

# NIDDM 新候选基因 *KCNA7* 的 cSNP 在东北人群中的分布及意义

丁 茜, 赵彦艳, 董凌月, 孙志军, 郭 磊

(中国医科大学医学遗传学教研室, 沈阳 110001)

**摘要:**为研究 NIDDM 新候选基因 *KCNA7* 的 cSNP 在东北人群中的分布及意义, 本实验采用 PCR-RFLP 技术检测了 97 例 NIDDM 患者、141 例健康对照者 *KCNA7* 基因 T418M(C/T) 多态; 并利用 SSCP 技术筛查了该位点附近其他未知 SNP。发现 *KCNA7* 基因 T418M(C/T) 基因型频率在正常人群中分布符合 Hardy-Weinberg 平衡, 基因频率和基因型频率在 NIDDM 组和正常对照组中分布无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); NIDDM 组和正常对照组中各基因型间临床生化指标无显著性差异; 该位点附近尚未发现其他 SNP。结果提示, T418M(C/T) 仅为 *KCNA7* 基因多态性标志, 但不排除 *KCNA7* 基因其余结构变异与 NIDDM 存在相关性的可能。

**关键词:** *KCNA7* 基因; NIDDM; 单核苷酸多态性

中图分类号: Q347

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2003)02-0129-04

## Distribution and Significance of cSNP in *KCNA7* Gene as a Novel NIDDM Candidate Gene in the Population of Northeast China

DING Qian, ZHAO Yan-Yan, DONG Ling-Yue, SUN Zhi-Jun, GUO Lei

(Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, China)

**Abstract:** To investigate the distribution and significance of a coding single nucleotide polymorphism (cSNP) of the novel NIDDM candidate gene, *KCNA7* in the population of Northeast China, 97 patients with NIDDM and 141 controls were tested. Genotypes of *KCNA7* gene T418M(C/T) were performed by PCR-RFLP, and SSCP was used to detect other unknown variations near the C/T site of *KCNA7* gene. As a result, no significant difference was observed in the distribution of genotypes of T418M(C/T) between NIDDM and control group. Clinical biochemical examinations showed no significant difference between genotypes in both INDDM and control group, and no other SNPs were found near the C/T site of *KCNA7* gene. This study demonstrates the frequency of this cSNP complies well with the Hardy-Weinberg equilibrium in normal group, T418M(C/T) is only a polymorphic maker of *KCNA7* gene, and the possibility of association between NIDDM and *KCNA7* can not be excluded.

**Key words:** *KCNA7* gene; NIDDM; single nucleotide polymorphism

NIDDM(非胰岛素依赖性糖尿病)又称 2 型糖尿病, 是一种高度异质性的多基因遗传病, 并且受到环境因素的影响。随着人类基因组计划的开展, 其相关基因的定位和识别已成为目前的研究热点。研究发现, 人胰岛素基因及线粒体基因突变与糖尿病

的发生密切相关<sup>[1,2]</sup>。迄今为止, NIDDM 的候选基因已超过百余种<sup>[3]</sup>, 如脂类代谢基因、葡萄糖代谢基因及影响胰岛素释放基因等, 钾离子通道蛋白基因也是其中的一类。钾离子通道的关闭可以使细胞膜去极化, 钙离子通道开放, 进而引发胰岛素的释

收稿日期: 2002-05-16; 修回日期: 2002-09-20

基金项目: 国家九七三项目(G19980510)、国家自然科学基金(39970411)及教育部高等学校骨干教师资助项目([2000]65号)

作者简介: 丁 茜(1975-), 女, 汉族, 辽宁省沈阳市人, 硕士生, 现从事分子遗传学研究

通讯作者: 赵彦艳(1960-), 女, 教授, 博导, 专业: 遗传学。电话: 024-23256666-5326, E-mail: yany-zhao@hotmail.com

放<sup>[4,5]</sup>。人类 *KCNA7* 基因 (Voltage-gated potassium channel- $\alpha$ , member7) 是新克隆的钾离子通道蛋白家族基因中的成员, 定位于人染色体 19q13.3, cDNA 全长为 2031bp, 有两个外显子<sup>[6]</sup>。在本实验中, 利用 NCBI 信息库提供的资料, 在 *KCNA7* 编码区找到一个 cSNP, 即 T418M(C/T)。选取中国东北健康人群和 NIDDM 患者, 应用 PCR-RFLP 基因型分析, 对正常人和 NIDDM 患者的 *KCNA7* 基因进行病例对照研究, 并结合各项生化指标, 鉴定 *KCNA7* 基因 T418M(C/T) 多态性与 NIDDM 的相关性; 并且应用 SSCP 方法, 在 *KCNA7* 外显子中寻找其余未知 SNP, 以确定 *KCNA7* 基因的 cSNP 在东北人群中的分布及意义。

## 1 材料与 方法

### 1.1 研究对象

正常对照组: 东北地区健康个体 141 例, 其中男 83 例, 女 58 例。平均年龄为  $55 \pm 5.4$  岁, 经询问病史, 体检, 及辅助检查排除糖尿病及高血压病史。糖尿病患者组: 97 例, 其中男 51 例, 女 46 例。平均年龄  $53.4 \pm 3.5$  岁, 均为中国医科大学第一、二临床医院 2001 年 7 月至 2002 年 2 月门诊及住院的 2 型糖尿病患者。诊断的标准参照 1997 年美国糖尿病学会 (ADA) 推荐的标准。

### 1.2 研究方法

#### 1.2.1 *KCNA7* 基因 cSNP 选择

将 GenBank 提供的 *KCNA7* 基因 cDNA 序列通过 BLAST 软件与 NCBI 信息库中的 EST、基因组 DNA 进行同源序列比较, 从中寻找 cSNP 位点。 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn/nr>)

#### 1.2.2 引物及酶切位点设计

全部引物设计均由在线软件 Primer3 (<http://www.genome.wi.mit.edu>) 完成, 上海生工生物工程公司合成。PCR-RFLP 引物: 上游为 5' TCCT-GAGAGTCATCCGATTGG3', 下游为 5' CACT-TCGGTGACCAGGTGTTT3'; PCR-SSCP 引物: 上游为 5' TCCTGAGAGTCATCCG ATTGG3', 下游为 5' GTGGGCTCTCTGTGTGCCATTGC3'。酶切位点设计网址 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>)。

#### 1.2.3 DNA 提取和 *KCNA7* 基因型检测

(1) 取外周血 5ml, 1.8% 柠檬酸钠抗凝, 常规饱和氯化钠法抽提基因组 DNA,  $-4^{\circ}\text{C}$  保存备用。(2)

PCR 扩增: PCR 反应总体积  $25\mu\text{L}$ , 其中模板 DNA  $20 \sim 50\text{ng}$ ,  $1 \times$  缓冲液,  $\text{MgCl}_2$   $1.5\text{mmol/L}$ , *Taq* 酶 1U, 引物各为  $10\text{pmol/L}$ , dNTP 为  $200\text{mmol/L}$ , 双蒸水  $16.5\mu\text{L}$ , PCR 扩增反应在 GeneAmpPCR9600 上进行, 扩增参数为:  $95^{\circ}\text{C}$  变性 3min, 按  $94^{\circ}\text{C}$  变性 45s,  $58^{\circ}\text{C}$  退火 45s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 45s 的条件, 30 个循环, 最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 7min。(3) PCR 产物酶切: 取 PCR 产物  $10\mu\text{L}$  在 20 体系中, 加入 1.5U 限制酶 *NspI* (NEB),  $37^{\circ}\text{C}$  过夜消化后, 样品经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳 45min, 电压 100V, 凝胶成像系统观察电泳结果。(4) 结果测定: 纯合子 CC 出现 542bp 1 条带, 纯合子 TT 出现 428bp 和 114bp 2 条带, 杂合子 CT 出现 542bp、428bp、114bp 3 条带, 用 100bp ladder 做 DNA 片段的标准参照物, 结果见图 1。

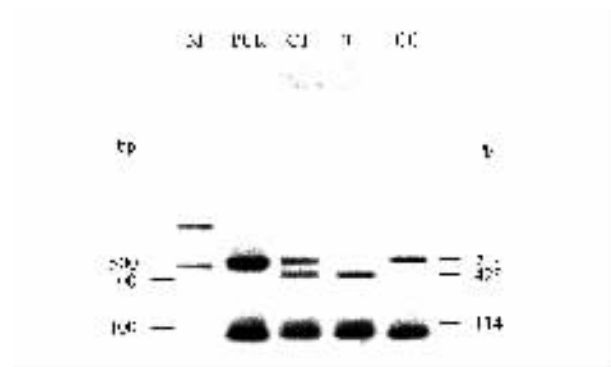


图 1 PCR 扩增的 *KCNA7* 基因片段经 *NspI* 限制酶酶切的琼脂糖凝胶电泳结果

M: 100bp ladder 分子质量标记; PCR: PCR 扩增产物。

Fig. 1 The RFLPs of PCR-amplified fragments of *KCNA7* obtained using *NspI* and subjected to agarose gel electrophoresis.

M: 100bp ladder marker; PCR: product of PCR.

#### 1.2.4 PCR-SSCP

(1) PCR 扩增: 反应体系及扩增参数同前。(2) 上样前标本处理: 取 10mL 待测 PCR 扩增产物, 加入等量变性液 (95% 甲酰胺, 0.5% 溴酚蓝, 0.5% 二甲苯氰蓝), 于  $98^{\circ}\text{C}$  变性 10min 后, 冰浴冷却。(3) 电泳条件: 400V 稳压, 电流  $70 \sim 90\text{mA}$ , 功率:  $20 \sim 30\text{W}$  电泳 6h。电泳系统温度控制在  $10^{\circ}\text{C}$ 。(4) 银染: 蒸馏水洗胶后于 10% 乙醇和 3% 乙酸中固定 15min, 清洗两遍后于 0.2%  $\text{AgNO}_3$  中染色 15min, 以  $\text{ddH}_2\text{O}$  洗涤 3 次, 以 1.5%  $\text{NaOH}$  和 0.36% 甲醛显色, 直至条带清晰后观察。

### 1.3 其他生化检测

被检者均经 12h 禁食抽取外周血, 进行血糖、血脂、血清钾、钠、钙、铁等指标检测。

### 1.4 *KCNA7* 基因型和等位基因频率的统计学分析

计算每组 *KCNA7* 基因型和等位基因频率, 经 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验各基因型和等位基因频率已达遗传平衡, 具有群体代表性, 利用 SAS 软件进行方差分析。对照组和 NIDDM 组基因型频率和等位基因频率差异用卡方检验, 各种生

化技术资料用 *t* 检验。

## 2 结 果

### 2.1 *KCNA7* 基因 T418M(C/T) 多态分布

通过 BLAST 软件发现 *KCNA7* 基因编码区惟一个 cSNP, 即 T418M(C/T)。该 cSNP 在正常人群和 NIDDM 患者中的多态分布如图 1。相关分析显示 *KCNA7* 基因 T418M(C/T) 在正常人和 NIDDM 两组中的差异无显著性(见表 1)。

表 1 正常对照组与 NIDDM 组 *KCNA7* 基因 T418M(C/T) 多态分布比较

Table 1 Comparison of *KCNA7* Gene T418M(C/T) polymorphism between control group and NIDDM group

人群	基因型频率			等位基因频率	
	CC	CT	TT	C	T
正常人	17(0.121)	53(0.376)	71(0.503)	0.309	0.691
NIDDM	8(0.082)	46(0.474)	43(0.443)	0.320	0.680
$\chi^2 = 2.56$			$P > 0.05$		

### 2.2 *KCNA7* 基因 T418M(C/T) 多态与临床生化指标的关系

检测正常人群和糖尿病人中的血压、血脂, 血糖和血清离子水平, 由表 2、表 3 可见。两组中 *KCNA7* 基因 T418M(C/T) 不同基因型间临床资料无明显差异性。

表 2 正常对照组不同基因型之间各种临床参数的比较

Table 2 Comparison of clinical parameters between different genotypes in control group

临床参数	基因型		
	CC+CT	TT	P
收缩压(mmHg)	116.79±21.47	122.34±20.54	>0.05
舒张压(mmHg)	74.62±17.84	72.35±16.03	>0.05
胆固醇(mmol/L)	4.76±1.05	4.24±1.20	>0.05
甘油三酯(mmol/L)	1.77±0.96	1.69±0.75	>0.05
高密度脂蛋白(mmol/L)	1.62±0.71	1.63±0.60	>0.05
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.77±0.79	2.91±0.55	>0.05
血糖(mmol/L)	4.73±0.98	4.97±1.01	>0.05
血清铁( $\mu\text{mol/L}$ )	15.31±6.83	15.72±7.07	>0.05
血清钙( $\mu\text{mol/L}$ )	2.41±0.15	2.76±0.82	>0.05
血清钠( $\mu\text{mol/L}$ )	139.75±6.34	141.08±8.33	>0.05
血清钾( $\mu\text{mol/L}$ )	4.33±0.47	4.14±0.39	>0.05

### 2.3 *KCNA7* 基因 SSCP 分析结果

正常对照组和 NIDDM 组在 T418M(C/T) 附近均未发现其他序列变异。

表 3 NIDDM 组不同基因型之间各种临床参数的比较

Table 3 Comparison of clinical parameters between different genotypes in NIDDM group

临床参数	基因型		
	CC+CT	TT	P
收缩压(mmHg)	142.87±23.34	140.19±23.11	>0.05
舒张压(mmHg)	87.55±14.66	84.19±15.87	>0.05
胆固醇(mmol/L)	5.47±1.33	5.74±1.52	>0.05
甘油三酯(mmol/L)	2.38±0.89	2.17±0.83	>0.05
高密度脂蛋白(mmol/L)	1.45±0.56	1.51±0.69	>0.05
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.68±0.92	2.57±0.88	>0.05
血糖(mmol/L)	11.11±2.01	12.04±1.85	>0.05
血清铁( $\mu\text{mol/L}$ )	16.02±7.03	18.20±6.77	>0.05
血清钙( $\mu\text{mol/L}$ )	2.37±0.16	2.15±0.17	>0.05
血清钠( $\mu\text{mol/L}$ )	142.03±7.90	144.37±9.51	>0.05
血清钾( $\mu\text{mol/L}$ )	4.21±0.36	4.04±0.26	>0.05

## 3 讨 论

钾离子通道家族是离子通道超家族中最大的亚家族, 该家族成员在细胞信号传导中具有重要功能, 包括调节神经递质释放、心率、神经元兴奋、上皮电解质运输、平滑肌收缩和胰岛素分泌<sup>[7]</sup>。关于钾离子通道的基因突变与疾病的相关性不断有报道, 如婴儿持续性高胰岛素血症、心脏长 QT 综合征、大脑变性、运动失调症等<sup>[8]</sup>。有研究表明, 钾离子通道能在葡萄糖诱导的胰岛素快速分泌相特异性地调节  $\beta$

细胞每个动作电位后的膜电位复极;钙离子浓度、ATP 对钾离子通道有调节作用<sup>[4,5]</sup>,因此可以推断,钾离子通道具有调节胰岛功能的特性,该家族的相关基因可以作为 NIDDM 的一类候选基因。

KCNA7 是新克隆的钾离子通道基因家族成员之一,人类 KCNA7 基因被定位在 19q13.3,该区域被认为是 NIDDM 的易感位点<sup>[9]</sup>。动物实验研究表明,小鼠 KCNA7 基因在胰岛细胞和周围腺泡有表达,这不同于 KCNA3.4 基因,只在腺泡表达<sup>[10]</sup>,提示 KCNA7 基因与胰岛细胞功能更密切,可能与 NIDDM 发生、发展有一定关系。有鉴于此,我们从 KCNA7 基因结构变异入手,试图揭示该基因的功能与 NIDDM 的相关性。

cSNP 是编码序列的单核苷酸多态,使氨基酸序列改变的 cSNP 中 20%~30% 会影响蛋白质功能<sup>[11~13]</sup>,应用候选基因的 cSNP 进行像 NIDDM 这类多基因疾病的相关分析,可以定位和识别众多基因中的几个主基因,通过 NCBI 信息库对 KCNA7 基因的 cDNA、EST 和基因组 DNA 进行了同源序列比较,发现了惟一一个 cSNP 位于第二外显子,由于 C 被 T 代替,使第 418 个氨基酸由苏氨酸(T)变成了甲硫氨酸(M),根据 primer3 设计引物和限制性酶切位点变化,建立了 KCNA7 基因的 PCR-RFLP 方法,首次对中国东北人群的这一位点进行多态分布报道,为了证明 NIDDM 与 KCNA7 基因的 T418M(C/T)相关性,我们比较了病人组和对照组的 C/T 多态的基因频率和基因型频率,以及其与主要临床生化指标的关系,其结果显示无统计学意义。由于高密度的 SNP 被认为是一种能稳定遗传的早期突变,它们之间存在着连锁不平衡,因而我们试图通过 SSCP 方法在该基因的编码序列筛查其他 SNP,以便进一步进行单体型分析。虽然未查到,尚不能排除由于 SSCP 技术的灵敏性造成的漏查,也不能排除该基因编码区上下游调控序列存在 SNP;因此,对 KCNA7 基因结构深入研究及其表达调控和信号传导研究的开展,将有助于揭示 KCNA7 基因的功能和在 NIDDM 发生发展中的作

用。

## 参 考 文 献 (References):

- [1] 曹月青,周玲,韩柱,等.人胰岛素基因在体内外表达的研究[J].遗传,2002,24(4):407~409.
- [2] 周晓雷,张丽珊,黄鹰,等.线粒体基因突变与 NIDDM 发生的关系[J].遗传,1997,19(2):5~8.
- [3] Ghosh, Schork N J, *et al.* Genetics analysis of NIDDM—the study of quantitative traits[J]. Diabetes, 1996, 45: 1~14.
- [4] Smith P A, Ashcroft F M, Rorsman P. Simultaneous recordings of glucose dependent electrical activity and ATP-regulated K (+) — currents in isolated mouse pancreatic beta-cells[J]. FEBS Lett, 1990, 261(1): 187~190.
- [5] Roe M W, Worley J F 3rd, Mittal A A, *et al.* Expression and Function of Pancreatic  $\beta$ -Cell Delayed Rectifier K<sup>+</sup> Channels [J]. J Biol Chem, 1996, 271: 32241~32246.
- [6] Kashuba V I, Kvasha S M, Protopopov A I, *et al.* Initial isolation and analysis of the human *Kvl. 7* (KCNA7) gene, members of the voltage-gated potassium channel gene family[J]. Gene, 2001, 268(1-2): 115~122.
- [7] Shier C, *et al.* Potassium channels; molecular defects, disease, and therapeutic opportunities[J]. Pharmacol Rev, 2000, 52: 557~593.
- [8] Dukes I D, Philipson L H, *et al.* K<sup>+</sup> channels; generating excitement in pancreatic beta-cells[J]. Diabetes, 1996, 45: 845~853.
- [9] Mein C A, Esposito L, *et al.* A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom[J]. Nat Genet, 1998, 19: 297~300.
- [10] Katalin Kalman, Angela Nguyen, Julie Tseng-Crank, *et al.* Genomic Organization, Chromosomal Localization, Tissue Distribution, and Biophysical Characterization of a Novel Mammalian Shaker-related Voltage-gated Potassium Channel, *Kvl. 7*[J]. J Biol Chem, 1998, 273(10): 5851~5857.
- [11] Chasman D, Adams R M. Predicting the functional consequences of not-synonymous single nucleotide polymorphisms: structure-based assessment of amino acid variation[J]. JMB, 2001, 307: 683~706.
- [12] Sunyaev S, Ramensky V, Koch I, *et al.* Prediction of deleterious human alleles[J]. Hum Mol Genet, 2001, 10: 591~597.
- [13] Ng P C, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions[J]. Genome Res, 2001, 11: 863~874.