

同时检测多种心血管疾病相关基因多态性的方法

夏永静, 满 永, 国汉邦, 李红霞, 杨振华¹

(卫生部北京医院老年医学研究所; 1. 卫生部临床检验中心, 北京市 100730)

[主题词] 心血管疾病; 基因; 多态性; 多位点基因型分析方法

[摘要] 应用 Roche 分子系统提供的试剂、材料和实验操作步骤, 介绍其建立的一种同时检测多种心血管疾病相关基因的多个位点基因型分析方法, 并且比较所检测的不同中国地区(北京和香港)的中国人之间和中国人与法国人群之间的各等位基因频率的差异。结果发现, 北京人群和香港人群在所有检测的等位基因频率方面没有显著差别, 但是中国人和法国人在一些等位基因频率分布方面存在显著差异。总之, Roche 分子系统建立的是一种快速而有效的分析多基因多位点基因型的方法, 有益于大规模的人群调查心血管疾病的遗传危险因素。

[中图分类号] R446.1

[文献标识码] A

A Multilocus Genotyping Assay for Candidate Genotypes of Cardiovascular Disease

XIA Yong-Jing, MAN Yong, GUO Han-Bang, LI Hong-Xia, and YANG Zhen-Hua

(Beijing Hospital and Beijing Institute of Geriatrics; Center of National Clinical Chemistry, Ministry of Health, Beijing 100730, China)

[MeSH] Cardiovascular Disease; Genes; Polymorphism; Multilocus Genotyping Assay

[ABSTRACT] **Aim** To introduce a multilocus genotyping assay for candidate genotypes of cardiovascular disease (CVD) established by Roche Molecular Systems (RMS). **Methods** By applying the reagents, materials and the protocol provided by RMS, genotyping was done for the Chinese from different regions (Beijing and Hong Kong) and a French population. **Results**

By comparing the allelic frequencies between the Chinese from different regions and between the Chinese and the French populations, no significant difference was found for each allelic frequency between the two Chinese groups, but some allelic frequencies significantly differed between the Chinese and the French populations. **Conclusions** This multilocus genotyping assay established by RMS is a rapid, convenient and efficient method in determining the genotypes possibly related to the development of CVD in a large scale population study for the genetic risk of CVD.

心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)是发达国家疾病患者死亡的主要原因,是多基因相关的疾病,因此有必要建立一种快速、方便、有效的同时检测多个CVD候选基因多位点基因型的分析方法,以便简化大规模人群CVD遗传危险因素的调查。美国Roche分子系统(roche molecular systems, RMS)研究组在建立这样一种方法的探索中取得了一些成绩^[1,2],建立了一种同时检测15种可能的CVD相关基因29个位点的基因型检测方法,并且向许多国家的大规模人群CVD危险因素调查项目提供了该方法所需要的试剂、材料和检测操作步骤。Cheng等^[2]对这些候选基因及其所检测的基因型的已知生理作用做了概括^①。这些目的基因是按其生物功能进行的分类,野生型或频率高的等位基因被列在突变核苷酸或编码子数字位置的左侧,这样变异体就在右

侧。值得一提的是,国际间的合作使我们有幸利用这种方法检测和比较来自不同地区的中国人(北京和香港)和法国南锡地区的法国人群在这些候选基因多位点等位基因的频率分布和差异。

1 材料与方法

1.1 研究对象

研究对象DNA有3个来源:北京医院老年医学研究所生物化学室收集的健康体检人群DNA标本;香港中文大学附属医院提供的健康人DNA标本;法国南锡Stanislas研究计划收集的健康人DNA标本。这些研究对象均为65岁以上的健康老人。

1.2 RMS建立的同时检测多个心血管疾病候选基因多位点基因型方法

1.2.1 原理 应用PCR首先扩增每个DNA样本多种目的基因含有要研究的突变位点的基因序列。PCR所用引物事先用生物素标记。PCR后每个样本的PCR产物被变性,再通过一个检测反应实验,与包被在硝酸纤维素膜上的多种特异性目的基因的寡核苷酸探针杂交。通过观察和识别杂交带来确定该

[收稿日期] 2001-12-03 [修回日期] 2002-04-22

[作者简介] 夏永静,女,1967年出生,辽宁沈阳人,博士,副研究员,主要从事专业基因多态性与血管性疾病发生关系的研究。

①编者注:作者对RMS方法检测的目的基因及其表达产物的功能列表作了详细介绍,因版面有限出版时已删去,若有需要者,可直接与第一作者联系。

样本在各个特定位点上的基因型。

1.2.2 生物素标记目的基因的引物合成 此 PCR 体系按应用不同的引物混合物被分为 2 组。一组引物包括那些检测 PCR 产物时能与 A 条(strip A)上固定的寡核苷酸探针杂交的目的基因引物,共 14 对。另一组引物包括那些检测 PCR 产物时能与 B 条(strip B)上固定的寡核苷酸探针杂交的目的基因引物,共 13 对。

1.2.3 Strip A 和 Strip B 上的寡核苷酸探针合成及固定 在硝酸纤维素膜上固定对应各 PCR 产物的各个目的基因的寡核苷酸探针。Strip A 包括在 PCR A 反应中可以扩增出的以下基因的寡核苷酸探针。它们是一些与脂代谢有关的蛋白质基因:载脂蛋白 E、B 和 C (④对氧邻酶(paraoxonase, PON)、胆固醇酯转移蛋白(cholesteryl ester transfer protein, CETP)和脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)。这些寡核苷酸探针用于杂交以下多态性或点突变位点:载脂蛋白 E (ε2, ε3, ε4)、载脂蛋白 B (Thr71Ile 和 Arg3500Gln)、载脂蛋白 C (④T-625del、C-482T、T-455C、C1100T、C3175G 和 T3206G)、CETP(Ile405Val 和 Asp442Gly)、LPL (T-93G、T-39C、Asp9Asn、Asn291Ser 和 Ser447Term) 和 PON(Gln192Arg)。

Strip B 包括在 PCR B 反应中可以扩增出的以下特异目的基因的寡核苷酸探针,它们是:肾素血管紧张素系统的重要组分基因:血管紧张素转换酶基因(angiotensin converting enzyme, ACE)的插入/缺失(Insertion/Deletion, I/D)多态性,血管紧张素受体基因(angiotensin receptor, AT₁R) A1166C 突变,血管紧张素(angiotensin, AGT)基因 Met235Thr 突变;④与同型半胱氨酸代谢(homocysteine metabolism)有关的酶基因:胱硫醚-β合成酶(cystathionine β synthase, CBS) Ile278Thr 和 Gly307Ser 与甲烯四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) C677T 突变;④与血栓形成相关的基因突变:血栓形成因子 V(Factor V) Arg506Gln 突变、纤维蛋白原 β 链(fibrinogen β) G-455A 突变、糖蛋白(GP ④) Leu33Pro 突变和白细胞内皮粘附因子(endothelial leukocyte adhesion molecule-1-ELAM) G98T、Ser128Arg 和 Leu554Phe 突变。

1.2.4 目的基因的 PCR 扩增 每个 DNA 样本根据所用的 A 或 B 引物组分别进行 2 个体系的 PCR 扩增,反应条件相同。PCR 扩增条件为:94℃ 预变性 12.5 min,之后以 96℃ 15 s、60℃ 1 min、72℃ 1.25 min 进行 33 次循环。最后以 68℃ 5 min 结束扩增。

1.2.5 基因型检测反应 预处理 PCR 产物和检测用条(Strip A, Strip B):以 RMS 提供的母液(SSPE 和 SDS)配制洗液和杂交液,以洗液在 52℃ 条件下洗 Strip A 和 Strip B 10 min,分别取 15~20 μL PCR 产物,用 NaOH 变性液进行变性处理。④杂交:在盛有 Strip A 或 Strip B 的槽中分别加入杂交液和被变性的 PCR 产物。在 52℃ 的条件下杂交 20 min。用洗液室温下洗条,在新的杂交液中加入 12 μL 辣根过氧化物酶,使之与杂交条上的携带生物素标记的 PCR 片段偶合。用洗液于室温下洗条后,严格控制温度和时间(52℃ 12 min)再次洗条后,室温下以 50 mmol/L 的枸橼酸钠处理条 5 min。④显色反应:以 4:1 的体积比配制过氧化氢和四甲基联苯胺的混合液,使之与杂交条进行颜色反应(developing color)。识别基因型:以 RMS 提供的等位基因标准为参照,确定每个样本在各个目的基因多态性或突变位点的基因型。拍照或压膜保存 Strips。

1.3 统计学方法

以基因计数(gene counting)法计算各种基因的各等位基因频率。卡方检验比较中国人之间和中国人和法国人在等位基因频率分布方面的差别。

2 结果

由于 RMS 方法固定在 Strip 条上的探针位置是已知的,所以在确定基因型时,RMS 提供了两张分别显示 Strip A 和 Strip B 各个基因型位置的透明塑料膜,以便我们能够将各个样本的 Strip A 条和 Strip B 条分别放在对应的透明塑料膜上进行拍照。图 1(Figure 1)是 RMS 提供的检测参考结果确定图,图 2(Figure 2)是我们的实验结果图。如果在某个对应的等位基因位置上,样本出现一条蓝色的条带,那么,这个样本就携带这个等位基因。对于野生型纯合子的记录为 10,对于杂合子的记录为 11,对于突变纯合子的记录为 01,这样便于统计分析。

2.1 北京、香港和法国人的 Strip A 条所含等位基因频率的比较

在 Strip A 条上,共检测了 6 种与脂代谢相关基因 14 个位点的等位基因。这些基因包括载脂蛋白 E、载脂蛋白 B、载脂蛋白 C (④ LPL 和 PON,被检测的位点是:载脂蛋白 E(ε2, ε3)、载脂蛋白 B(Thr71Ile, Arg 3 500 Gln)、载脂蛋白 C (④(T-625del、C-482T、T-455C、C1100T、C3175G 和 T3206G)、CETP (Ile405Val, Asp442Gly)、LPL (T-93G、T-39C、Asp9Asn、Asn291Ser 和 Ser447Term) 和 PON(Gln192Arg)。在这

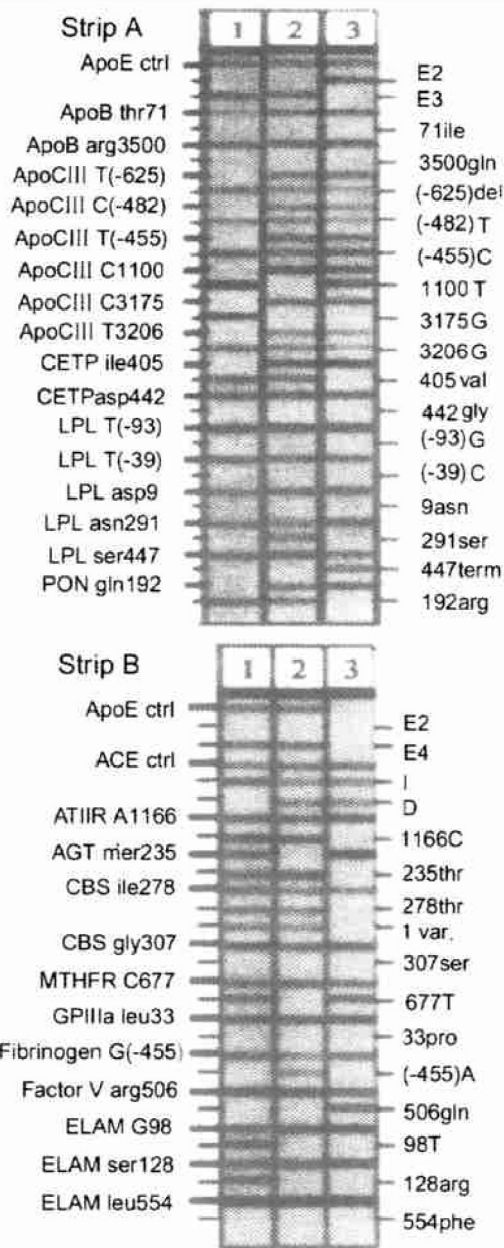


图 1. RMS 检测多种候选基因多态性的图谱结果。

Figure 1. RMS genotyping result patterns of the PCR products.

2 组中国人群中, 我们没有发现 2 个 LPL 的突变位点, 即 LPL-93T/G 和 Asp9Asn, 不同于法国人群。中国人之间在这些等位基因频率分布方面没有显著差异, 而在载脂蛋白 B Thr71Ile、载脂蛋白 C (-482C/T、1100C/T、3175C/G 和 3206T/G)、CETP (405Ile/Val)、LPL (-93T/G 和 Asp9Asn) 和 PON (Gln192Arg) 位点的等位基因频率有显著差异。

2.2 北京、香港和法国人的 Strip B 条所含等位基因频率的比较

Strip B 条所检测的基因是与血压形成、同型半胱氨酸代谢和血栓形成有关的基因及其常见多态性

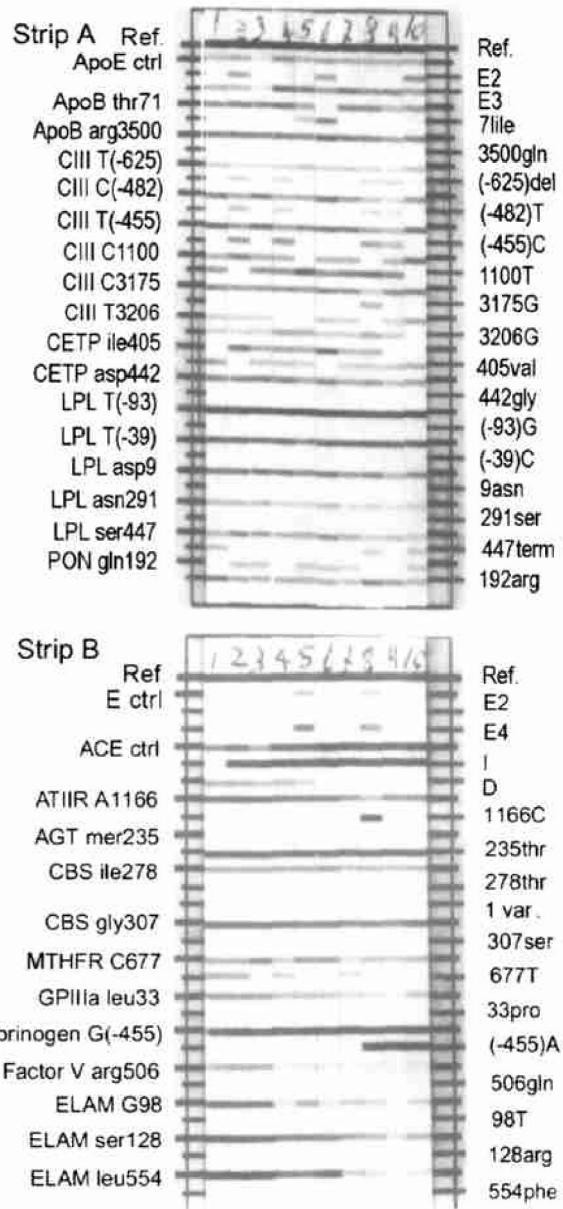


图 2. RMS 方法检测中国人样本候选基因型的结果。

Figure 2. Results of the RMS genotyping in the Chinese population.

位点。它们分别是 ACE (I/D)、ATIIR (A1166C)、AGT (Met235Thr)、CBS (Ile278Thr 和 Gly307Ser)、MTHFR (C677T)、Factor V (Arg506Gln)、Fibrinogen β (G - 455A)、GPIIIa (Leu33Pro) 和 ELAM (G98T、Ser128Arg 和 Leu554Phe)。在中国人群中, 没有发现以下基因的突变等位基因: GP (Leu33Pro)、Factor V (Arg506Gln) 和 ELAM (G98T 和 Ser128Arg), 显著不同于法国人群; 也没有发现其它位点的等位基因频率显著不同。但是除 Factor V (Arg506Gln) 和 ELAM (Leu554Phe) 外, 中国人和法国人在其它等位频率上都存在显著差异(表 1, Table 1)。

表 1. 中国人和法国人等位基因频率比较.

Table 1. Comparison of the allelic frequencies between Chinese and French subjects.

Allele		Beijing (n=208)	Hong Kong (n=206)	French (n=200)	P
apoE	ε2	0.09	0.102	0.096	0.94
	ε3	0.87	0.806	0.803	
	ε4	0.04	0.092	0.101	
apoB (71)	Thr	0.87	0.84	0.68	< 0.001
	Ile	0.13	0.16	0.32	
apoC ④(-625)	T	0.63	0.563	0.65	0.07
	Del	0.36	0.437	0.35	
apoC ④(-482)	C	0.63	0.612	0.765	< 0.001
	T	0.37	0.388	0.235	
apoC ④(-455)	T	0.64	0.602	0.67	0.15
	C	0.36	0.398	0.33	
apoC ④(1100)	C	0.40	0.422	0.765	< 0.001
	T	0.60	0.578	0.235	
apoC ④(3175)	C	0.69	0.718	0.915	< 0.001
	G	0.31	0.282	0.085	
apoC ④(3206)	T	0.33	0.233	0.685	< 0.001
	G	0.67	0.767	0.315	
CETP (405)	Ile	0.51	0.529	0.73	< 0.001
	Val	0.49	0.471	0.27	
CETP (442)	Asp	0.99	0.985	1.00	0.09
	Gly	0.01	0.015	0	
LPL (-93)	T	1.000	1.00	0.97	0.01
	G	0	0	0.03	
LPL (9)	Asp	1.000	1.00	0.975	0.02
	Asn	0	0	0.025	
LPL (447)	Ser	0.86	0.893	0.91	0.57
	Ter	0.14	0.107	0.09	
PON1 (192)	Gln	0.35	0.359	0.68	< 0.001
	Arg	0.65	0.641	0.32	
ACE	I	0.57	0.636	0.465	0.001
	D	0.43	0.364	0.535	
ATHR (1166)	A	0.97	0.942	0.755	< 0.001
	C	0.03	0.058	0.245	
AGT (235)	Met	0.24	0.15	0.585	< 0.001
	Thr	0.76	0.85	0.415	
CBS (278)	Ile	0.99	1.00	0.925	< 0.001
	Thr	0.01	0	0.075	
MTHFR (677)	C	0.63	0.777	0.65	0.005
	T	0.37	0.223	0.35	
GPII (33)	Leu	1.000	1.00	0.84	< 0.001
	Pro	0	0	0.16	
Fibrinogen (-455)	G	0.84	0.721	0.80	0.70
	A	0.16	0.279	0.20	
Factor V (506)	Arg	1.000	1.00	0.964	0.007
	Gln	0	0	0.036	
ELAM (98)	G	1.000	1.00	0.90	< 0.001
	T	0	0	0.10	
ELAM (128)	Ser	1.000	1.00	0.905	< 0.001
	Arg	0	0	0.095	
ELAM (554)	Leu	0.94	0.951	0.95	0.95
	Phe	0.06	0.049	0.05	

3 讨论

基因多态性在个体对疾病易感性、疾病的临床表现、治疗效果的反应性和预后效果方面有重要意义,因此基因多态性检测方法的建立十分重要。RMS 研究组从 CVD 候选相关基因入手,建立多基因多位点基因型分析方法,为大规模人群研究 CVD 遗传危险因素建立了基础,Cheng 等^[2]首先试验了这些欧美科学家最为关注的 CVD 候选基因。

RMS 基因型分析方法的优点是:仅仅用限制性片段长度多态性方法分析一个基因多态性样本所需要的 DNA 量,分析该样本多个基因的多个位点的基因型,不仅节约了模板 DNA 的用量,而且可以获得许多遗传信息,该方法智力和技术成分含量都很高,比如引物设计、引物的生物素标记、寡核苷酸在硝酸纤维素膜上的固定等。

在 RMS 分析方法中,必须注意引物的分类加入,避免由于引物和 DNA 的错加影响分析结果。操作中水浴温度和时间需严格遵守,否则容易产生非特异性条带,影响确定基因型的工作。此方法的局限性在于对实验操作者的工作能力要求较高,检测仪器也不是实验室常用仪器,成本较高,比如水浴摇床、Strip 条所用的槽和照相系统。

众所周知,生物芯片时代的到来对 Strip 分析方法是一个挑战,但是 RMS 分析方法比生物芯片分析更容易被临床化学实验室接受和掌握,其结果的直接性也有利于这种方法的推广和应用。该方法有利于有针对性、有目的地研究我们所关注的已知基因多态性与疾病发生的关系,以便在低成本和有效的时间内了解研究对象的目的基因的遗传信息,适用于临床实验室和大规模流行病学调查研究。虽然我们的样本量不是很大,但是应用此方法研究不同地区中国人样本和法国人样本的结果也基本显示了中国人的遗传相似性和法国人与中国人的遗传性差异。由于这些候选基因是通过高加索人群 CVD 发病相关遗传因素确定的,所以中国人可能在某些位点无突变等位基因,有必要发现中国人特有的与 CVD 发生相关的基因多态性。

[参考文献]

- [1] Cheng S, Pallaud C, Grow MA, et al. A multilocus genotyping assay for cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med*, 1998, **36**: 561-566
- [2] Cheng S, Grow MA, Pallaud C, et al. A multilocus genotyping assay for candidate markers of cardiovascular disease risk. *Genome Res*, 1999, **9**: 936-949

(此文编辑 朱雯霞)