

用TaqmanMGB探针研究中国人群TNF- α 基因 启动子区单核苷酸多态性

庾 蕾, 庄志雄, 谢富焕, 黄海雄, 叶小明

(深圳市疾病预防控制中心食品/毒理科, 广东 深圳 518020)

摘 要:【目的】了解中国人群肿瘤坏死因子 (the tumour necrosis factor, TNF- α) 基因启动子区多态性。【方法】随机选取 20 名深圳地区汉族健康体检者, 采用两对引物 PCR 扩增 TNF- α 基因启动子区 (-1389 nt ~+125 nt), 对 PCR 产物进行序列分析, 寻找单核苷酸多态性位点 (single nucleotide polymorphisms, SNPs)。采用 Taqman MGB 探针建立了 -857nt(C/T)位点的实时定量 PCR(the real-time PCR)分型方法, 并对中国汉族、壮族、布依族、水族及苗族群体共 1 108 份样本进行了基因分型。【结果】在启动子区 (-1322nt ~+67 nt), 发现 6 个 SNP 位点, 即 -885(A/G)、-863(C/A)、-646(G/A)、-648(G/A)、-568(G/C)和 -857(C/T), 其中位点 -646 nt (G A) 为新发现 SNP。-885、-648 及 -568nt 位点碱基虽然与 Genbank 不同, 但测序的 20 个个体基因分型相同。中国人群 -857nt(C/T)位点基因型频率分别为 0.79(CC)、0.19(CT)和 0.02(TT), 中国汉族、壮族、布依族、水族及苗族群体间无显著性差异。中国人群 -857T 等位基因频率为 0.116, 与文献报道的韩国人群相同, 但比日本人群低。【结论】中国人群 TNF- α 基因启动子区单核苷酸多态性可能较保守。采用 Taqman MGB 探针实时定量 PCR 技术对 SNPs 进行基因分型简便、快速及准确, 易于自动化, 为大规模的疾病相关性研究提供了有效的工具。

关键词: 多态性; 肿瘤坏死因子; 单核苷酸多态性; 实时定量 PCR; Taqman MGB 探针

中图分类号: Q347

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)01-0051-04

Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms in TNF- α Promoter Region in Chinese Population Using Taqman MGB Probes

YU Lei, ZHUANG Zhi-xiong, XIE Fu-huan, HUANG Hai-xiong, YE Xiao-ming

(Department of Food/Toxicology, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the polymorphisms in the promoter region of the tumour necrosis factor (TNF- α) gene from Chinese population. 【Methods】Twenty Han healthy individuals in Shenzhen were selected randomly. The promoter region of the TNF- α gene in these 20 individuals from position -1389 nt to +125 nt was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with two primer pairs. The PCR products were sequenced to scan the single nucleotide polymorphisms (SNPs). The real-time PCR genotyping at -857 nt (C/T) position was established using Taqman minor groove binding (MGB) probes. Total 1108 samples from five Chinese populations, the Han, Zhuang, Buyi, Shui and Miao tribe groups were genotyped at -857 position using this method. 【Results】Six SNPs, -885(A/G), -863(C/A), -646(G/A), -648(G/A), -568(G/C), and -857(C/T), were identified in the promoter region (-1322 nt ~+67 nt). Among these the -646 nt (G A) SNP was a new one. Although the bases at -885, -648, and -568 positions were different from the bases in Genebank sequence, the twenty individuals sequenced had the same genotypes at these three sites. The genotype frequencies of the SNP at site -857 nt (C/T) in Chinese population were 0.79, 0.19, and 0.02 for CC, CT, and TT, and there no difference among the five Chinese populations, the Han, Zhuang, Buyi, Shui and Miao tribe groups. The frequency of -857T allele in Chinese population was 0.116, similar to that reported in Korean, but lower than that in Japanese. 【Conclusion】The SNPs in the promoter region of TNF- α gene from Chinese population may be conserved. The real-time PCR technology for SNPs genotyping using Taqman

收稿日期: 2005-03-02

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)基金资助项目(2002CB512904); 广东省医学科学技术研究基金资助项目(2003A710)

作者简介: 庾蕾(1964-), 女, 安徽马鞍山人, 博士, 副主任医师; 庄志雄, 博士生导师, 通讯作者. E-mail: zxzhuang@szzcdc.net

MGB probes is simple, rapid, accurate, and automated, and will provide a useful tool for large-scale SNP association studies.

Key words: polymorphism; tumour necrosis factor ; single nucleotide polymorphisms; real-time polymerase chain reaction; Taqman minor groove binding probe

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2006, 27(1):51-54, 62]

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 是形成人类个体差异的遗传基础, 可影响人类对疾病的易感性、发病的程度、对药物的反应及治疗效果^[1]。肿瘤坏死因子 (tumour necrosis factor, TNF-) 是一种重要的促炎细胞因子。人类疾病细胞因子基因多态性 (cytokine gene polymorphism in human disease) 数据库^[2]已报道了其启动子区的 8 个 SNP 位点, 且一些 SNP 位点的等位基因与某些感染性和自身免疫性疾病相关^[3,4]。人们对中国人群 TNF- 基因多态性了解甚少。目前报道的 TNF- 启动子区 SNP 分型方法主要为限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 及单链构象多态性分析 (single-strand conformation polymorphism, SSCP)^[5,6] 等, 都需电泳过程, 相对比较费力而难于自动化。我们对中国人群 TNF- 基因启动子区进行序列分析, 寻找 SNP 位点。针对 -857 nt (C/T) 位点建立了用 TaqMan MGB 探针分型技术, 并对中国汉族、壮族、布依族、水族及苗族等群体进行调查, 报道如下。

1 材料与方 法

1.1 样 本

序列分析 (20 例) 及群体调查的中国汉族群体 (344 例) 的血标本取自深圳地区健康体检、无亲缘关系的汉族个体。中国壮族 (198 例)、布依族 (179 例)、水族 (191 例) 及苗族 (196 例) 群体的血标本取自壮族、布依族、水族及苗族无亲缘关系的健康者。

1.2 DNA 的抽提

采用酚/氯仿法抽提血样品基因组 DNA。

1.3 TNF- 基因启动子区 PCR 扩增

选择 2 对引物扩增报道 SNP 位点较多的启动子区, 引物序列为: -1389 (5' AGGCTGACC AAGAGAGAAAG3') 和 -484 (5' TTGGAGTCCT GAGGCCTGTGT3'); -952 (5' GTTACAGGAGACC TCTGGGG3') 和 +125 (5' GGAAGAGAACTGC CTGGC3')^[7], 由上海博亚公司合成。20 μ L 反应体系含 100 ng 基因组 DNA, 1.25 U TaKaRa LA Taq

DNA 聚合酶 (宝生物), 0.8 mmol/L dNTPs, 2.5 mmol/L MgCl₂ 和引物各 0.5 μ mol/L。PCR 反应在 GeneAmp PCR 9700 仪器上按下述程序进行: 先 95 $^{\circ}$ C 5 min 然后按 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 55 $^{\circ}$ C, 45 s, 72 $^{\circ}$ C, 1 min 进行 35 个循环, 或 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 59 $^{\circ}$ C, 45 s, 72 $^{\circ}$ C, 1 min 进行 20 个循环, 再按 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 60 $^{\circ}$ C, 45 s, 72 $^{\circ}$ C, 1 min 进行 15 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.4 序列分析

PCR 产物经纯化后进行双向序列分析, 采用荧光标记 ddNTPs 的循环测序法 (ABI prism BigDyeTM terminator cycle sequencing ready reaction kits, PE)。电泳、荧光信号收集及结果分析在 377 DNA 测序仪 (PE 公司) 上进行。

1.5 实时定量 PCR SNP 分型

采用 TaqMan MGB 探针进行启动子区 -857 nt (C/T) 位点基因分型。用 Primer Express 软件设计引物和探针, 序列如下: 引物 A: 5' CACAGCAATGGG TAGGAGAATGT3'; 引物 B: 5' AGGTCCTGGAGGCT CTTTCACT3'。探针 1: FCCCTGTCTTCGTTAAGP; 探针 2: 6CCCTGTCTTCATTAAGP (F 代表 FAM, 6 代表 HEX, P 代表 MGB 基团), 由上海基康公司合成。PCR 反应体系为 10 μ L 含 TaqMan Master Mix 5 μ L (PE 公司), 引物、探针浓度分别为 900 nmol/L 和 250 nmol/L。在 Mx4000 (stratagene) 实时定量 PCR 仪上反应: 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min, 继而 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s 进行 45 循环。仪器自动收集荧光信号, 软件分析给出 SNP 分型结果。

1.6 统计学处理

计算各群体基因型及等位基因频率, 对群体数据作 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验, 群体间基因型及等位基因频率差别用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 TNF- 基因启动子区多态性分析

在启动子区采用两对引物进行 PCR 扩增, 扩增启动子区 -1389 nt 至 +125 nt, 分别为 905 bp 和

1077 bp。对随机选取的 20 名健康个体 PCR 扩增产物进行双向序列分析, 每一个体均得到约 1 388 bp 序列(- 1322 nt ~+67 nt), 与 Genbank 序列(登记

号为 M16441)相比 SNP 位点及基因分型见表 1。
2.2 - 857 nt (C/T) 位点 TaqMan MGB 探针分型方法的建立及中国人群其等位基因频率调查

表 1 20 名健康个体 TNF- 基因启动子区(- 1322 ~+67 nt) SNP 位点及基因分型

Table 1 The loci and genotypes of single nucleotide polymorphism in the promoter region (- 1322 ~+67 nt) of the TNF- gene in 20 health individuals

NO.	- 885(A ¹)/G)	- 863(C ¹)/A)	- 646(G ¹)/A)	- 648(G ¹)/A)	- 568(G ¹)/C)	- 857(C ¹)/T)
1	G/G	A/A	G/A	A/A	C/C	C/C
2	G/G	A/A	G/G	A/A	C/C	C/C
3	G/G	C/C	G/G	A/A	C/C	T/T
4	G/G	C/C	G/G	A/A	C/C	C/C
5	G/G	A/A	G/G	A/A	C/C	C/C
6	G/G	C/C	G/G	A/A	C/C	T/T
7	G/G	C/C	G/G	A/A	C/C	C/C
8	G/G	C/C	G/G	A/A	C/C	C/C
9	G/G	C/C	G/G	A/A	C/C	C/C
10	G/G	C/C	G/G	A/A	C/C	C/C
11	G/G	C/C	G/G	A/A	C/C	C/C
12	G/G	A/A	G/G	A/A	C/C	C/C
13	G/G	C/C	G/G	A/A	C/C	C/C
14	G/G	A/A	G/G	A/A	C/C	C/C
15	G/G	C/C	G/G	A/A	C/C	C/C
16	G/G	A/A	G/G	A/A	C/C	C/C
17	G/G	C/C	G/G	A/A	C/C	C/C
18	G/G	C/C	G/G	A/A	C/C	C/C
19	G/G	A/A	G/G	A/A	C/C	C/C
20	G/G	A/A	G/G	A/A	C/C	C/C

1) stands for the base in Genbank sequence

采用 TaqMan MGB 探针, 建立 - 857 nt (C/T) 位点实时定量 PCR 分型方法, 20 份样本分型结果与序列分析结果一致。采用此方法对中国汉族、壮族、布依族, 水族及苗族群体共 1 108 份样本进行了 - 857 nt (C/T) 位点基因分型(表 2, 图 1)。对各群体之间基因型及等位基因频率比较, P > 0.05 差异无统

计学意义。因序列分析的随机选择的 20 份样本 - 857 nt 位点均为纯合子, 在群体调查中出现的杂合子样本, 又进行序列分析验证, 结果是一致的。

2.3 中国人群 - 857nt (C/T) 位点等位基因频率与韩国及日本群体比较

中国人群与文献报道的日本及韩国群体相比,

表 2 中国人群 TNF- 基因启动子区 - 857nt (C/T) 位点基因型及等位基因频率

Table 2 The frequencies of genotypes and alleles at - 857(C/T) in TNF- gene from Chinese populations

Group	Number	Genotype(n/frequency)			Allele(n/frequency)	
		C/C	C/T	T/T	C	T
Han	344	268(0.78)	71(0.21)	5(0.01)	607(0.88)	81(0.12)
Zhuang	198	166(0.84)	30(0.15)	2(0.01)	362(0.91)	34(0.09)
Buyi	179	141(0.79)	33(0.18)	5(0.03)	315(0.88)	43(0.12)
Water	191	150(0.79)	38(0.19)	3(0.02)	338(0.88)	44(0.12)
Miao	196	148(0.76)	42(0.21)	6(0.03)	338(0.86)	54(0.14)
Total	1 108	873(0.79)	214(0.19)	21(0.02)	1 960(0.88)	256(0.12)

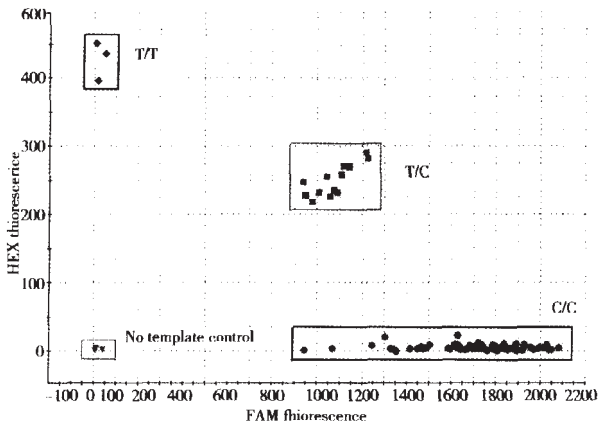


图 1 -857 nt(C/T) 位点实时定量 PCR 分型图

Fig.1 The real-time PCR genotyping at -857 nt (C/T) position

Data for 93 genotypes are shown

都表现为-857C 占优势, 但中国和韩国群体-857T 等位基因频率较日本群体低^[6,8](表 3)。

表 3 中国、韩国及日本群体-857 nt(C/T) 位点等位基因频率
Table 3 The frequencies of alleles at -857 nt (C/T) in TNF-gene in Chinese, Korean, and Japanese populations

Populations	Number	Allele(n/frequency)	
		C	T
Chinese	1 108	1 960(0.884)	256(0.116) ¹⁾
Korean	200	344(0.860)	56(0.140) ¹⁾
Japanese	271	446(0.823)	96(0.177) ¹⁾

1)Comparing the frequencies of alleles among the three populations, the deviation had statistically significant ($\chi^2=15.163$, $df=2$, $P<0.05$). Combining the frequencies of Chinese and Korean and comparing with Japanese, the deviation had statistically significant ($\chi^2=13.358$, $df=1$, $P<0.05$)

2 讨论

国内报道的 TNF- α 基因多态性与疾病相关性研究多采用国外已报道的多态性位点^[4,9,10], 中国人群 TNF- α 基因多态性研究未见报道。我们在 TNF- α 基因启动子区采用两对引物进行 PCR 扩增, 对 PCR 产物进行序列分析获得 1 388 bp 序列 (-1322 nt ~+67 nt), 包含了目前已报道的 10 个 SNP 位点^[2,7]。虽然在中国人群发现有 6 个 SNP 位点(表 1), 但有 3 个位点(-885、-648 及 -568 nt 位

点)在本组测序的 20 个个体中基因分型相同。

SNPs 与人类疾病相关性研究, 有助于进一步了解人类遗传多样性和疾病发生发展的分子机理, 而大规模的相关性研究需要一种准确、高通量的 SNPs 分型方法。我们采用 TaqMan MGB 探针, 针对-857 nt(C/T) 位点, 建立实时定量 PCR 基因分型。反应体系包括一对引物及 2 个分别检测不同等位基因的 MGB 探针, 探针的 5 端标记 FAM(检测 C 碱基)或 HEX(检测 T 碱基), 3 端标记不发光的猝灭基团并连接一个 MGB (minor groove binder) 基团。连接 MGB 基团的探针可与互补的 DNA 形成高度稳定的双螺旋, 大大增加配对与非配对模板间的 Tm 值差异^[11], Johnson 等^[12]报道该方法错误率小于 1%, 国内有作者报道^[13] TaqMan 分型技术与测序结果的一致性达到 100%。我们用建立的 TaqMan MGB 探针 SNP 分型方法对-857 nt(C/T) 位点进行基因分型, 20 份样本及群体调查时出现的 2 份杂合子样本分型结果均与序列分析结果一致。采用 Primer Express 软件设计引物和探针, 由于引物和探针选择都遵循一定的规则, 可采用一致的引物和探针浓度及 PCR 循环条件, 这为多个 SNP 位点高通量分型提供了基础。TaqMan MGB 探针 SNP 分型方法整个反应在一个封闭的管中进行, 软件分析自动给出分型结果, 无需 PCR 后处理, 减少污染, 同时反应体系中加入了 AmpErase UNG 酶 (PE 公司) 消除污染, 使实验结果更准确。

用建立的 TaqMan MGB 探针 SNP 分型方法对中国汉族、壮族、布依族、水族及苗族群体进行了调查, 获得各群体-857 nt(C/T) 位点基因型及等位基因频率(表 2), 可见中国各群体以等位基因-857C 占优势, 各群体间基因型及等位基因频率无显著性差异。与亚洲的日本及韩国群体相比, 都表现为-857C 占优势, 但中国和韩国群体-857T 等位基因频率较日本群体低(表 3)。

我们通过序列分析及群体调查表明, 中国人群 TNF- α 基因启动子区单核苷酸多态性可能较保守, 为 TNF- α 基因与疾病相关性研究提供了基础资料。本研究采用 TaqMan MGB 探针的实时定量 PCR SNP 分型方法, 简便、快速、准确及自动化, 为大规模的疾病相关性研究提供了有效的工具。

(下转第 62 页 to page 62)

的前方承载能力低下的椎间实行椎体间融合,对减小局部椎弓根钉的应力,进而降低断钉的发生率具有重要意义。

参考文献:

- [1] McLAIN R F, BURKUS J K, BENSON D R. Segmental instrumentation for thoracic and thoracolumbar fractures: prospective analysis of construct survival and five-year follow-up [J]. *Spine J*, 2001, 1(5):310-323.
- [2] 須田浩太, 金田清志, 種市 洋, 等. 腰椎変性疾患固定術における anterior column support の要否; 後側方固定術長期経過例からの検討 [J]. *脊椎脊髄*, 2000, 13(1): 180-184.
- [3] CONNOLLY P J, VON SCHROEDER H P, JOHNSON G E, et al. Adolescent idiopathic scoliosis. Long-term effect of instrumentation extending to the lumbar spine [J]. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1995, 77(8):1210-1216.
- [4] BEGUIRISTAIN J L, VILLAS C, PREITE R, et al. Lumbosacral arthrodesis using pedicular screws and ringed rods [J]. *Eur Spine J*, 1997, 6(4):233-238.
- [5] ALIGIZAKIS A C, KATONIS P G, SAPKAS G, et al.

Load sharing classifications for unstable thoracolumbar fractures [J]. *Clin Orthop*, 2003(411):77-85.

- [6] YU B S. Biomechanical comparison of the posterolateral fusion and posterior lumbar interbody fusion using pedicle screw fixation system for unstable lumbar spine [J]. *J Hokkaido Igaku Zasshi*, 2003, 78(3):211-218.
- [7] YU B S, ABUMI K, ODA I, et al. Load-sharing characteristics of the anterior and posterior elements in lumbar spine [J]. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 2003, 78(4): 222-234.
- [8] 于滨生, 刘少喻, 李佛保, 等. 腰椎稳定重建的解剖及生物力学特性 [J]. *脊柱外科杂志*, 2005, 13(1): 180-184.
- [9] 于滨生, 刘少喻, 李佛保, 等. 羟基磷灰石和多聚左旋乳酸制椎体间固定融合 cage 的力学特性 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 25(3S): 6-8.
- [10] KOSTUIK J P, MUNTING E, VALDEVIT A. Biomechanical analysis of screw load sharing in pedicle fixation of the lumbar spine [J]. *J Spinal Disord*, 1994, 7(5):394-401.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 54 页 from page 54)

参考文献:

- [1] MCCARTHY J J, HILFIKER R. The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(5):505-508.
- [2] HAUKIM N, BIDWELL J L, SMITH A J, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 2 [J]. *Genes Immun*, 2002, 3(6):313-330.
- [3] 郭芮兵, 陈仕林. TNF- 基因多态性对 TNF- 产物的影响及其与疾病的关系 [J]. *医学研究生学报*, 2003, 16(5): 382-385.
- [4] 陈蕊雯, 段世伟, 蔡青, 等. 肿瘤坏死因子的单核苷酸多态性与中国汉族人强直性脊柱炎的关联分析 [J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25(2): 120-124.
- [5] SOGA Y, NISHIMURA F, OHYAMA H, et al. Tumornecrosis factor- alpha gene (TNF-)- 1031/- 863,- 857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese [J]. *J Clin Periodontol*, 2003, 30(6):524-531.
- [6] PARK Y J, PARK H, PARK M H. TNF- promoter polymorphisms and extended HLA and TNF- haplotypes in Koreans based on 100 families [J]. *Tissue Antigens*, 2004, 63(1):75-79.

- [7] RICHARDSON A, SAYS- JOOF F, ACKERMAN H, et al. Nucleotide diversity of the TNF gene region in an African village [J]. *Genes Immun*, 2001, 2(6):343-348.
- [8] HIGUCHI I, SEKI N, KAMIZONO S, et al. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)- gene in Japanese [J]. *Tissue Antigens*, 1998, 51(6): 605-602.
- [9] 张安平, 周澜, 杨森, 等. 皖籍汉族人寻常型银屑病患者 TNF- 基因多态性分析 [J]. *疾病控制杂志*, 2004, 8(5): 421-424.
- [10] 杨建中, 司天梅, 凌炎苏, 等. 肿瘤坏死因子基因 (TNF) - G308A 多态性与精神分裂症的关联 [J]. *中国心理卫生杂志*, 2003, 17(6): 415-417.
- [11] KWOK P Y. Single nucleotide polymorphisms: Methods and Protocols [M]. Totowa: Humana Press, 2003: 1.
- [12] JOHNSON V J, YUCESOY B, LUSTER M I. Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology [J]. *Cytokine*, 2004, 27(6):135-141.
- [13] 翟芸, 周钢桥, 董晓佳, 等. 大规模发掘及分型 SNP 技术平台的建立 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2004, 28(1): 52-60.

(编辑 黄小延)