

文章编号:1004 - 616X(2001)02 - 0105 - 04

论著 ·

等位基因特异 PCR 检测 N-乙酰化转移酶遗传多态性研究

杨明晶¹, 郑伟娟², 奚清丽¹, 金振国¹

(1. 江苏省职业病防治研究所生化免疫研究室, 江苏 南京 210028; 2. 南京大学生物化学系, 江苏 南京 210008)

摘要:目的与方法:改良一种适用于流行病学研究的 N-乙酰化转移酶(NAT2)基因型的等位基因特异 PCR(AS-PCR)检测方法, 分析了 3 个 NAT2 基因突变点:481 T、590 A、857 A,并用此法对 76 例南京地区健康人群的 NAT2 基因型多态性进行了研究。从而也检验了该方法。结果:该人群中各基因频率:Wt(野生型)为 0.5723;481 T 为 0.0395;590 A 为 0.2368;857 A 为 0.1513。与白种人比较差异有显著性,而与文献报道的亚州人群频率分布特征基本一致。结论:南京地区健康人群中与快反应相关的 NAT2 基因型占多数(82.9%);本文改良的 AS-PCR 检测方法经验证为 NAT2 基因多态性研究的有效实验手段。

关键词:等位基因特异 PCR;遗传多态性;N-乙酰化转移酶

中图分类号:Q346.5

文献标识码:A

MOLECULAR ANALYSIS OF ARYLAMINE N-ACETYLTRANSFERASE POLYMORPHISM BY ALLELE SPECIFIC PCR

YANG Ming-jing¹, ZHENG Wei-juan², XI Qing-li¹, JIN Zhen-guo¹

(1. Department of Biochemistry and Immunology, Jiangsu Institute of Occupational Medicine, Nanjing 210028, China; 2. Department of Biochemistry, Nanjing University, Nanjing 210008, China)

收稿日期:2000-06-06;修订日期:2000-10-22

作者简介:杨明晶(1968-),女,江苏省南通市人,主管技师,生化学学士,主要从事流行病学的分子生物学研究。

岸居民的健康。涑水河污水处理蚕豆和大蒜根尖细胞微核率均值的相关分析结果($t = 0.9503, n = 5, v = n - 2 = 3, P < 0.01$),以及井水处理蚕豆和大蒜根尖细胞微核率均值的相关分析结果($r = 0.8790, n = 5, v = n - 2 = 3, P < 0.025$),均显示大蒜根尖细胞微核试验和蚕豆根尖细胞微核试验在遗传毒物的检测上具有很高的 consistency。

我们在试验过程中发现,用沙盘法培养蚕豆根尖,可有效防止蚕豆的霉烂,且根尖生长快、发育好。解离是该试验成败的主要原因之一,根尖解离充分,才能使 DNA 分子上的脱氧核糖释放出足够的能与 Feulgen 试剂反应形成紫红色复合物的反应性醛基⁵。大蒜为须根植物,须根数量多、易培养、压片效果较好。因此,大蒜根尖细胞微核试验比蚕豆根尖细胞微核试验技术更为简便易行。但本试验中大蒜微核试验的敏感性较蚕豆稍低,这可能与其本身具有修复染色体损伤及 DNA 错误复制的功能有关⁶。

我们认为,对不同品种的大蒜进行微核试验比较研究,并对其敏感品种进行培育将是有意义的。

参考文献:

- 1 王福林,丁恬,许百全,等.用于灌溉的污染河水对生物细胞遗传损伤的研究J.环境与健康杂志,1996,13(6):241~243.
- 2 戴敏,吴琼,周心一,等.应用蚕豆根尖及叶尖细胞微核技术检测 TNT 及车间空气的诱变性J.癌变·畸变·突变,1995,7(1):58~61.
- 3 钟远,封少龙,苏庆,等.应用蚕豆根尖微核技术和彗星试验监测扬中地表水遗传毒物污染的研究J.癌变·畸变·突变,2000,12(1):18~23.
- 4 朱志义,孔志明,钱卫,等.铅诱发不同品种蚕豆根尖细胞微核形成的比较观察J.镇江医学院学报,1995,5(1):17~18.
- 5 窦桂荣,傅淑丽,张宏新.蚕豆根尖细胞微核试验技术的应用J.河南肿瘤学杂志,1992,5(4):20~21.
- 6 陈少华,洪振丰,林丽,等.大蒜对环磷酸腺苷诱发的小鼠骨髓细胞微核和姊妹染色单体交换的保护作用J.遗传,1992,14(2):16~17.

Abstract: Purpose and Methods: Allele-specific PCR (AS-PCR) was modified to identify the genotype of N-acetyltransferase (NAT2). Three mutations at the NAT2 gene locus, namely, 481 T, 590 A, 857 A were analyzed. We used the method to investigate the frequency of various genotypes of NAT2 in 76 unrelated Nanjing persons, and the method was tested also. **Results:** In the population the gene frequencies of Wt, 481 T, 590 A, and 857 A were 0.5723, 0.0395, 0.2368, 0.1513, respectively. The frequencies for NAT2 mutations were significantly different from those of Whites, and were similar to those of Asian populations reported. **Conclusion:** The prevalence of the genotype associated with rapid acetylation among Nanjing people was 82.9%, and was proved that the modified AS-PCR is useful in acetylator polymorphism studies.

Key words: allele-specific PCR; polymorphism; N-acetyltransferase

N-乙酰化转移酶(N-acetyltransferase; NAT2)是药物、食品添加剂、工业化合物以及其他含氮外源性化合物在体内代谢生物转化的重要酶系。人群中 NAT2 受 1 对基因的控制,分为快反应和慢反应两种表型。前者属于常染色体显性遗传,后者属于常染色体隐性遗传,无明显后天诱导性,故个体基因型稳定¹⁻³。

NAT2 的多态性具有显著的种族和地区差异,东方亚洲人以快型为主(>70%)²,而西方白种人以慢型为主(>53%)⁴。NAT2 活性的个体差异可以影响芳香胺类药物的治疗功效和副作用的强弱,更重要的是 NAT2 的活性状况可影响机体对芳香胺类化合物致癌的敏感性。例如:慢型与膀胱癌、肝癌有关;快型与肠癌、乳腺癌有关³。另外 NAT2 的基因多态性与各类疾病如糖尿病、系统性红斑狼疮^{5,8}、帕金森病的早年发作具有相关性⁹。

表型检测方法中判断快慢型的界值是乙酰化率达 80%¹,高于 80%为快型,低于 80%为慢型。这样杂合子(Rr)就难以区分。另外表型检测也难以完全排除机体内其他因素的干扰。因此需要对 NAT2 的多态性进行基因定型分析。

人类 NAT2 基因含有 870 碱基对,均为编码蛋白区域。快反应基因型为野生型,无碱基突变。人群中 NAT2 为多位点突变¹⁰。目前发现的 NAT2 基因点突变位点已有 10 多种,但在白种人和亚洲人中出现频率较高的集中为 6 种⁴。已经分子克隆证实为:282(C T)、341(T C)、481(C T)、590(G A)、803(A G)、857(G A)。这些含突变的基因型中,乙酰化酶的活性降低了。大量研究⁴⁻⁷又发现上述 6 种点突变有着特定的关联现象。Henry⁴提出通过检测 481 T、590 A、857 A 3 个突变位点就基本上可以检测出所有亚洲人和白种人群中的乙酰化慢基因型(检出率为 95%),由此大大简化了等位基

因特异 PCR 方法对 NAT2 的遗传多态性的研究,使该方法用于大规模的流行病学调查成为可能。

本文在对 Henry 的方法进行了适当改变的基础上,建立了一套稳定、方便的 NAT2 基因型检测方法,并用于检测了南京地区 76 例健康人群 NAT2 基因型标本。所得结果与其他种族的检测结果进行了比较,发现 NAT2 基因型存在显著的种族差异。

1 材料与方法

1.1 样本来源及处理 76 例样本来自无亲缘关系的健康人群,年龄 25 岁~56 岁。取静脉血 0.5 ml,肝素抗凝,滴于干净的滤纸上,经甲醇固定后-20 保存。PCR 反应时剪出 1 mm ×2 mm 的血斑纸片加入反应管,即可作为模板。

1.2 引物设计 6 对引物(见表 1)用于检测 481、590 和 857 3 个位点的突变情况,扩增产物长度分别为 217 bp、339 bp 和 286 bp。1 个位点 2 对引物,其中 2 条是重复的,另 2 条仅在 3'末端的 1 个碱基不同,它们分别对应于野生型和突变型。只有当样本 DNA 与引物的 3'末端完全配对时 PCR 才有扩增产物,否则电泳时就见不到扩增条带。每个被检血样分别做 6 个 PCR,由此得出在上述 3 个位点上为何种碱基,从而确定其基因型。

1.3 PCR PCR 试剂主要来自上海 Promega 公司,包括缓冲液、MgCl₂、Taq 聚合酶、dNTPs 等。PCR 总反应体积为 25 μl,每条引物浓度 1 μmol/L, MgCl₂ 浓度 1.5 mmol/L。为探讨等位基因 PCR(AS-PCR)的最佳条件,dNTPs 分别设为 40 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L;纸斑面积设为 1 mm ×1 mm、1 mm ×2 mm、2 mm ×2 mm、3 mm ×3 mm。取 1 已知基因型为 481 CC、590 GA、857 GA 的血样做模板进行 PCR 反应,95 预变性 15 min 85 10 min,此时加入 1 IU Taq 聚合酶 55 退火 1 min 72 延伸 3 min

表 1. 等位基因特异性 PCR 扩增 NAT2 基因的引物
Table 1. Allele-specific primer pairs for amplifying the NAT2 gene

set	5 primer		3 primer		length (bp)
481	ACMFL	ACATCCCTCCAGTTAAC	ACM1W-R	CTCCTGATTTGGTCCAG	217
(C T)	ACM1-L	ACATCCCTCCAGTTAAC	CM1V-R	CTCCTGATTTGGTCAA	217
590	ACM2W-L	TTTACGCTTGAACCTCG	ACM2-R2	TGGGTGATACA TACACA	339
(G A)	ACM2V-L	TTTACGCTTGAACCTCA	ACM2-R2	TGGGTGATACA TACACA	339
857	ACM3W-L	CCAAAACCTGGTGATGG	ACM3-R	CACTCTGCTTCCCAAGAT	286
(G A)	ACM3V-L	CCAAAACCTGGTGATGA	ACM3-R	CACTCTGCTTCCCAAGAT	286

30 个循环(94 1 min,56 1 min,72 2 min) 72 延伸 7 min。其中为提高 AS-PCR 的特异性,退火温度试验过 53、55、56、58 和 60。
1.4 PCR 产物的检测 取 10 μl 扩增产物于 1.5% 琼脂糖(含 EB 0.5 μg/ml)中电泳,电压 120 V,1 h,紫外灯下观察、摄影。

2 结果与讨论

2.1 AS-PCR 方法的影响因素 不同浓度的 dNTPs 及模板大小对检测 NAT2 遗传多态性的 AS-PCR 均有影响。PCR 体系中,dNTPs 为 100 μmol/L,模板大小为 1 mm × 2 mm 时,AS-PCR 扩增效果最好。dNTPs 浓度过低和模板量太小都会影响 PCR 扩增产量,使电泳条带不明亮。当 dNTPs 浓度再提高到

200 μmol/L 时,PCR 结果无明显改变,故取 100 μmol/L 为宜。模板量过大时,会出现非特异性扩增,甚至会抑制特异性扩增。在逐渐提高退火温度的试验中发现,3 个位点的引物的最适退火温度不同。为保证所有位点上的 PCR 的灵敏度和特异性,最终选取了 56 为共同的退火温度。这样建立起的一套实验方法在以下几点上对 Henry 的方法作了改进:模板量由 1 mm × 1 mm 提高到 1 mm × 2 mm; dNTPs 浓度由 40 μmol/L 提高到 100 μmol/L; 退火温度由 53 提高到 56; 反应缓冲液直接用 Taq 聚合酶的常用 1 ×buffer(可随酶买到); Taq 聚合酶由 0.25 IU 提高到 1 IU。后 2 点主要是针对基层工作的具体条件而做的修改,这样可以减少因试剂质量及称量配制不准而导致的实验误差。

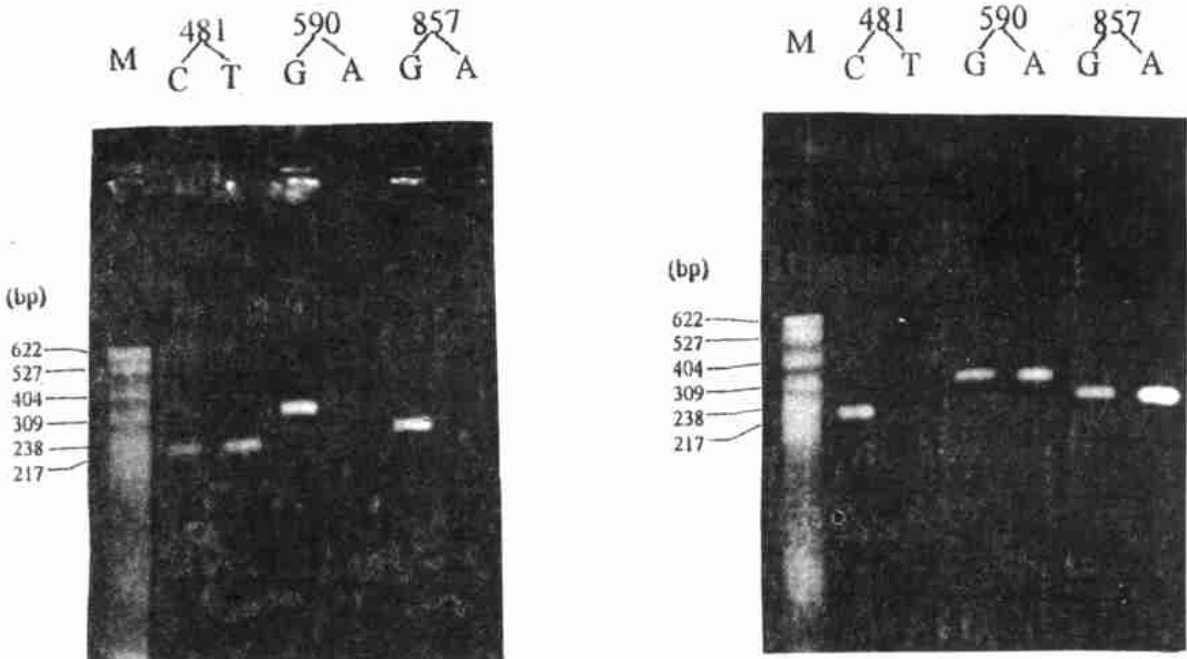


图 1. 等位基因 PCR 及琼脂糖凝胶电泳法检测 NAT2 基因型

Figure 1. Detection of nucleotides at position 481(C or T), 590(G or A), and 857(G or A) of the NAT2 gene by use of AS-PCR and gel electrophoresis. Lane M(A,B) Molecular-weight markers(PBR322 DNA/ MSP I markers) A: 481 C and T, 590 G only, 857 G only B: 481 C only, 590 G and A, 857 G and A.

2.2 用改良的 AS-PCR 方法对南京地区 76 例健康人群进行了 NAT2 的基因型检测,AS-PCR 可清楚地判定 NAT2 的各种等位基因型(见图 1)。76 例标本中各种等位基因型的频率见表 2,所得结果均经 2 次或 2 次以上重复实验。我们共做了 800 多管 PCR 反应,每个样品分别在 481、590、857 位点上都有阳性结果,说明相应区域未发生片断缺失。另外也未发现一份样品中在上述位点含有 3 个或 3 个以上的突变碱基。以上两点与文献报道相符^{4~7}。

表 2. 南京地区 76 例健康人群 NAT2 基因型分布

Table 2. NAT2 genotype in 76 unrelated healthy Nanjing subjects as stated by allele-specific PCR amplification

genotype	No.	frequency (%)	
Wt/ Wt	24	31.58	RR
Wt/ 481 T	4	5.26	Rr
Wt/ 590 A	21	27.63	Rr
Wt/ 857 A	14	18.42	Rr
481 T/ 590 A	1	1.32	rr
481 T/ 857 A	1	1.32	rr
590 A/ 590 A	5	6.58	rr
590 A/ 857 A	4	5.26	rr
857 A/ 857 A	2	2.63	rr

Wt, Wild-Type (NAT2 alleles lacking mutations at 481 T, 590 A or 857 A); R, functional allele; r, defective allele.

慢型点突变基因频率 $r = (39 + 13 \times 2) / (76 \times 2) = 0.4276$, 通过 Hardy-Weinberg Law 计算出 RR、Rr、rr 的理论值(见表 3)。

表 3. 76 位南京健康职工 NAT2 基因型分布与理论推测值比较

Table 3. Observed and expected numbers of NAT2 genes in 76 Nanjing subjects

	RR	%	Rr	%	rr	%
Expected	25	32.77	37	48.95	14	18.28
Observed	24	31.58	39	51.31	13	17.11

$\chi^2 = 0.1777, P > 0.90$

由表 3 见实际值与理论值相当吻合 ($\chi^2 = 0.1777, P > 0.90$), 说明实验结果具有群体代表性和实验方法的可靠性。

2.3 南京地区与部分欧洲、亚洲地区人群 N-乙酰化酶基因型的比较 南京地区人群 NAT2 突变频率 (0.43) 显著低于美国白种人 (0.74)⁴、波兰人

(0.72)⁵。西班牙人 (0.67)⁶、土耳其人 (0.72)⁷, 而与香港人 (0.52)⁴、南朝鲜人 (0.34)⁴ 相似。另外南京地区人群 NAT2 基因在 481 位点的突变率明显低于欧洲人,且未发现 481 点突变的纯合子,在 857 位点的突变率又显著高于欧洲人而与亚洲人的结果类似。这与报道所称 857 位点突变为东方人特征性突变相符^{4~7}。基因型检测出的快慢型分布进一步验证了表型检测² 得出的结论:南京地区人群 NAT2 多态性以快型为主。

本文报道的检测 NAT2 基因多态性的 AS-PCR 方法,只需 1 滴血就可检测出样本的基因型,且方法简便。这种方法可筛选出人群中 95% 的 NAT2 慢型。这为肿瘤易感基因的流行病学研究提供了有效手段。

参考文献:

- 徐玉辉,杨明晶,奚清丽,等. 氮乙酰化转移酶多态性表型检测方法的探讨和应用J. 癌变 畸变 突变,1999,11(1):49~51.
- 凌敏,徐玉辉,任俊霞,等. 南京地区中学生 N-乙酰化转移酶表型多态现象和基因频率的研究J. 遗传与疾病,1991,8(2):113~114.
- 凌敏,文跃进,徐玉辉,等. 肝癌病人的氮-乙酰化酶多态性研究J. 癌变 畸变 突变,1994,6(6):1~3.
- Lin HJ, Han CY, Hardy S, et al. Slow acetylator mutations in the human polymorphic N-acetyltransferase gene in 786 Asians, blacks, Hispanics, and Whites: Application to metabolic epidemiologyJ. Am J Hum Genet, 1993,52(4):827~834.
- Mrozikiewicz PM, Cascorbi I, Brockmoller J, et al. Determination and allelic allocation of seven nucleotide transitions within the arylamine N-acetyltransferase gene in the Polish populationJ. Clin Pharmacol Ther, 1996,59(4):376~382.
- Agundez JA, Martinez C, Olivera M, et al. Molecular analysis of the arylamine N-acetyltransferase polymorphism in a Spanish populationJ. Clin Pharmacol Ther, 1994,56(2):202~209.
- Aynacioglu AS, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, et al. Arylamine N-acetyltransferase(NAT2) genotypes in a Turkish populationJ. Pharmacogenetics, 1997,7(4):327~331.
- Zielinska E, Niewiarowski W, Bodalski J. The arylamine N-acetyltransferase(NAT2) polymorphism and the risk of adverse reactions to cotrimoxazole in childrenJ. Eur J Clin Pharmacol, 1998,54(9-10):779~785.
- Agundez JA, Jimenez-Jimenez FJ, Luengo A, et al. Slow allotypic variants of the NAT2 gene and susceptibility to early-onset Parkinson's diseaseJ. Neurology, 1998,51(6):1587~1592.
- Blum M, Demierre A, Grant DM, et al. Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humansJ. Proc Natl Acad Sci USA, 1991,88(12):237~241.