

华北地区 CYP1A2 基因常见 SNP 位点的分布

辛 勤 梁国威 邵冬华

摘要 目的 建立 CYP1A2 基因 -3860G > A、-3113G > A、-2467delT、-739T > G、-163C > A、2321G > C、5347C > T 等 7 个 SNP 位点的检测方法,探讨 7 个 SNP 位点在华北地区人群中的分布。**方法** 选取健康受试者,提取全血样本 DNA,以 Primer Premier 5 软件自设计引物及探针,采用扩增阻滞突变系统 (ARMS) 结合 TaqMan 探针技术 (ARMS - TaqMan 法) 建立 CYP1A2 基因 7 个 SNP 位点基因分型方法。**结果** -3860G > A、-3113G > A、-2467delT、-739T > G、-163C > A、2321G > C、5347C > T 7 个 SNP 位点的突变等位基因频率分别为 0.292、0.078、0.524、0.078、0.657、0.148、0.127。**结论** 成功建立 7 个 SNP 位点的 ARMS - TaqMan 基因分型方法,该方法具有准确、操作简单、高通量等优势。

关键词 CYP1A2 基因多态性 扩增阻滞突变系统 TaqMan 探针

中图分类号 R33

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.07.030

Distribution of SNP Sites of CYP1A2 Gene in North China. Xin Qin, Liang Guowei, Shao Donghua. Department of Clinical Laboratory, Hospital of Aerospace Center, Beijing 100049, China

Abstract Objective To establish methods to analyze the 7 single nucleotide polymorphism (SNP) sites of CYP1A2 gene, including -3860G > A, -3113G > A, -2467delT, -739T > G, -163C > A, 2321G > C, 5347C > T. To explore the distribution of seven SNP sites in North China. **Methods** The DNA was extracted from the blood samples of healthy subjects. We designed the primers and probes by Primer Premier 5 software, and established the methods to detect the 7 SNP sites of CYP1A2 gene using amplification refractory mutation system (ARMS) combined with TaqMan probe technique (ARMS - TaqMan method). **Results** The mutant allele frequencies of the 7 SNP sites including -3860G > A, -3113G > A, -2467delT, -739T > G, -163C > A, 2321G > C, 5347C > T were 0.292, 0.078, 0.524, 0.078, 0.657, 0.148, 0.127, respectively. **Conclusion** We successfully established the ARMS - TaqMan methods to detect the 7 SNP sites of CYP1A2 gene. The method was accurate, simple and high throughput.

Key words CYP1A2; Polymorphism; Amplification refractory mutation system; TaqMan probe

CYP1A2 基因位于 15 号染色体上,全长 7.8kb,包括 7 个外显子和 6 个内含子。CYP1A2 主要存在于肝脏中,约占肝脏中总 CYP 酶的 13% ~ 15%^[1]。仅次于 CYP3A 和 CYP2C 家族居肝脏各 CYP 含量第 3 位^[2]。CYP1A2 是一种具有基因多态性的酶,其等位基因的突变在人群中呈不连续多峰分布。本研究选取 CYP1A2 基因中比较常见的 7 个 SNP 位点,建立其基因分型检测方法,并探讨 7 个 SNP 位点在华北地区人群中的分布。

材料与方法

1. 试剂与仪器:DNA 提取试剂:血液基因组 DNA 提取试剂盒(批号:L0723);普通 PCR 试剂:Taq PCR MasterMix(批号:K9126);荧光定量 PCR 试剂:2.5 × RealMasterMix、20 × Probe Enhancer Solution(批号:L0821),均购自北京天根生化科技有限公司。引物及探针由北京赛百盛基因技术有限公司合成。ABI

-9700 普通 PCR 仪购自美国 ABI 公司;ABI - 7500 RT 型荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司;Alpha Innotech Alphasager EC 凝胶成像系统购自美国 Alpha Innotech 公司;BIO - RAD Power Pac Basic 电泳仪购自美国 BIO - RAD 公司;UNIC - UV - 2000 紫外分光光度计购自尤尼柯公司。

2. CYP1A2 基因分型方法的建立及验证:本研究采用 ARMS - TaqMan 法对 CYP1A2 基因的 7 个位点进行分型,为验证该方法的准确性,需要对该方法分型后的 DNA 样本进行抽样测序,具体操作按照以下步骤:(1)DNA 提取:收集 166 例健康受试者(其中男性 106 例,女性 60 例,平均年龄为 25.2 ± 4.3 岁)外周血样品,按照 DNA 提取试剂盒操作,提取全血标本 DNA。提取的基因组 DNA - 80℃ 保存备用。(2) ARMS - TaqMan 法的建立:ARMS - TaqMan 法是在 ARMS 法的基础上,以 TaqMan 探针取代琼脂糖凝胶电泳,在荧光定量 PCR 仪上,通过检测 TaqMan 探针的荧光信号,读取野生和突变反应体系的 Ct 值,通过

计算其 Ct 值的差值 (ΔCt 值), 来判断 SNP 分型^[3]。应用 Primer Premier 5 软件自设计引物及探针, 7 个 SNP 位点的引物及探针序列见表 1。反应体系总体积为 20 μ l, 含提取 DNA 2 μ l、上游和下游引物及探针各 1 μ l、2.5 \times RealMasterMix 8 μ l、20 \times Probe Enhancer solution 1 μ l, 加纯水至 20 μ l。使用 GeneAmp 7500 荧光定量测定仪 (ABI 公司, 美国) 检测 TaqMan 探针 FAM 荧光信号。各位点反应参数见表 2。

(3) ARMS - TaqMan 法的测序验证: 以 ARMS - TaqMan 法分型后的 SNP 位点每 3 种基因型各随机抽取 5 例样本进行测序, SNP 位点基因型不足 5 例的样本全部测序。7 个位点测序引物序列见表 3, 其中 -739T > G、-163C > A 两个位点公用一对测序引

表 1 7 个位点 ARMS - TaqMan 法引物及探针序列

位点及名称	引物及探针序列 (5'→3')
-3860G > A	
上游引物	AAGCTACACATGATCGAGCTATAC
下游野生	GGCATGACAATTGCTTGAATAC
下游突变	GGCATGACAATTGCTTGAATAT
探 针	FAM - CGGAGGTTGCGGTGAGCCAAGATC - BHQ
-3113G > A	
上游野生	CCAAGAGGAATCCAAAGAGAGG
上游突变	CCAAGAGGAATCCAAAGAGAGA
下游引物	AAGTTCATGTTTACTTAGATTTC
探 针	TaqMan - MGB ACATTAGGTAAAACGCA
-2467delT	
上游野生	GAGCCATGATTGTGGCACGT
上游突变	AGCCATGATTGTGGCACGG
下游引物	GGATGTGAAAAGGAAGTTTGCTA
探 针	FAM - ACCCCAACCTGGGTGACAGAGCAAGA - BHQ
-739T > G	
上游野生	CCTGGGCTAGGTGTAGGGCT
上游突变	CTGGGCTAGGTGTAGGGCG
下游引物	CGCTCTCTTAAAAATGGCTTAGT
探 针	FAM - ACCCAGCTCTTGACTTCTGTTTCCCG - BHQ
-163C > A	
上游野生	AAGGGTGAGCTCTGTGGGAC
上游突变	AAGGGTGAGCTCTGTGGGAA
下游引物	TCATTCAATTCATTTCTCAGTCAT
探 针	FAM - TGGTATCCAGCTGGGAGCCAACAC - BHQ
2321G > C	
上游引物	GTGCCTGCCCTTGCCCTA
下游野生	CCCCATGAATTATCCCCAC
下游突变	GCCCCATGAATTATCCCCAG
探 针	FAM - AGTCTGCGACCCACTAACCTCCA - BHQ
5347C > T	
上游引物	TGGAGTTCAGCGTGCCG
下游野生	GAATGGTGGTCTTCTTCCG
下游突变	AGAATGGTGGTCTTCTTCCA
探 针	FAM - CGCAGCCGCGCTGGACATGTTAC - BHQ

表 2 7 个位点普通 PCR 反应参数

SNP	预变性温度 ($^{\circ}$ C)	退火温度 ($^{\circ}$ C)	延伸时间 (s)	循环次数
-3860G > A	95	60	60	40
-3113G > A	95	60	60	40
-2467delT	95	60	60	40
-739T > G	95	58	60	40
-163C > A	95	58	60	40
2321G > C	95	58	60	40
5347C > T	95	60	45	40

物。反应总体积 50 μ l, 含提取 DNA 2 μ l、上游和下游引物 2 μ l、PCR Masrer Mix 25 μ l、加纯水至 50 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1min、60 $^{\circ}$ C 复性 1min、72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。扩增后 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。采用 BIO - RAD Power Pac Basic 电泳仪进行琼脂糖凝胶电泳, 电压 90V。电泳后进行凝胶成像, 由 Alpha Innotech Alphamager EC 凝胶成像系统完成。测序验证由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。最后进行 ARMS - TaqMan 法结果和测序验证结果的比对。

表 3 用于测序的 PCR 引物

位点及名称	扩增引物序列 (5'→3')
-3860G > A	
3860 测上	GCTACACATGATCGAGCTATAC
3860 测下	CAGGTCTCTTCACTGTAAAGTTA
-3113G > A	
-3113 测上	AAGGAGCGTAATCCCCAC
-3113 测下	TCCATTGGGTTGAGATGACTCA
-2467delT	
2467 测上	ACCGAGCCTAACCTCAAACC
2467 测下	GGATGTGAAAAGGAAGTTTGCTA
-739T > G	
-739 测上	CTGCCAATCTCAAGCACCTG
-739 测下	AGAAGGGAACAGACTGGGACA
2321G > C	
2321 测上	CAAGCCTGAGATACAGAGGAAGAT
2321 测下	GAAGGAGGAGTGTCCGAAGGT
5347C > T	
5347 测上	GTGCCCTCACACTTGTGTTCT
5347 测下	TCACTCAGGCTCTTGCAAAAT

结 果

以 -3860G > A 位点为例, 其 ARMS - TaqMan 法基因分型检测见图 1, 电泳及测序结果见图 2, ARMS - TaqMan 法与测序结果对比见表 4。166 例健康受试者基因型汇总及等位基因频率见表 5。

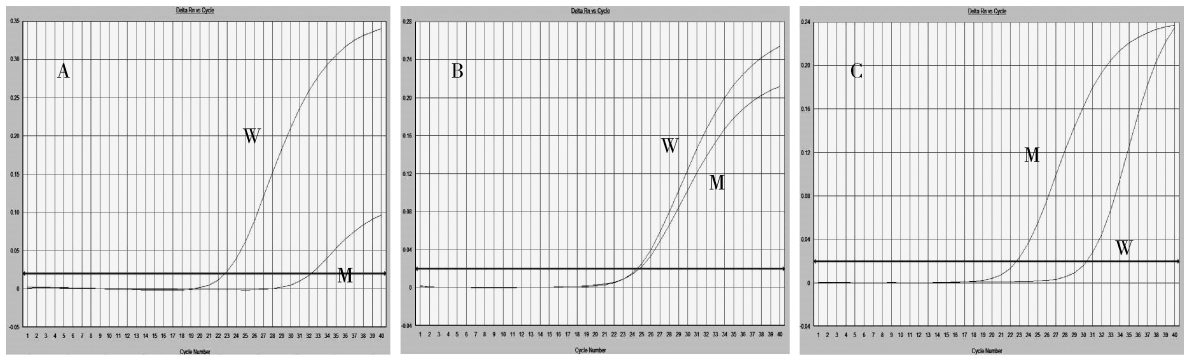


图1 -3860G > A 位点 ARMS - TaqMan 法扩增曲线图
A. 野生型; B. 杂合型; C. 纯合突变型

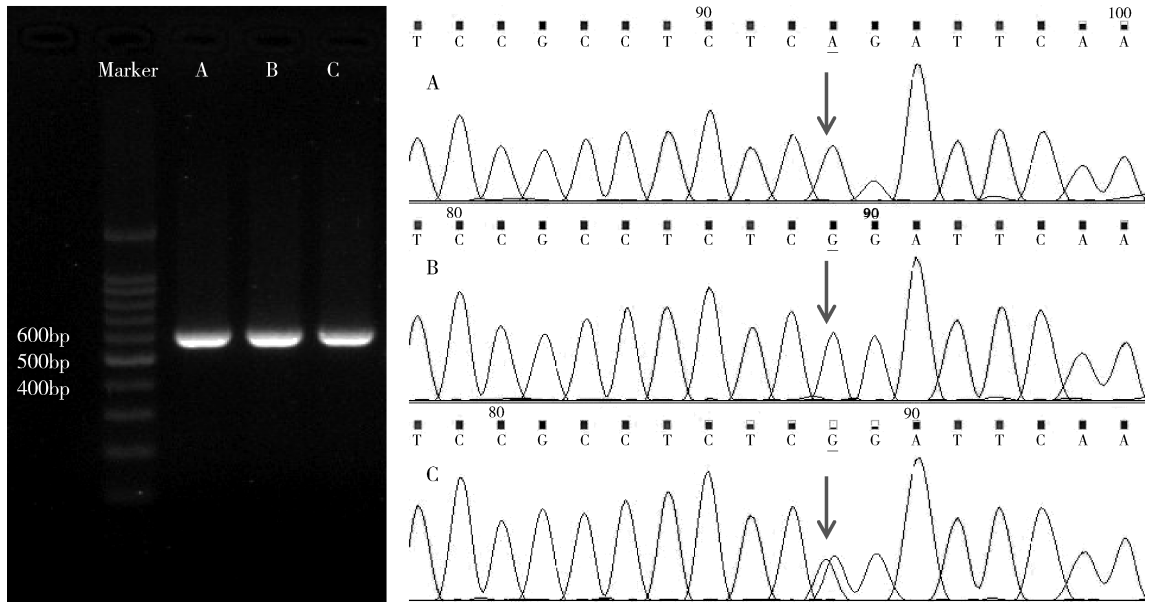


图2 -3860G > A 扩增产物琼脂糖凝胶电泳及测序图
A. 野生型; B. 杂合型; C. 纯合突变型, 扩增片段 596bp

表4 -3860G > A 位点 ARMS - TaqMan 法及测序结果比对

样本号码	ARMS - TaqMan 法分型结果	基因测序结果
1	GG	GG
2	GG	GG
4	GG	GG
5	GG	GG
6	GG	GG
3	GA	GA
8	GA	GA
11	GA	GA
12	GA	GA
13	GA	GA
35	AA	AA
41	AA	AA
65	AA	AA
66	AA	AA
69	AA	AA

讨 论

对于基因多态性的检测方法有很多种,基于 PCR 技术的常用方法主要有 PCR 直接分析法 (direct analysis, DA)、限制性酶切片长度多态性 (RFLP)、单链构象多态性 (SSCP)、异源双链分析 (heteroduplex analysis, HA) 以及在此基础上的衍生技术和 DNA 测序法等。而结合 PCR 技术所进行的限制性片段长度多态性分析法 (PCR - RFLP) 为检测 DNA 分子碱基变化的常用方法,目前国内外多采用该方法对 SNP 进行研究。虽然这些技术在某种程度上能完成对 SNP 的检测,但存在一些不足,主要表现为检测过程繁琐,检测所用时间长,检测仪器及试剂昂贵等,从而不利于在生产中推广应用。

两种方法检测结果一致,符合率 100%,显示所建立的 -3860G >

A 位点 ARMS - TaqMan 法可用于该位点基因分型检测

表5 166例样本基因型及等位基因频率

SNPs	基因型	n (%)	等位基因	等位基因频率 (%)
-3860G > A(* 1C;rs2069514)	GG	84(50.6)	G	71.8
	GA	67(40.4)	A	29.2
	AA	15(9.0)		
-3113G > A(rs2069521)	GG	141(84.9)	G	92.2
	GA	24(14.5)	A	7.8
	AA	1(0.6)		
-2467delT(* 1D;rs35694136)	TT	40(24.1)	T	47.6
	T-	78(47.0)	-	52.4
	--	48(28.9)		
-739T > G(* 1E;rs2069526)	TT	141(84.9)	T	92.2
	TG	24(14.5)	G	7.8
	GG	1(0.6)		
-163C > A(* 1F;rs762551)	CC	21(12.7)	C	34.3
	CA	72(43.4)	A	65.7
	AA	73(44.0)		
2321G > C(rs3743484)	GG	121(72.9)	G	85.2
	GC	41(24.7)	C	14.8
	CC	4(2.4)		
5347C > T(* 1B;rs2470890)	CC	128(77.1)	C	87.3
	CT	34(20.5)	T	12.7
	TT	4(2.4)		

扩增阻碍突变系统 (amplification refractory mutation system, ARMS), 也称等位基因特异性扩增法 (allele specific amplification, ASA)、等位基因特性 PCR (allele specific PCR, ASPCR) 等。建立于 1989 年, 是 PCR 技术应用的发展。设计两个 5' 端引物, 一个与正常 DNA 互补, 另一个与突变 DNA 互补。对于纯合性突变, 分别加入这两种引物及 3' 端引物进行两个平行 PCR, 只有与突变 DNA 完互补的引物才可延伸并得到 PCR 扩增产物。如果错配位于引物的 3' 端则导致 PCR 不能延伸, 则称为 ARMS^[4]。为更好地阻止错误延伸, 可通过在引物 3' 端的第 2 个碱基引入 1 个错配碱基, 使之与模板之间形成双重错配。本研究在 ARMS 法原理的基础上, 以 TaqMan 探针取代琼脂糖凝胶电泳, 在荧光定量 PCR 仪上, 通过检测 TaqMan 探针的荧光信号, 读取野生和突变反应体系的 Ct 值, 计算其 Ct 值的差值 (Δ Ct 值), 直接判断 SNP 型, 通过测序验证, 该方法检测结果 100% 准确。

本研究通过对 166 例受试者 CYP1A2 的 7 个 SNP 位点的研究发现, 突变率最高的位点为 -163C > A, 其等位基因 A 的频率为 0.657。-163C > A 发生于内含子 1, 该位点等位基因的突变在亚洲人当中发生的频率较高, 本研究中等位基因 A 的频率与日本人 (0.62 ~ 0.67)、意大利人 (0.59)、埃及人 (0.68) 以

及近期对中国人的研究结果 (0.61) 非常接近^[5-8]。CYP1A2*1C 于 1999 年由 Nakajima 等^[9] 首先发现, 该点突变位于转录起始点上游 -2964bp 处, 由鸟嘌呤 (G) 突变为腺嘌呤 (A), 并且该突变可以引起酶活性的降低。CYP1A2*1C 的发生率具有明显的种族差异, 亚洲人的发生频率为 0.240 ~ 0.267^[10,11], 明显高于欧洲人 (0.008) 和非洲人 (0.07)^[7,11]。本研究中, CYP1A2*1C 突变发生率为 0.292, 与 Song 等^[12] 研究结果 (0.279) 相近。-2467delT 为位于 CYP1A2 的 5' 侧翼区 T 的缺失, 是 1 个突变率很高的位点。Chida 等于 1999 年对 159 名日本人研究发现, 该突变在日本人的突变率为 0.42。Soyama 等^[10] 2005 年的研究验证了这一数据, 结果为 0.44 ($n = 250$)。本研究中, -2467delT 位点的突变率为 0.524, 略高于上述两个研究结果, 但 Skarke 等^[13] 报道的德国白种人群该突变发生频率约为 0.08 ($n = 495$), 说明该位点的突变存在着种族差异。5347C > T 的发生率为 0.127, 低于英国人 (0.382)、日本人 (0.19), 而与 Song 等研究结果 (0.132) 相近^[10,12]。-3113G > A 与 -739T > G 为两个同时出现的 SNP, 本研究的结果为 0.078, 高于日本人 (0.03) 和瑞典人 (0.023)^[10,11]。2321G > C 的发生频率为 0.148。

本研究通过引物和探针的设计, 成功建立了 CYP1A2 基因 7 个 SNP 位点的检测方法, 经测序验证准确率为 100%。通过对 166 例志愿者的 DNA 样本的基因分型, 进一步明确了该 7 个 SNP 位点在华北地区人群中的分布, 并与以往研究结果进行了比对。研究证明, ARMS - TaqMan 基因分型方法具有准确、操作简单、高通量等优势, 可以用于基因的分型检测。

参考文献

- Zhou S, Wang B, Yang L, et al. Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2 [J]. Drug Metabol Rev, 2010, 42(2): 268 - 354
- 周宏灏. 遗传药理学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2003: 53 - 54
- 梁国威, 张捷, 胡晓舟, 等. 等位基因特异 - 荧光定量 PCR 检测胱硫醚 - β - 合成酶基因 T833C/G919A 点突变及其与糖尿病肾病的相关性初步观察 [J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(6): 635 - 640
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(7): 2503 - 2516
- Takata K, Saruwatari J, Nakada N, et al. Phenotype - genotype analysis of CYP1A2 in Japanese patients receiving oral theophylline therapy [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2006, 62(1): 23 - 28
- Palatini P, Benetti E, Mos L, et al. Association of coffee consumption