

· 临床研究 ·

基于 *FOK1* 酶体系的 PCR 防污染法及在产前诊断中的应用

吴江平, 黄欢*, 瞿琳, 姚维银

南京医科大学第一附属医院产科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 建立一种有效、实际操作强的聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)防污染法并用于产前检测叶酸利用能力。方法: 在1条引物的5'端加入限制性内切酶 *FOK1* 的识别序列, 将 *FOK1* 酶加入 PCR 扩增反应体系中, 切断污染的前 PCR 产物, 考察体系中 *FOK1* 酶的用量、酶切扩增一体式反应体系成分的比例及污染量的可控程度, 并应用于亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)基因上 C677T 突变位点的分析。结果: *FOK1* 酶最佳反应体系却抑制 PCR 扩增; 在 TaKaRa 反应体系中, 0.5 U *FOK1* 酶可完全切割 $\leq 0.1 \mu\text{L}$ 含有酶切位点的前扩增产物, 且成功扩增, 而不加入 *FOK1* 酶无法控制假阳性结果。 *FOK1* 酶切防污染法成功用于 MTHFR C677T 的测序检测。结论: 本方法有效便捷, 完全实现了闭管防止 PCR 污染, 不影响后续测序反应, 不仅可适用于以 PCR 扩增为基础的产前诊断等测序分析, 更可广泛应用于所有涉及核酸扩增诊断的实验室防治 PCR 污染中。

[关键词] *FOK1* 酶; PCR 防污染; 叶酸代谢; MTHFR 基因; C677T

[中图分类号] R714.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)09-1336-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190915

Controlling carryover PCR contamination based on *FOK1* enzyme system and its application in prenatal diagnosis

Wu Jiangping, Huang Huan*, Qu Lin, Yao Weiyin

Obstetrics Department, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To establish an effective and practical method to solve the problem of polymerase chain reaction (PCR) contamination and used it for prenatal diagnosis of folic acid utilization capability. **Methods:** By adding recognition sequence of a restriction enzyme *FOK1* at the 5' end of one PCR primer, carryover PCR contamination was controlled by adding *FOK1* enzyme in PCR reaction mixture which contained the contamination from the last PCR products. Effects of the amount of *FOK1* enzymatic on amplification efficiency, components in PCR reaction mixture and the most amounts of contamination which can be controlled were investigated. A mutation of C677T in MTHFR gene was analyzed. **Results:** A best reaction system provided by *FOK1* enzyme specification inhibited PCR amplification. In TaKaRa reaction system, 0.5 U of *FOK1* enzyme could completely control the contamination of less than $0.1 \mu\text{L}$ of last amplification products and did not affect the amplification. Otherwise, false positive results were obtained by adding the contamination without *FOK1* enzyme. The developed method was successfully applied to the analysis of MTHFR C677T by sequencing. **Conclusion:** This method is effective and convenient. The reactions of enzyme digestion and amplification were completed in an unclosed tube. Subsequent sequencing reaction is not affected by the method. The method can not only be used in prenatal diagnosis based on PCR amplification, but also widely applied to control PCR amplification in all the fields involved in nucleic acid amplification.

[Key words] *FOK1* enzyme; PCR contamination control; folic acid metabolism; MTHFR gene; C677T

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(09): 1336-1340]

[基金项目] 国家自然科学基金应急管理项目(81741040); 江苏省青年医学人才(QNRC2016618); 第二届江苏省妇幼重点人才项目

*通信作者(Corresponding author), E-mail: huanghuan@njmu.edu.cn

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)反应具有强大的扩增效率,导致其具有易污染的缺点,极微量的污染便可导致假阳性结果。PCR反应中,主要存在以下污染源:来自其他测试样品的DNA,来自实验材料如重组克隆的DNA等。因为PCR产物拷贝量大(一般为 1×10^{10} 拷贝/ μL),远远高于PCR检测数个拷贝的极限,所以极微量的PCR产物污染,就可造成假阳性结果。同一靶序列前一次PCR的扩增产物,对后面PCR的污染是分子诊断使用PCR进行高灵敏度测试过程中最易出现的问题^[1],使得检测结果出现假阳性,而且一旦出现污染,消除污染源极其困难,往往需对整个实验室及实验器材进行彻底清洗处理。已报道了一些方法用于防止PCR污染^[2-4]。在这些方法中,尿嘧啶DNA糖基化酶(Uracil-DNA glycosylase, UNG)方法被广泛使用,这种方法使用dUTP扩增,在扩增前使用UNG处理可降解交叉污染的PCR产物,而不降解基因组DNA模板(不含dUTP),然后热灭活此酶,再进行扩增反应。但是由于在扩增中,用dUTP取代了dTTP,这种方法不适用于下游检测手段为测序的检测,如高通量测序或者一代测序反应。

因此发展了一种基于FOK1酶的新PCR防污染体系,FOK1是一种II S型限制性内切酶^[5]。在第1次PCR一条引物上加入II S型内切酶的特异性识别位点,因此扩增的PCR产物将都带有II S酶的识别位点。当第1次PCR产物带入下一次PCR反应体系中时,运用特异的II S内切酶在反应前处理反应体系,使得滞后污染被特异性切割,从而无法与引物结合进行扩增。同时,反应体系中的DNA模板并不受影响,因此达到防止PCR污染的目的。

叶酸摄入缺乏与新生儿出生缺陷相关,亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)是叶酸代谢中的关键性酶,一旦该酶的关键基因MTHFR基因上关键位点发生变异,会显著影响机体的叶酸利用能力,因此有必要对叶酸代谢能力进行遗传检测,补充合适剂量的叶酸。本研究将建立新的PCR防污染法,应用于产前诊断叶酸利用能力的遗传测序检测中。

1 材料和方法

1.1 材料

FOK1核酸内切酶和Taq DNA聚合酶(大连TaKaRa公司);血液基因组DNA提取系统(南京Tiangen公司);AxyPro™ PCR Cleanup Kit(杭州爱思进生

物技术有限公司);dNTP混合物(大连TaKaRa公司);琼脂糖(Biowest公司,美国,上海YITO公司分装);溴化乙锭(Promega公司,美国);试剂配制均使用灭菌去离子水,所有试剂均为分析纯。

台式高速冷冻离心机(21R型,Beckman公司,美国);高压电源(Power PAC1000, BIO-RAD公司,美国);凝胶电泳成像仪(GeneGenius, Syngene公司,英国);PCR扩增仪(PTC-225型, MJ Research公司,美国);微量基因光谱测定仪(Gene Spe III, NaKa Instrument公司,日本)。

引物由上海Invitrogen公司合成,并经PAGE纯化,纯度大于99%。引物设计用Primer Premier 5软件,叶酸代谢过程中MTHFR基因在NCBI上的参考序列编号为NG_013351.1,扩增正向引物5'-AGGATGTGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3',扩增反向引物5'-AGGACGGTGC GG TGAGAGTG-3',下划线标记处为人工加入的FOK1内切酶的识别序列(GGATG),扩增片段长度为204 bp。

1.2 方法

1.2.1 孕妇血浆的采集与DNA提取

抽取孕妇外周血2 mL入Na₂·EDTA抗凝管中,置于4℃待用,对收集的全血标本,每份取0.3 mL,用血液基因组DNA提取系统提取DNA,再以TE缓冲液溶解而得。实验用DNA模板均用One-drop分光光度仪测定其浓度及纯度,以TE缓冲液调整终浓度为20~100 ng/ μL 。本研究经医院伦理委员会批准,受试者均知情同意。

1.2.2 含FOK1酶切位点目标片段的制备

合成的扩增引物为干粉,使用前需离心。用双蒸水将引物稀释到10 $\mu\text{mol/L}$ 。扩增用试剂使用前先混匀再离心,加完酶后尽可能不要剧烈振荡。50 μL PCR体系成分:上述提取的DNA模板,dNTP混合物(0.2 mmol/L),正向引物和反向引物(各0.4 $\mu\text{mol/L}$), TaKaRa Taq DNA聚合酶(1.25 U), 1×PCR Buffer, MgCl₂ (1.5 mmol/L)。循环反应条件为:94℃变性3 min,然后热循环35次(94℃ 25 s, 60℃ 25 s, 72℃ 15 s),最后于72℃置7 min。PCR产物点样于2%的琼脂糖凝胶上电泳成像。

取1.5 mL国产离心管,用AxyPro™ PCR Cleanup Kit对产物进行纯化,按PCR产物体积的3倍加入试剂盒中的Buffer PCR-A,将PCR产物掺入装有Binding Buffer的柱吸附中,将混合液稍微震荡离心,将混合液移入吸附柱内,放置2 min,使混合液与膜充分接触,12 000 g离心1 min,并弃去接液管内液

体。向吸附柱内加入700 μL Buffer W2, 12 000 g 离心1 min, 弃去接液管内液体。再加入400 μL Buffer W2, 12 000 g 离心1 min, 弃去接液管内液体。然后将吸附柱转移到无菌1.5 mL离心管中, 放置2 min, 向吸附柱内加40 μL 去离子水, 并于室温静置1 min。12 000 r/min 离心1 min, 1.5 mL离心管内溶液中含有纯化的目的DNA片段, 用One-drop分光光度仪测定其浓度, 备用。

1.2.3 酶切扩增一管式反应

两种50 μL PCR体系成分: ①TaKaRa反应体系: 含 *FOK1* 酶切位点的DNA纯化产物, dNTP混合物(0.2 mmol/L), 正向引物和反向引物(0.4 $\mu\text{mol/L}$), TaKaRa *Taq* DNA聚合酶(1.25 U), Tris-HCl(10 mmol/L, pH 8.3), MgCl_2 (1.5 mmol/L), KCl(50 mmol/L), 0.5 U的 *FOK1* 内切酶和0.01% BSA; ② *FOK1* 酶反应体系: 含 *FOK1* 酶切位点的DNA纯化产物, dNTP混合物(0.2 mmol/L), 正向引物和反向引物(0.4 $\mu\text{mol/L}$), TaKaRa *Taq* DNA聚合酶(1.25 U), Tris-HCl(10 mmol/L, pH 7.5), MgCl_2 (1.0 mmol/L), DTT(10 mmol/L), NaCl(50 mmol/L), 适量的 *FOK1* 内切酶和0.01% BSA。

1.2.4 电泳和测序分析

2%琼脂糖电泳后凝胶成像仪检测: 选取合适凝胶, 检查上样孔是否漏或者有气泡, 将凝胶放入电泳槽的架子上, 用加样枪将上样孔中的气泡赶出。将样品与上样缓冲液以1:1混合均匀, 点入上样孔。打开电泳仪电源, 设置“150 V 5 min”。拍照, 保存实验结果。单一条带样本外送Sanger测序(南京锐真生物技术有限公司), 判定位点是否发生突变。

2 结果

2.1 PCR污染产物的量对 *FOK1* 酶切效率的影响

为了评价 *FOK1* 酶防污染体系, 在TaKaRa反应体系中加入污染片段, 即由含有酶切位点的引物扩增出的不同量(1、0.1、0.01、0.001 μL)的PCR片段, 考察 *FOK1* 酶防污染体系的有效性(图1)。加入1 μL 含有酶切位点的扩增产物, *FOK1* 酶无法实现完全酶切, 出现了假阳性信号(泳道4), 但当加入 \leq 0.1 μL 含有酶切位点的扩增产物, *FOK1* 酶可以实现完全切割, 假阳性消失(泳道1~3), 不加入含酶切位点的污染片段而加入原始不含酶切位点的模板时, 扩增可以正常进行, 扩增产物出现(泳道5)。泳道4和5亮度差异不大, 可以认为 *FOK1* 酶的加入对整个PCR扩增体系影响不显著。另外, 进行了在

1~5泳道相同条件下不加入 *FOK1* 的对照实验(泳道11~15)。

2.2 不同反应体系对酶切扩增效率的影响

在TaKaRa反应体系, *FOK1* 酶可以完全去除 \leq 0.1 μL PCR扩增产物的污染, 但是 *FOK1* 酶说明书中提示该酶的最佳反应体系却与TaKaRa反应体系成分不同, 为了使 *FOK1* 酶达到最佳酶切活性, 同时考察了 *FOK1* 酶最佳反应体系(图1), 泳道6~10无扩增, 说明了该体系虽然可以保证 *FOK1* 酶最佳的酶切效率, 但对PCR扩增有抑制, 导致扩增失败, 不适合建立酶切防污染法。



TaKaRa反应体系中加入 *FOK1* 酶切0.001 μL (泳道1)、0.01 μL (泳道2)、0.1 μL (泳道3)、1 μL (泳道4)含有酶切位点的扩增产物, 及不含酶切位点的模板(泳道5); *FOK1* 酶反应体系中加入 *FOK1* 酶切0.001 μL (泳道6)、0.01 μL (泳道7)、0.1 μL (泳道8)、1 μL (泳道9)含有酶切位点的扩增产物, 及不含酶切位点的模板(泳道10); TaKaRa反应体系不加 *FOK1* 酶扩增0.001 μL (泳道11)、0.01 μL (泳道12)、0.1 μL (泳道13)、1 μL (泳道14)含有酶切位点的扩增产物, 及不含酶切位点的模板(泳道15)。

图1 *FOK1* 酶切效率考察

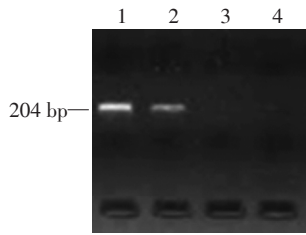
Figure 1 Investigation of *FOK1* digestion efficiency

2.3 *FOK1* 加入量对酶切效果的影响

在 *FOK1* 加入量的考察中, 人工加入了0.01 μL PCR产物作为污染(图2), 当 *FOK1* 酶的加入量 $<$ 0.5 U(泳道1和2)时, 假阳性信号出现, 而 \geq 0.5 U(泳道3和4)时, 无假阳性信号, 说明0.5 U的 *FOK1* 酶足够消除诊断实验室PCR分析中传统的PCR污染(一般小于0.01 μL)。 *FOK1* 酶防污染体系可用于各种以PCR扩增为工具的分子诊断技术中。

2.4 *FOK1* 酶切防污染法在产前诊断叶酸利用能力中的应用

在孕期, 由于特殊的生理需要, 孕妇对叶酸的需求量会迅速增加。世界范围内的健康机构都在建议孕妇在均衡饮食的同时额外补充适量叶酸, 特别是在孕前和孕期前3个月, 但是补充叶酸的量多和少都不适宜, 因此可通过基因检测叶酸代谢通路的关键酶——MTHFR酶的基因多态性情况来确定叶酸补充的合适剂量。大量研究证实孕妇MTHFR C677T是否突变对叶酸摄入量的需求不同, 也是开

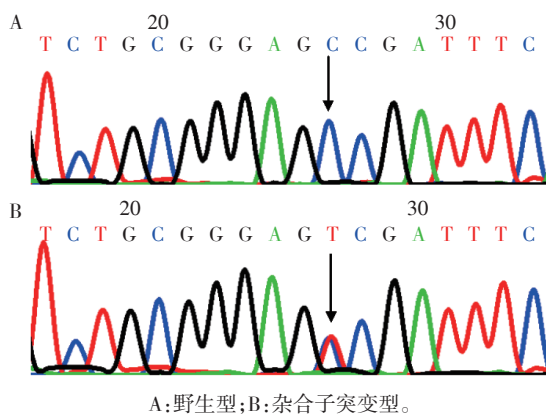


FOK1 的加入量分别为 0.125 U(泳道 1)、0.25 U(泳道 2)、0.5 U(泳道 3)、1 U(泳道 4)。

图2 *FOK1* 的加入量对酶切效果的影响

Figure 2 The effect of adding amounts of *FOK1* on digestion efficiency

放性神经管缺陷患儿的遗传风险因素^[6]。因此本法用于该突变位点的检测,扩增产物测序结果清晰显示野生型 CC 及杂合子突变型 CT 的测序结果(图 3),说明该方法具有实用性,不影响测序的准确性。



A:野生型;B:杂合子突变型。

图3 *FOK1* 酶切防污染法用于 MTHFR C677T 检测的 Sanger 测序结果

Figure 3 Sanger sequencing results of samples on site of MTHFR C677T by using *FOK1* digestion to prevent PCR contamination

3 讨论

PCR 技术是一种用于放大扩增特定 DNA 片段的分子生物学技术,其最大特点是能将微量 DNA 大幅增加^[7]。因此,在涉及核酸检测的各领域中都得到了广泛应用,影响深远^[8-11]。在 PCR 扩增中,其优势是灵敏度高,对微量核酸进行扩增放大,但这样的高灵敏度和放大能力,使得一旦放大的核酸即使污染了很小量(如产生气溶胶等),也会使下一次的 PCR 出现假阳性。因此,防止 PCR 污染一直是研究人员致力解决的关键问题^[12-13]。本研究提出了防止 PCR 污染的新策略,即使用限制性内切酶 *FOK1* 和含有酶切位点序列的 PCR 引物。与其他 II 型限制性内切酶一样,*FOK1* 具有相似的辅因子要求,但识

别位点是非对称也是非间断的,识别位点的长度为 5 bp(图 4),切割位点在识别位点一侧 9~13 bp 范围内。一般认为这些酶主要以单体形式结合到 DNA 上,但与邻近酶结合成二聚体,协同切开 DNA 链。在 PCR 中,真正的扩增模板不含有酶切位点,而含有酶切位点的引物扩增出的 PCR 片段含有,因此在扩增前加入 *FOK1* 酶可在闭合的 PCR 管中选择性地切割污染片段。由于 *FOK1* 酶在 PCR 扩增前可以高温灭活,因此它不影响正常扩增,也不会切割扩增出的模板,无需经过开管处理。结果显示,PCR 扩增的污染能够通过 *FOK1* 酶体系被有效控制,而 *FOK1* 酶不会影响真正的 PCR 扩增。运用 0.5 U 的 *FOK1* 酶即可对 0.1 μ L PCR 扩增产物的污染进行有效防控。即使无法完全去除 1 μ L PCR 扩增产物的污染,也不会影响该方法的应用,因为一般实验室的 PCR 污染程度也不会达到该程度。

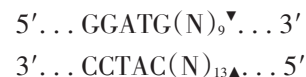


图4 *FOK1* 酶的识别位点

Figure 4 Recognition sites of *FOK1* enzyme

大量科学研究表明,叶酸摄入绝对或相对缺乏,是引起高同型半胱氨酸血症的直接原因^[14]。高同型半胱氨酸血症对婴儿造成危害,如新生儿出生缺陷,包括神经管缺陷、唐氏综合症、先天性心脏病、唇腭裂等,对孕妇健康也有影响,如妊娠期高血压、早产、自发性流产等。如果叶酸代谢通路中的酶发生缺陷或缺失,将导致通路阻塞,使血液中的同型半胱氨酸浓度增加,对血管壁产生损伤。MTHFR 酶作为叶酸代谢中的关键性酶,该酶可介导同型半胱氨酸的清除,催化产生 5-甲基四氢叶酸,参与甲基传递及核苷酸合成通路,一旦该酶的关键基因 MTHFR 基因上关键位点发生变异,如 C677T^[6,15-16],MTHFR 酶活性降低,将使不耐热型 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶比例增加,会显著影响机体的叶酸利用能力,同型半胱氨酸在体内积累,进而引起孕妇发病风险和婴儿出生缺陷^[17]。叶酸过少有害,但补充过多也有危害,摄入叶酸过多能导致出现老年痴呆,孕妇过量服用叶酸增加患乳腺癌的概率,大剂量服用叶酸可降低血清中维生素 B12 的含量^[18]。应个性化补充叶酸,即让补充叶酸更具有针对性。根据自己的遗传体质,即进行遗传检测,在正确的时间补充合适剂量的叶酸。本研究为该检测提供了一种可以防控 PCR 污染的方法,在保证测序准确

性的基础上,使得检测更便捷,实验的可控性更强。

基于 *FOK1* 酶体系的 PCR 防污染法克服了 UNG 技术引入 dUTP 取代 dTTP 影响了测序准确性的缺陷,是一种新的闭管防止 PCR 污染的方法,可适用于以 PCR 扩增为基础的诊断筛选分析和测序分析,除了可用于产前诊断领域,更可广泛地应用于诊断实验室的防治 PCR 污染中。

[参考文献]

- [1] Cimino GD, Metchette K, Isaacs ST, et al. More false-positive problems[J]. *Nature*, 1990, 345(6278): 773-774
- [2] Borst A, Box AT, Fluit AC. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2004, 23(4): 289-299
- [3] Niederhauser C, Hofelein C, Wegmuller B, et al. Reliability of PCR decontamination systems[J]. *PCR Methods Appl*, 1994, 4(2): 117-123
- [4] Walder RY, Hayes JR, Walder JA. Use of PCR primers containing a 3'-terminal ribose residue to prevent cross-contamination of amplified sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(18): 4339-4343
- [5] Bitinaite J, Wah D, Aggarwal AK, et al. FokI dimerization is required for DNA cleavage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(18): 10570-10575
- [6] Rai V. Association of C677T polymorphism (rs1801133) in MTHFR gene with depression [J]. *Cell Mol Biol*, 2017, 63(6): 60-67
- [7] Moore PP. Replicating success [J]. *Nature*, 2005, 435(7039): 235-238
- [8] Ottesen EA, Hong JW, Quake SR, et al. Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria[J]. *Science*, 2006, 314(5804): 1464-1467
- [9] Tadmor AD, Ottesen EA, Leadbetter JR. Probing individual environmental bacteria for viruses by using microfluidic digital PCR[J]. *Science*, 2011, 333(638): 58-62
- [10] How Kit A, Mazaleyrat N, Daunay A, et al. Sensitive detection of KRAS mutations using enhanced-ice-COLD-PCR mutation enrichment and direct sequence identification[J]. *Hum Mutat*, 2013, 34(11): 1568-1580
- [11] Abou Tayoun AN, Mason-Suares H, Frisella AL, et al. Targeted droplet-digital PCR as a tool for novel deletion discovery at the *DFNB1* locus[J]. *Hum Mutat*, 2016, 37(1): 119-126
- [12] Czurda S, Smelik S, Preuner-Stix S, et al. Occurrence of fungal DNA contamination in PCR reagents: approaches to control and decontamination[J]. *Mycoses*, 2015, 58(4, SI): 98
- [13] Kim HJ, Kwon SR. Development of a rapid method for identifying carryover contamination of positive control DNA, using a chimeric positive control and restriction enzyme for the diagnosis of white spot syndrome virus by nested PCR[J]. *Indian J Microbiol*, 2014, 54(4): 439-443
- [14] Baszczuk A, Thielemann A, Muslalik KA, et al. The impact of supplementation with folic acid on homocysteine concentration and selected lipoprotein parameters in patients with primary hypertension [J]. *J Nutr Sci Vitaminol(Tokyo)*, 2017, 63(2): 96-103
- [15] Shahrokhi SZ, Kazerouni F, Ghaffari FA, et al. The relationship between the MTHFR C677T genotypes to serum anti-mullerian hormone concentrations and *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection outcome [J]. *Clin Lab*, 2017, 63(5/6): 927-934
- [16] Wu H, Zhu P, Geng XY, et al. Genetic polymorphism of MTHFR C677T with preterm birth and low birth weight susceptibility: a meta-analysis [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2017, 295(5): 1105-1118
- [17] Chmurzynska A, Malinowska AM, Twardowska-Rajewska J, et al. Elderly women: homocysteine reduction by short-term folic acid supplementation resulting in increased glucose concentrations and affecting lipid metabolism (C677T MTHFR polymorphism) [J]. *Nutrition*, 2013, 29(6): 841-844
- [18] Aarabi M, Gabriel MC, Chan D, et al. High-dose folic acid supplementation alters the human sperm methylome and is influenced by the MTHFR C677T polymorphism [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(22): 6301-6313

[收稿日期] 2018-04-05