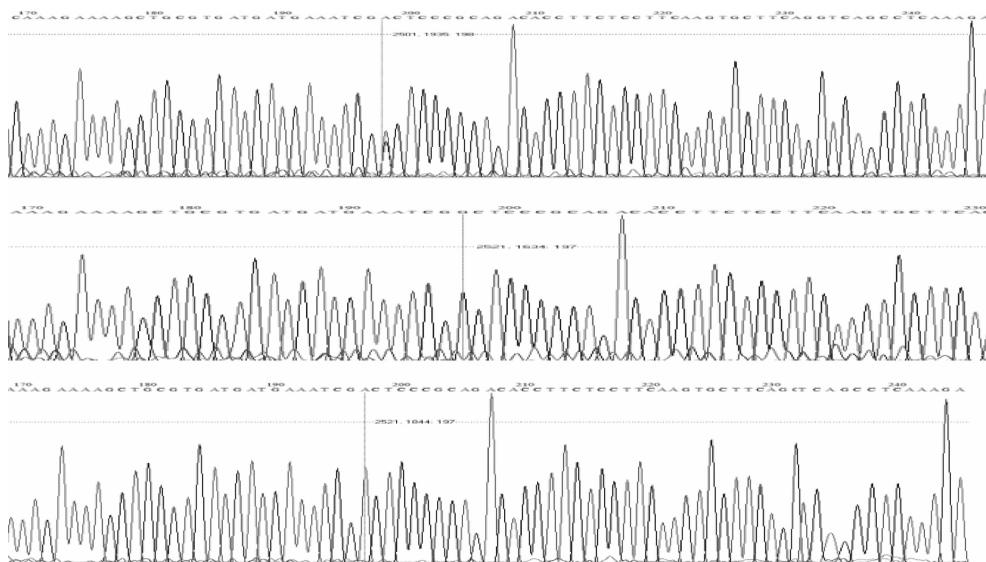


图 1 亚甲基四氢叶酸还原酶基因测序结果

上图为 C/T 型,中图为 CC 型,下图为 TT 型

2. 检测体系的线性范围(图 2):同一份样本经无菌水稀释后的浓度为 6.2×10^4 pg/ μ l,经荧光定量 PCR 检测后,结果显示在 $6.2 \times 10^2 \sim 6.2 \times 10^4$ pg/ μ l

浓度范围内具有良好的线性,回归方程为: $Y = -0.374X + 13.99$, $R^2 = 0.999$ 。

4. PCR-RFLP 方法(图 3):与 FQ-PCR 方法检

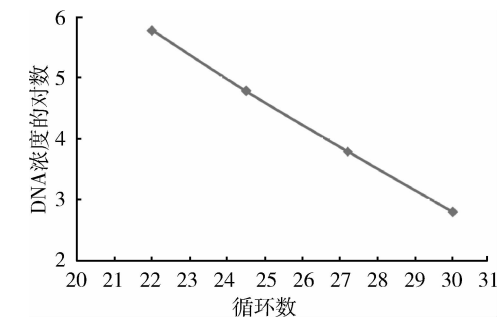


图 2 检测的线性范围

表 1 PCR-RFLP 法与 FQ-PCR 法检测 MTHFR 方法比对试验 [n(%)]

方法	基因型			等位基因		P
	CC	C/T	TT	C	T	
PCR-RFLP	15(30)	19(38)	16(32)	49(49)	51(51)	>0.05
FQ-PCR	15(30)	21(42)	14(28)	51(51)	49(49)	>0.05

表 2 人群 MTHFR 的基因多态性 [n(%)]

性别	基因型			等位基因	
	CC	CT	TT	C	T
男性	130(41.8)	96(30.9)	85(27.3)	356(57.2)	266(42.8)
女性	138(38.3)	116(32.2)	106(29.5)	392(54.4)	328(45.6)
总计	268(40.0)	212(31.6)	191(28.5)	748(55.7)	594(44.3)

群总体 CC、C/T、TT 频率为 40.0%、31.6%、28.5%，等位基因频率为 55.7% 和 44.3%。

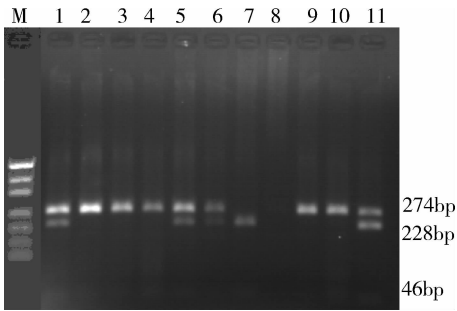


图 3 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性电泳图谱
M. 分子质量标准;1、5、6、11. C677 C/T 基因型;2、3、4、9、10. CC 基因型;7. TT 基因型

讨 论

人类亚甲基四氢叶酸还原酶自 1994 年被发现以来,多个研究表明该基因位点的突变与多种疾病关系密切,对于该基因的多态性研究已被广泛重视。MTHFR 基因 C677T 位点纯合子(TT 型)的突变直接影响亚甲基四氢叶酸还原酶的活性和酶的耐热性,而使叶酸代谢紊乱,使患者易患冠心病、缺血性脑血管病、深静脉血栓、甚至抑郁症、唇裂等疾病风险显著高

测 MTHFR C677T 基因型两种方法的比对(表 1),经 χ^2 检验, $P>0.05$,两种方法检测 C677 基因的突变没有统计学差异。
5. 人群基因分型结果(表 2):共检测 671 人,其中男性 311 人,女性 360 人,C677T 基因型 CC、C/T、TT 比例分别为 41.8%、30.9%、27.3% 和 38.3%、32.2%、29.5%,等位基因的比例分别为 57.2%、42.8% 和 54.4%,45.6%。经 χ^2 检验, $P>0.05$,性别之间基因型频率和等位基因频率没有统计学差异。人

于 MTHFR 基因野生型和杂合型,研究涉及多个学科、多种疾病,因此对该基因多态性的研究引起了广泛的关注^[1-5]。
目前检测该基因的方法有 PCR-RFLP 法、反向点杂交法、等位基因特异性聚合酶链反应和直接测序法,直接测序法是所有方法中的金标准,但由于费用昂贵,所以未广泛使用。PCR-RFLP 方法耗时长、操作复杂,不宜用于大规模的检测。本研究将实时荧光定量 PCR 方法用于 MTHFR C677T 基因多态性的检测,对该方法的精密度、准确性及线性范围进行了方法学评价。批内精密度、批间精密度高,试剂反复冻融,样本 4℃ 保存 20 天对检测影响不大。该方法与基因测序结果吻合,特异性达到 100%,线性范围可以达到 $6.2 \times 10^2 \text{ pg}/\mu\text{l}$,能够满足临床检测的需求。因 FQ-PCR 方法核酸提取简便、扩增时间短、无需产物的后处理、通量高等优势使这种方法可以替代测序法与 PCR-RFLP 方法进行亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性的研究,同时适应于临床大规模的检测需求。

对人群初步调查发现 MTHFR 基因 C677 位点基因多态性在性别之间没有统计学差异,这与部分学者的研究相同^[6,7]。人群总体 CC、C/T、TT 频率为

40.0%、31.6%、28.5%，等位基因频率为 55.7% 和 44.3%，对于 MTHFR 基因多态性的研究表明不同种族、不同地域人群的基因型频率和等位基因频率存在显著差异，本研究的结果与文献报道的结果有差异，所以对于不同人群的基因型频率及等位基因频率还有待大样本的人群调查^[8,9]。

参考文献

- 1 Kang SS, Wong PW, Susmano A, *et al.* Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase; an inherited risk factor for coronary artery disease [J]. *Am J Hum Genet*, 1991, 48(3): 536-545
- 2 黄一宁, 赵宇岚, 舜伟. 同型半胱氨酸和 MTHFR 基因多态性与缺血性脑血管病的关系[J]. *中华医学杂志*, 2002, 82: 119-122
- 3 Yilmaz H, isbir S, Agachan B, *et al.* C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene and serum homocysteine levels in Turkish patients with coronary artery disease[J]. *Cell Biochem Funct*, 2005, 24(1): 87-90
- 4 王苏梅, 王建华, 于建春, 等. 亲代 MTHFR 基因 677C/T 多态性与子代非综合征性唇腭裂的相关性[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2012, 29(4): 464-467
- 5 张艳丽, 鲁衍强, 李华锋, 等. 临沂市汉族女性 MTHFR 和 MTRR 基因多态性分布及其与同型半胱氨酸水平的相关性[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2012, 29(6): 705-708
- 6 王丽娜, 普雄明, 新疆维, 等. 汉族人群 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 多态性调查[J]. *中华皮肤科杂志*, 2012, 45(3): 178-180
- 7 凯丽比努尔·阿布都热合曼, 艾力曼·马合木提, 夏玉宁, 等. 维吾尔族亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性及血浆同型半胱氨酸水平与静脉血栓栓塞症的相关性[J]. *中华心血管病杂志*, 2012, 40(12): 1030-1036
- 8 Hanson NQ, Aras O, Yang F, *et al.* C677T and A1298 C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease[J]. *Clin Chem*, 2001, 47(4): 661-666
- 9 Zhang G, Dai C. Gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in Chinese patients with occlusive coronary artery or cerebral vascular disease[J]. *Thromb Res*, 2001, 104(3): 187-195

(收稿日期: 2013-07-26)

(修回日期: 2013-08-26)

全身麻醉复合硬膜外阻滞对上腹部手术患者术后清醒期的影响

魏兵华 李长科 徐明清

摘要 目的 探讨全身麻醉复合硬膜外阻滞对上腹部手术中血流动力学及术后清醒的影响。方法 择期上腹部手术 60 例, 根据抽签法随机分为全身麻醉(A)组和全身麻醉复合硬膜外阻滞(B)组。记录两组患者全身麻醉用药量、术中知晓、术后清醒时间、苏醒期躁动、血压、心率等情况。**结果** 两组患者仅 B 组存在可疑知晓 2 例, 均无一例肯定术中知晓。异丙酚、芬太尼用量及苏醒期躁动发生率, B 组明显少于 A 组($P < 0.05$); 术后清醒时间、拔管时间, B 组明显短于 A 组($P < 0.05$); 两组患者术后同时点收缩压、舒张压及心率比较, B 组低于 A 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 全身麻醉复合硬膜外阻滞应用于上腹部手术安全有效, 术中循环稳定, 减少全麻药的用量, 利于患者术后快速清醒, 值得临床推广。

关键词 硬膜外阻滞 全身麻醉 上腹部手术 术中知晓 苏醒期躁动

Effects of General Anesthesia Combined with Epidural Block on Postoperative Recovery Period in Patients Undergoing Upper Abdominal Operation. Wei Binghua, Li Changke, Xu Mingqing. Department of Anesthesiology, The Affiliated Yuebei People's Hospital of Shantou University Medical College, Guangdong 512026, China

Abstract Objective To study the effect of general anesthesia combined with epidural block on postoperative recovery period in patients undergoing upper abdominal operation. **Methods** Sixty patients were randomly divided into two groups. The observation group (group A) was received general anesthesia alone, and the control group (group B) was received general anesthesia combined with epidural block. The change of blood pressure and heart rate, anesthetic doses, emergence agitation, intraoperative awareness were observed in perioperative period. **Results** There was not intraoperative awareness in all of them. The doses of propofol and fentanyl, incidence rate of postoperative awake were obviously lower in group B compared with group A. The time of awake and extubation were apparently shorter in group

作者单位: 512026 韶关, 汕头大学医学院附属粤北人民医院麻醉科

通讯作者: 魏兵华, 电子信箱: weibb2003@163.com