

网络资源与工具在基因多态检测中的应用

焦洁¹, 王威^{1,2}, 刘静¹, 夏昭林^{1*}

(1 复旦大学公共卫生学院劳动卫生教研室 公共卫生安全教育部重点实验室, 上海 200032 2 郑州大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 河南 郑州 450001)

随着人类基因组计划 (human genome project HGP)^[1]、环境基因组计划 (environmental genome project EGP)^[2]和国际单体型图计划 (the international HapMap project HapMap)^[3,4]的相继开展, 人类对于基因与疾病的研究进入了新的阶段。各种组织机构和生物公司开发的网络资源和工具也日渐发展和完善, 基因多态的检测研究将会获得更快的发展^[5]。本研究旨在利用网络资源与工具并应用聚合酶链反应-限制性酶切片段多态性 (Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism PCR-RFLP) 技术对 ALDH2 基因多态性进行检测研究, 具体展示网络资源与工具在基因多态检测中的应用。

1 材料与方法

1.1 引物设计与内切酶选择

1.1.1 基因序列和 SNP 信息查询 在 NCBI 网站查找 ALDH2 基因及其 SNP 信息 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), 结合有关文献确定 ALDH2 多态位点碱基变异信息。

1.1.2 多态位点相关内切酶信息查询 查询多态位点附近基因序列的酶切位点 (<http://tools.lmcm/NEBcutter2/index.php>) 和相关内切酶信息 (<http://www.neb-china.com>)。

1.1.3 引物设计与验证 运用 Primer3 进行引物设计 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/Primer3/Primer3-www.cgi>) 并进行引物验证 (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcrCommand.html>)。

1.2 实验室验证

实验室 PCR 扩增及酶切鉴定采用常规的 PCR-RFLP 技术^[6], 其中限制性内切酶 TspRI 购自 NEB 公司。酶切鉴定后随机各取 1 例 ALDH2 野生型、杂合型和突变型 PCR 产物进行测序鉴定。

2 结果

2.1 序列搜索与多态位点确定

查找 NCBI 的 SNP 数据库, 获取 ALDH2 基因全序列及多态位点信息, 确定拟研究多态位点。根据网页提供信息和有关文献可确定 ALDH2 多态位点为 A/G 多态 (rs71), 位于第 12 染色体 第 12 外显子, 基因组位置 37421。

2.2 酶切位点及内切酶查询结果

酶切位点为 CACTG 其中 G 为多态位点 (见图 1), 该多态位点可被 AfeI MspI 和 TspRI 切开, 还有以往文献中用过的内切酶 MspI^[7] (其价格见表 1)。依据内切酶价格选用 TspRI 进行酶切。

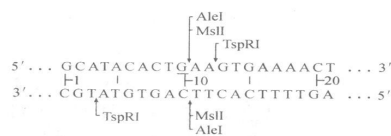


图 1 ALDH2 酶切位点及内切酶

表 1 NEB 公司几种内切酶识别序列及其价格

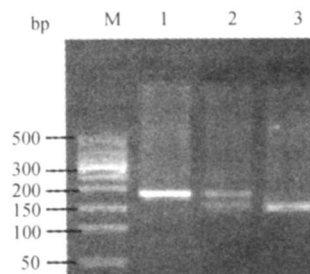
内切酶	识别序列	价格
TspRI	5'... NNCASTGNN... 3'	709 元 / 1000 U
MspI	5'... GAAGA(N) ₈ ... 3'	2789 元 / 1250 U
AfeI	5'... CACNN'NGTG... 3'	2929 元 / 1000 U
MspI	5'... CAP'NN'NNP'GTG... 3'	3179 元 / 1000 U

2.3 引物设计与引物验证结果

利用 Primer3 在线设计的引物结果如下: 上游引物 P₁ 5' AACCCATAACCCCAAGAGT₃, 下游引物 P₂ 5' CAGGTC-CCACACTCACAGTT₃, 引物验证表明该对引物扩增序列与预期结果一致。

2.4 PCR 扩增、酶切及测序鉴定结果

2.4.1 基因型的判断 ALDH2 位点扩增后出现 180 bp 片段, 经 TspRI 酶切后可出现 155 bp 和 25 bp 两种片段 (其中 25 bp 电泳图中不能看到)。酶切后基因型判断: 野生型 GG 为 155 bp 杂合型 GA 有 180 bp 和 155 bp 两种片段, 突变型 AA 为 180 bp 酶切图谱见图 2。



M: DNA ladder; Lane 1: AA; Lane 2: GA; Lane 3: GG

图 2 ALDH2 基因 37421 位点 PCR 产物经 TspRI 酶切后电泳图谱

2.4.2 ALDH2 基因多态结果鉴定 检测结果发现 ALDH2 出现野生型、杂合型和突变型 3 种基因型。ALDH2 野生型、杂

收稿日期: 2008-04-23

基金项目: 国家自然科学基金 (30671740)、十一五支撑计划 (2006BAK05B01-02)、复旦大学研究生创新基金、复旦大学科创行动资助

作者简介: 焦洁 (1980-), 女, 博士研究生, 研究方向: 职业卫生与分子毒理。E-mail: jiaojie66@126.com

* 通讯作者。

合型和突变型 PCR产物随机各取 1例进行测序鉴定, 测序结果见图 3 其中 AA GA GG 3种基因型测序图谱按对应位置上下依次排列, 并将 AA型测序图所对应的碱基序列显示在第一行。测序图中每个峰代表一个碱基, 不同的碱基类型用 A T C G表示。其中 A对应多态碱基所在位置, 结果 AA型测序显示多态位点为 A GG型显示为 G GA型显示为双峰, 即 GA杂合子。测序结果与预期结果完全一致。

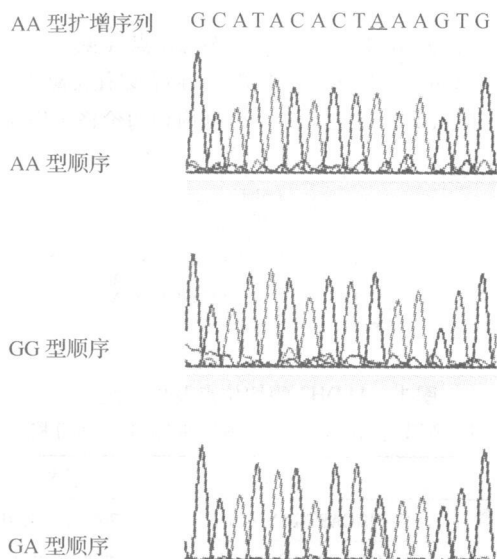


图 3 ALDH2基因 3种多态测序图

2.5 ALDH2基因多态分布与 Hardy-Weinberg遗传平衡检验

检测 207名上海市某企业职工 ALDH2 基因多态性, 其中 ALDH2野生型 89例 (43.0%), 杂合型 97例 (占 46.9%), 突变型 21例 (占 10.1%)。该基因多态分布经 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验, 达到遗传平衡 ($P > 0.05$)。

3 讨论

乙醛脱氢酶 2 (ALDH2) 是体内参与乙醇代谢的主要酶^[8], 其由 ALDH2基因编码。该基因^[9]位于 12q24 由 13个外显子构成, 编码的酶蛋白肽链由 500个氨基酸残基组成。ALDH2基因型与饮酒者对乙醇的敏感性、耐受性、酒后反应、饮酒行为以及引发疾病密切相关。

目前 ALDH2多态检测方法主要包括聚合酶链式反应 限制性片段长度多态性技术 (PCR-RFLP)^[10]、等位基因特异 PCR 技术 (AS-PCR)^[11]、TaqMan 技术^[12]和对抗两对引物 PCR 技术 (PCR-CTPP)^[13]等, 以上方法各具不同的优缺点。

本研究建立的 ALDH2位点多态的检测方法, 充分利用了网络资源与工具进行基因序列及多态位点、序列酶切位点及内切酶信息的查询, 并利用 Primer 3进行引物设计及引物验证; 结果 PCR产物纯度较高, 酶切结果易于分辨。该检测方法已通过测序验证, 其结果准确可靠, 人群检测结果与相关研究中多态频率相似^[12-14]。ALDH2基因不仅在乙醇代谢中起

重要作用, 而且也参与氯乙烯、丁二烯等化学物质的代谢^[15-16], 该研究利用网络资源与工具建立的多态检测方法将推动有关研究的开展。

参考文献:

- [1] 夏昭林. 人类基因组计划及其进展简介 [J]. 劳动医学, 2001 18 (5): 308-309
- [2] 万俊香, 任雪峰, 夏昭林. 美国环境基因组计划介绍 [J]. 劳动医学, 2001, 18 (4): 252-253
- [3] The International HapMap Consortium. The International HapMap Project [J]. Nature, 2003 426 (6968): 789-796
- [4] The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome [J]. Nature, 2005 437 (7063): 1299-1320
- [5] 张忠彬, 陆华, 夏昭林. 常用单核苷酸多态性数据库简介 [J]. 职业卫生与应急救援, 2004 22 (2): 106-108
- [6] 王威, 缪文彬, 仇玉兰, 等. 双创造酶切位点聚合酶链反应 限制性片段长度多态性检测 MGMT基因多态性的应用 [J]. 卫生研究, 2008 37 (1): 4-7
- [7] 丁建华, 吴建中, 高长明, 等. 乙醛脱氢酶 2基因多态性和饮酒习惯与肝癌的易感性 [J]. 肿瘤, 2004 24 (4): 309-312
- [8] 宁阳根, 谢勇, 孙明, 等. ALDH2基因对酒精性心脏病影响的评价 [J]. 中国现代医学杂志, 2005 15 (18): 2776-2779
- [9] 李志祥, 谢桂岚. ALDH2基因第 12外显子 (G/A) 多态性在北京汉族人群的检测 [J]. 中国现代医学杂志, 2005 15 (3): 457-458
- [10] Saijo K, Yokoyama T, Yoshiike N, et al. Do the ethanol-metabolizing enzymes modify the relationship between alcohol consumption and blood pressure? [J]. Journal of Hypertension, 2003 21 (6): 1097-1105
- [11] 曹西蓉, 吴德生. AS-PCR在 ADH2 ALDH2基因多态型分析中的应用 [J]. 环境与职业医学, 2004 21 (5): 371-373
- [12] Hiraki A, Matsuo K, Wakai K, et al. Gene-gene and gene-environment interactions between alcohol drinking habit and polymorphisms in alcohol-metabolizing enzyme genes and the risk of head and neck cancer in Japan [J]. Cancer Science, 2007 98 (7): 1087-1091
- [13] Tanakaoshi A, Hamajima N, Kawase H, et al. Duplex polymerase chain reaction with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) for genotyping alcohol dehydrogenase beta subunit (ADH2) and aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) [J]. Alcohol & Alcoholism, 2003 38 (5): 407-410
- [14] 张竹梅, 刘茶珍, 边建超, 等. 洛阳市汉族群体 ADH2和 ALDH2的基因多态性研究 [J]. 遗传, 2002 24 (5): 532-536
- [15] ZHU S, WANG A, XIA Z. Evaluation in vinyl chloride monomer exposed workers and the relationship between liver lesions and gene polymorphisms of metabolic enzymes [J]. World Journal of Gastroenterology, 2005 11 (37): 5821-5827
- [16] Alberini R J, Sran R J, Vacek P M, et al. Biomarkers for assessing occupational exposures to 1,3-butadiene [J]. Chemical Biological Interactions, 2001 135-136: 429-453