维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2003)06-0704-05

Beta 肾上腺素能受体 3 种亚型基因的 5 位点 SNP 的基因型分布

谢正祥[1], 牛永红[1], 马厚勋[1], 李章勇[1], 殷跃辉[2]

(1. 重庆医科大学生物医学工程研究室,重庆 400016;2. 重庆医科大学第二临床学院心血管内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究 Beta 肾上腺素能受体 3 种亚型基因的 5 个位点的单核苷酸多态性基因型分布。方法:用 DNA 提取试剂盒抽提 338 例受试者外周血白细胞 DNA,用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性及等位基因特异性 PCR 技术获得 Beta-AR 3 种亚型基因的 5 个位点的 SNP 基因型。结果:分别获得了 338 例受试者的 Beta-AR 3 种亚型基因的 5 个位点中的每一位点的 SNP 基因型的自然分布特征。各位点的优势基因型为:Beta2-AR 49 位的野生型纯合子 Ser/Ser(70%),Beta1-AR 389 位的野生型纯合子 Arg/Arg(63%),Beta2-AR 16 位的杂合子 Arg/Gly(80%),Beta2-AR 27 位的杂合子(Gln/Glu(50%),Beta3-AR 64 位的野生型纯合子 Trp/Trp(65%)。结论:Beta-AR 3 种亚型基因的 5 位点中每位点的 SNP 基因型分布是非均匀的且各位点的分布特征是不同的,它是进一步研究其与功能和疾病的关系的基础。

【关键词】Beta 肾上腺素能受体;单核苷酸多态性;基因型分布特征

【中国图书分类法分类号】R318.15;R394.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-06-17

Genotype distributions of the 5 sites SNPs in the 3 subtypes of beta adrenoreceptor

XIE Zhengxiang, et al

(*Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To study the genotype-by site distributions of SNP(single nucleotide polymorphisms)at the 5 sites in the 3 subtypes of beta adrenoreceptor(Beta-AR or B-AR). *Methods*: DNA was extracted from the peripheral venous blood of 338 subjects using Blood DNA Mini Kit. The 5 sites SNP in the 3 subtypes of Beta-AR were genotyped by PCR-RFLP(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) and allele specified PCR techniques. *Results*: The natural distribution characteristics for SNP at the 5 sites in the 3 subtypes of Beta-AR of 338 subjects were gotten. The predominant phenotypes are as follows: Beta1-AR wild homozygote Ser/Ser49(70%), Beta1-AR wild homozygote Arg/Arg389(63%), Beta2-AR heterozygote Arg/Gly16(80%), Beta2-AR heterozygote Gln/Glu27(50%), Beta3-AR wild homozygote Trp/Trp64(65%). *Conclusion*: It is heterogeneous in distribution in different styles for the genotype-by site distribution of SNP at the 5 sites in the 3 subtypes of Beta-AR, which is the basis for further investigating the relationship among the distribution, gene function and diseases.

【Key words】Beta adrenoreceptor; Single nucleotide polymorphisms; Genotype distribution

人类每一个体的 DNA 是独有的,而且不随时间、空间而变化,是人体最根本的信息源,因而在 DNA 的核苷酸级进行检测,就有其独特的优点。王士雯等[1]以 89 人为样本,进行了"中国北方汉族人群 β_2 肾上腺素能受体基因多态性研究",用等位基因特异性识别技术,同时研究了 Beta2-AR 的 Arg16Gly, Gln27Glu, Thr164Ile 的 3 个位点的多态性的分布,指出与西方人群的分布有显著差别。Ranade 等[2]研究了 Beta-AR 的 3 种亚型基因的 5 个位点 Beta1-AR Ser49Gly, Beta1-AR Arg389Gly, Beta2-AR 16Arg16Gly, Beta1-AR Gln27Glu, Beta3-AR Trp64Arg)中的每一个位点的 SNP 与静息心率的关系,指出 Beta1-AR 等 49 位氨基酸(处于第一细胞外段)SNP 与心率表现型有显著相关性:Ser/Gly 杂合子基因型的群体平均心率居中,Ser 纯合子基因型的群体心率最高,Gly 纯合子基因型的群体心率最低。但是没有研究 5 种 SNP 的组合与静息心率表现型的关系。Beta-AR Arg389Gly 处于第四细胞内域,Gly389 能增强与 Gs 的藕合,增强下游信号转导功能,故称为功能增强型 SNP[3]。

基金项目:重庆市科委基金(编号[1999]-18-58;重庆医科大学科技创新基金 编号:CX2000202。

作者介绍:谢正祥(1938-),男,教授,博士生导师,主要研究方向:心血管系统基因型与表现型。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 对象与方法

1.1 研究对象

随机选择一高校职工 338 人(他们出生在不同的省市),女 158,男 188,年龄范围 23~89 岁(63.39±11.99)。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 提取 EDTA 抗凝外周静脉全血 1ml,用试剂盒法(上海华舜生物工程有限公司)抽提白细胞染色体 DNA。

1.2.2 Beta-AR 基因 SNP 检测

1.2.2.1 引物序列选取

所用引物如表 1 所示,均由上海博亚生物技术有限公司合成。所有引物均经美国 NIH 的 NCBI(National Center for Biotechnology Information)的 BLAST 软件搜索,具有特异性。经第三方软件 Primer5.0 检验具有优良的性能。

1.2.2.2 引物序列的 GC、AT 计数和复性(annealing)温度的选取

复性就是引物与单链模板结合的过程。复性温度 Tat (Theoretical annealing temperature)的计算与序列的长度和 GC、AT 计数有关。通常按以下经验公式计算复性温度 Tat:

$$Tat = 4(G+C) + 2(A+T)$$

但经验上都取比 Tat 低 5℃ 的温度 Ta(annealing temperature):

$$Ta = Tat - 5$$

上式中,温度单位为℃。G、C、A、T 为引物中对应核苷酸的计数和。在实际操作中,都要根据实验室本身的具体条件再进行优选实际运行温度 Tao(annealing temperature in operation)。本研究中的 Tat、Ta、Tao 值见表 1。

1.2.2.3 扩增片段的 GC 计数和变性温度的选取

扩增片段的 GC 计数与完成 PCR 时所选取的变性温度的确定有关。因为 GC 之间的键结合比 AT 更牢固(AT 间是双氢键结合,GC 间是三氢键结合),所以需要更高的解链能量,因而需要更高的解链温度。解链温度 Tm 可由下列经验公式进行理论估计:

$$Tm = GCR\% \times 0.41 + 69.3$$

式中 Tm 表示熔融(melting)或解链(delinking)或变性(denaturing)温度。GCR(GC ratio) = (G+C)/片段总 bp 值。5 个扩增片段的长度(LTF)、GC 值、理论变性温度的选取如表 2。

Table 1 Primer and annealing temperature

SNP	Primer	LP(bp)	GC(bp)	AT(bp)	Tat(℃)	Ta(℃)	Tao(℃)	Da(S)
B1-Ser49Gly-P1	CCGGGCTTCTGGGGTGTTCC	20	14	6	68	63	62	60
B1-Ser49Gly-P2	GGCGAGGTGATGGCGAGGTAGC	22	15	7	74	69		
B1-Arg389Gly-P1	CATCATGGGCGTCTTCACGC	20	12	8	64	59	53	30
B1-Arg389Gly-P2	TGGGCTTCGAGTTCACCTGC	20	12	8	64	59		
B2-Arg16Gly-P11	CTTCTTGCTGGCACCCAATA	20	10	10	60	55	55	60
B2-Arg16Gly-P12	CTTCTTGCTGGCACCCAATG	20	11	9	62	57		
B2-Arg16Gly-P2	ACAATCCACACCATCAGAAT	20	8	12	56	51		
B2-Gln27Glu-P11	GGACCACGACGTCACGCAGC	20	14	6	68	63	55	60
B2-Gln27Glu-P12	GGACCACGACGTCACGCAGG	20	14	6	68	63		
B2-Gln27Glu-P2	ACAATCCACACCATCAGAAT	20	8	12	56	51		
B3-Trp64Arg-P1	CGCCCAATACCGCCAACAC	19	12	7	62	57	60	30
B3-Trp64Arg-P2	CCACCAGGAGTCCCATCACC	20	13	7	66	61		

注:B:beta adrenoceptor;P1:Sense primer;P11:The first sense primer;P12:The second sense primer;P2:inverse sense primer;LP:length of primer;Tat:Theoretical annealing temperature;Ta:Annealing temperature;Tao:annealing temperature in operation;Da:annealing duration.

Table 2 Denaturation temperature

SNP	LTF(bp)	GCvalue	Tmt(℃)	Tmo(℃)	Taq polymerase
Beta1-Ser49Gly	562	0.7099644	98.40854	98	LA
Beta1-Arg389Gly	547	0.8647166	104.75387	98	LA
Beta2-Arg16Gly	453	0.543046	91.564886	94	EX
Beta2-Gln27Glu	420	0.54304761	91.45952	94	EX
Beta3-Trp64Arg	210	0.685714	97.414274	95	EX/LA

注:LTF:length of targeted fragment;Tmt:Theoretically melting temperature;Tmo:melting temperature in operation

1.2.2.4 PCR

在进行 PCR 时,除了上述温度条件以外,Taq 酶的选取也与目标片段的 GC 比有关,见表 2。对于 GC 比在 70% 以上的 Beta1 的两个位点的目标片段的扩增,用 LA Taq 酶(大连宝生物有限公司提供)。对于 GC 比在 60% 以下的 Beta2 的两个位点的目标片段的扩增,用 EX Taq 酶(大连宝生物有限公司提供)。对于 Beta3 的一个位点的目标片段的扩增,上述两种酶都能获得满意的目标片段扩增效果。运用

维普资讯 http://www.cqvip.com

SPRT001 型扩增仪(美国 ThermoHybaid 公司)进行 PCR 扩增分析。PCR 反应体系如表 3 所示,PCR 反应条件如表 4 所示。PCR 反应体系中,除引物购自上海博亚生物技术有限公司外,其余试剂皆购自大连宝生物有限公司。

扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳(电泳仪为 DYY-11 电脑三恒多用电泳仪,北京六一仪器厂),溴化乙锭(EB)染色(琼脂糖和 EB 皆为大连宝生物有限公司产品),WD-9403D 型紫外分析仪(北京六一仪器厂)检测证实 PCR 结果。

1.2.2.5 基因型检测的 RFLP(restricted fragment length polymorphisms)法

RFLP 法检测 SNP 是常用的方法。本研究中采用的限制性内切酶及 RFLP 条件见表 5。EcoO109I 和 MvaI 酶皆为大连宝生物有限公司产品。BcgI 为美国 New England Biology 公司产品。在使用前,我们根据文献和手册对每种酶的识别序列和酶切位点进行了核查,并用 Primer 5.0 软件和我们的电子酶切方法对目标片段进行了电子酶切,获得了一致的结果。

Table 3 PCR system

SNP	20ulPCR 反应体系							
	ddH_2O(uL)	Buffer(μl)	$MgCl_2$(mM)	dNTP(μM)	P_1(pmol)	P_2(pmol)	Taq 酶(U)	模板 DNA(ng)
B1-S49G	*	3	1.2	200	1	1	1	100
B1-R389G	*	3	15	150	25	25	0.5	100
B2-R16G	*	2.5	15	200	15	15	1	100
B2-Q27E	*	2.5	15	200	15	15	1	100
B3-W64R	*	3	15	150	25	25	0.5	100

* 加至 20ul

Table 4 The conditions for PCR

基因型	PCR 反应条件				
	预变性	变性	退火	延伸	循环次数
B1-S49G	98℃ 3min	98℃ 45s	62℃ 60s	72℃ 30s	35
B1-R389G	98℃ 3min	98℃ 30s	53℃ 30s	72℃ 45s	35
B2-R16G	95℃ 3min	94℃ 1min	55℃ 1min	72℃ 1min	35
B2-Q27E	95℃ 3min	94℃ 1min	55℃ 1min	72℃ 1min	35
B3-W64R	95℃ 10min	95℃ 30s	60℃ 30s	72℃ 30s	30

注:上列 PCR 反应体系及反应条件为在表 6 中所列参考文献的条件的基础上略有调整。

Table 5 The conditions for examining gene polymorphisms by RFLP

SNP	限制性内切酶	反应体系				反应条件	
		PCR 产物(ul)	内切酶(U)	buffer(ul)	ddH_2O(ul)	温度(℃)	时间(h)
*B1-S49G	EcoO109I	10	20	2	3	37	8
*B1-R389G	BcgI	10	12	3	4	37	4
*B3-W64R	MvaI	10	15	3	3	37	1

* 酶切产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳;** 用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳

1.2.2.6 基因型的检测的等位基因特异性(allele specified)PCR 技术

将 SNP 位点的碱基作为与待设计引物的 3′末端互补碱基来设计两条上游引物,分别用这两条上游引物做两次 PCR。由于引物 3′末端要严格与模版 DNA 配对,故如果两次 PCR 结果均为阳性,则为杂合子;如果两次 PCR 结果仅有一次为阳性,则为野生型或变异型纯合子。例如,如用表 2 中 B2-Arg16Gly-P11,则野生型纯合子为阴性(无电泳带),变异型纯合子为阳性(有明显电泳带),余类推。

1.2.2.7 数据分析

(1)聚类分析:对每个 SNP 位点的等位基因,分别进行聚类分析,获得每个等位基因的分布频数。

(2)同类数据以均数($\bar{x}$)±标准差(s)表示,以 $P<0.05$ 作为统计学差异的判别标准。数据处理和图表绘制主要在 MS-OFFICE2000 的 EXCEL 软件下完成。

2 结 果

2.1 等位基因特异 PCR 技术是一项检测 SNP 的新技术,在本研究中取得了良好的效果。

2.2 全样本 Beta-AR 的 3 亚型 5 位点中没位点的 SNP 基因型分布数据示于表 6 和图 1 中。从表 6 可以看出,Betal-AR Ser49Gly 多态性中,Ser/Ser 纯合子属优势基因型(72%),Gly/Gly 纯合子属稀有基因型(0.3%),Ser/Gly 杂合子处于平均值附近(28%)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

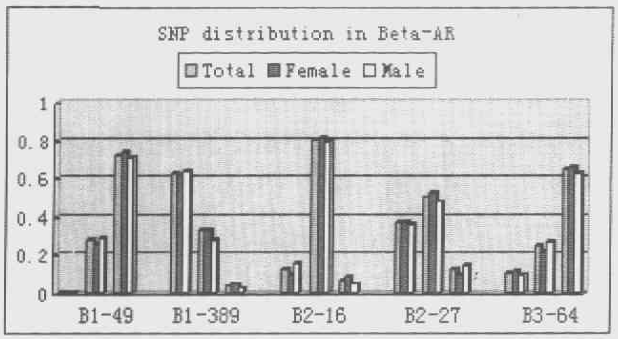


Figure 1 SNP distribution - by site for 5 sites in 3 subtype of Beta - AR

注:B1 - 49:Beta1 - AR - Ser49Gly;B1 - 389:Beta1 - AR - Arg389Gly;B2 - 16:Beta2 - AR - Arg16Gly;B2 - 27:Beta2 - AR - Gln27Glu;B3 - 64:Beta3 - AR - Trp64Arg.

Betal - AR Arg389Gly 多态性中,Arg/Arg 纯合子属优势基因型(63%), Gly/Gly 纯合子属稀有基因型(0.4%),Arg/Gly 杂合子处于平均值附近(33%)。Beta2 - AR Argl6Gly 多态性中,Arg/Gly 杂合子属优势基因型(80%),Gly/Gly 纯合子属稀有基因型(0.7%),Arg/Gly 杂合子属于相对稀有基因性(13%)。Beta2 - AR Gln27Glu 多态性中,Gln/Glu 杂合子属优势基因型(50%),Glu/Glu 纯合子属少有基因型(13%),Gln/Gln 纯合子属于相对优势(37%)。Beta3 - AR Trp64Arg 多态性中,Arg/Arg 纯合子属少有基因型(11%),Trp/Trp 纯合子属优势基因型(65%),Trp/Arg 杂合子处于平均值附近(25%)。女性与男性的分布与总样本类似,相关系数分别为,女:总样本 = 0.997739;男:总样本 = 0.991173;女:男 = 0.997151。T 检验 P 值皆 > 0.96。

3 结 论

3.1 等位基因特异 PCR 检测 SNP 是一项经济、快速、适应性强的值得推广的的新技术。

3.2 总样本和各个亚组中,Beta - AR 的 3 亚型基因的 5 位点的 SNP 分布(即按位点的分布,而不是组合分布)是不均匀的,有较大的偏倚性,见表 6。

3.3 每个位点的优势基因型不一定是野生型。

3.4 Beta - AR 的 3 种亚型基因的 5 个位点的 SNP 基因型按位点的分布不均匀性也可能是长期与环境相互作用的结果。

Table 6 The distribution - by site for 5 sites of 3 subtype in Beta - AR

	B1 - Ser49Gly			B1 - Arg389Gly			B2 - Arg16Gly			B2 - Gln27Glu			B3 - Trp64Arg			No
SAP	G/G	S/G	S/S	R/R	R/G	G/G	R/R	R/G	G/G	Q/Q	Q/E	E/E	R/R	W/R	W/W	
SNP	A/A	A/G	G/G	C/C	C/G	G/G	G/G	G/A	A/A	C/C	C/G	G/G	T/T	T/C	C/C	
T:338	1	93	244	213	112	13	45	270	23	124	170	44	36	84	218	338
%(T)	0.003	0.28	0.72	0.63	0.33	0.04	0.13	0.80	0.07	0.37	0.50	0.13	0.11	0.25	0.65	1
F	0	40	114	96	50	8	16	124	14	57	81	16	18	34	102	154
%(F/T)	0	0.26	0.74	0.62	0.33	0.05	0.10	0.81	0.09	0.37	0.53	0.10	0.12	0.22	0.66	1
M	1	53	130	117	52	5	29	146	9	67	89	28	18	50	116	184
%/(M/T)	0.005	0.29	0.71	0.64	0.28	0.03	0.16	0.79	0.05	0.36	0.48	0.15	0.10	0.27	0.63	1

注:SAP:Single Amino Acid Polymorphisms:单氨基酸多态性。T:Total,即总样本;F/T:Female/Total,即总样本中的女性;M/T:Male/Total,即总样本中的男性。%率即基因型频率。

4 讨 论

4.1 关于野生型与优势基因型:按传统的 SNP 表述法,都是把野生型写在前面。如这里研究的 Beta - AR 的 3 种亚型基因的 5 个位点的 SNP 基因型的传统表述法为:Beta1 - AR Ser49Gly(B1 - AR S49G),Beta1 - AR Arg389Gly(B1 - AR R389G),Beta2 - AR Arg16Gly(B2 - AR R16G),Beta2 - AR Gln27Glu(B2 - AR Q27E),Beta3 - AR Trp64Arg(B3 - AR W64R)。但是,这里的研究指出,传统认为的野生型,并不都是优势基因型,如 Beta2 - AR Arg16Gly(B2 - AR R16G)多态性位点,除了男性亚组是野生型纯合子为优势(B2 - AR16 位的 R/R 出现的频率为:60%)基因型外,都是杂合子为优势基因型,野生型纯合子为次优势基因型。Bcta2 - AR-Gln27Glu(B2 - AR Q27E)多态性位点也多数为杂合子为优势基因型,野生型纯合子为次优势基因型。这可能为环境因素(遗传压力)作用的结果。

4.2 这里所研究的多态性位点中,出现的最少的基因型是 Betal - AR49 位的 Gly/Gly。这个人是本组中年龄最大(89 岁,男性)的。他患有Ⅱ性糖尿病,但无高血压和高脂血症。他存活到如此高龄,可能有另外的抑制疾病的因素在起作用。

维普资讯 http://www.cqvip.com

4.3 Beta－AR 的 3 种亚型基因的 5 个位点的 SNP 的碱基替换类型

Beta3 的 Trp64Arg 多态性对应碱基替换为 T387C，属于同类碱基替换多态性：(胞)嘧啶碱基 C 替换(胸腺)嘧啶碱基 T。而 beta2 的 Gly16Arg 多态性的碱基替换为 G265A，属于嘌呤类碱基同类碱基替换多态性(265 位的腺嘌呤核苷酸 A 替换鸟嘌呤核苷酸 G)，遗传学上称为"转换"(transition)。而 Gln27Glu 对应碱基替换为多态性则为 C298G 的非同类碱基替换多态性：鸟嘌呤核苷酸 G 替换了胞嘧啶核苷酸 C，遗传学上称为"颠换"(transversion)。Betal 的 Ser49Gly 多态性对应的碱基替换为 A145G，属于嘌呤类同类碱基替换替换多态性(145 位的鸟嘌呤核苷酸 G 替换腺嘌呤核苷酸 A)。Betal 的 Arg 389Gly 多态性对应的碱基替换为 C1165G，属于嘌呤类与嘧啶类的非同类碱基替换替换多态性(1165 位的鸟嘌呤核苷酸 G 替换了胞嘧啶 C)。

4.4 Beta－AR 的 3 种亚型基因的 5 个位点的 SNP 对翻译后的氨基酸的性质的影响

Sachidanandam 等[4]报告了人类基因组有 1.42×10^6SNP，其中，有 6×10^4SNP 在编码区。Ng 等[5]报告过每个人的基因组约有 3000 多个 nsSNP(非同义单核苷酸多态性：nonsynonynous single nucleotide polymorphism)，其中约 25%(=777)是损害蛋白质功能的有害的 nsSNP(不同的作者报告的数据有较大的不同)。SNP 正是个体千姿百态的原因。Beta－AR SNP 基因型对受体功能的影响以及对疾病易感性的影响主要由于这些 SNP 的不同基因型产生的氨基酸的性质的变化，如疏水性质的变化，带电特性的变化，旋光性的变化等。

本研究中涉及的 Beta－AR 的 3 种亚型基因的 5 个位点的氨基酸序列位置有 3 个处于胞外，如 Betal－AR Ser49Gly，Beta2－AR Arg16Gly，Beta2－AR Gln27Glu，主要与细胞外液中的成分相互作用，特别是与各种细胞因子、激动剂、抑制剂的相互作用，感知细胞外液中的 PH 的变化等。Beta－AR 属 G 蛋白偶联受体，其胞内部分参与细胞内的信号转导过程。本研究中有 2 个位点的氨基酸序列位置处于胞内，如 Betal－AR Arg389Gly，Reta3－AR Trp64Arg。氨基酸疏水性质的变化，影响蛋白质的空间结构变化，从而影响蛋白质的功能。根据对氨基酸的不同特性的研究结果[6]，Beta－AR 的 3 种亚型基因的 5 个位点的 SNP 对翻译后的氨基酸的性质的影响如下：Betal－AR Arg389Gly SNP 产生的氨基酸替换为：由 Gly(甘氨酸)替换了 Arg(精氨酸)。替换的结果产生的主要变化有：分子量大大降低了(174.4/75.05)；疏水性增加了(－4.5/－0.4)：可影响 Betal－AR 蛋白质的第 4 胞内域部分的结构的改变，从而影响其功能的改变；带电性质改变了(＋/N)：改变了与胞内物质相互作用的静电力；旋光性质改变了(＋12.5/0)：改变了与其他物质相互作用的性质，如有的药物，消旋体无作用；改变了等电点(10.76/5.97)：改变了对细胞内液 PH 的传感性质。

参 考 文 献

[1] 高光凯，蒋一平，王士雯. 中国北京汉族人群 Beta 2 肾上腺素能受体基因多态性研究[J]. 中国优生与遗传杂志，2002；10(1)：18－20.

[2] Ranade K，Jorgenson E，Sheu WH，et al. A polymorphism in the beta1 adrenergic receptor is associated with resting heart rate[J]. Am J Hum Genet，2002；70(4)：935－942.

[3] Mason DA，Moore JD，Green SA，et al. A gain－of－function polymorphism in a G－protein coupling domain of the human beta1－adrenergic receptor[J]. J Biol Chem，1999；274(18)：12670－12674.

[4] Sachidanandam R，Weissman D，Schmidt SC，et al. A map of human genome sequence variation containing 1. 42 million single nucleotide polymorphisms[J]. Nature，2001；409：926－933.

[5] NG PC，Henikoff S. Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function，genome research[J]. 2002；80(7)：412－422.

[6] Mount DW. Bioinformatics[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press，2001；387－388.