

广东人 AGTR2 突变热区的 SNPs 位点分析

张 敏¹, 马 虹¹, 王伯松¹, 赵永忠²

(1. 中山大学附属第一医院心内科, 广东 广州 510080; 2. 第一军医大学细胞生物学教研室, 广东 广州 510515)

摘 要:【目的】研究广东汉族人群中血管紧张素 II 2 型受体基因 (AGTR2) 是否存在特有的 SNPs 位点。【方法】收集 121 例祖籍广东的汉族人。取外周静脉血以酚/氯仿法分离白细胞提取基因组 DNA, 根据 AGTR2 基因已知的 SNPs 的位点分布特点设计两对引物, PCR 扩增目的片段。对 PCR 产物进行 SSCP 分析, 银染显色。根据染色结果, 随机抽取部分带型不同的 PCR 产物直接测序, 对测序结果通过 BLASTn 软件和 ClustalW 软件在线分析。【结果】发现 5 个 SNPs 位点: G300663A, A300672T, A300818T, G301404T 和 A301410G, 除 A301410G 与 GenBank dbSNP 数据库中的位点 (rs5194) 相同外, 其余 4 个位点为新发现的 SNPs 位点。【结论】AGTR2 是一个高突变的基因, 广东人 AGTR2 的 SNPs 位点多, 与其他人群显著不同。

关键词:血管紧张素 II 2 型受体基因; 单核苷酸多态性; 广东人; 单链构象多态性

中图分类号: Q987

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)03-0221-04

SNPs in the Hotspot Regions of AGTR2 in Cantonese

ZHANG Min¹, MA Hong¹, WANG Bo-song¹, ZHAO Yong-zhong²

(1. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Division of Cell Biology, Department of Basic Medicine Science, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: 【Objective】The goal of the study was to explore the SNPs in the hotspot regions of AGTR2 in Cantonese. 【Methods】We collected peripheral blood samples from 121 persons. All of them were Han people resided for generations in Guangdong province. DNA samples were extracted using phenol-choloride method. On the basis of data mining the characteristic distribution of major cSNPs (single nucleotide polymorphisms existing in mRNA sequence) of AGTR2 reported in SNP database of NCBI, we designed two pairs of primers for PCR amplification. Each PCR product was analyzed by SSCP. Parts of PCR products from distinguished banding patterns were sequenced directly. SNPs data analyzing was performed using BLASTn software and databases of NCBI. Moreover, all the sequences were aligned using the web based software Clustal-W. 【Results】We acquired 5 SNPs: G300663A, A300672T, A300818T, G301404T and A301410G. Among these variances, A301410G is the only one consistent with rs5194 in GenBank dbSNP database. The rest 4 SNPs are special in Cantonese. 【Conclusion】AGTR2 is a gene with high mutation rate and sequence diversity, and when compared with reported SNPs data, gene variation of AGTR2 in Cantonese is distinguished to other people.

Key words: angiotensin II receptor 2 gene; single-nucleotide polymorphisms; Cantonese; single strand conformation polymorphism

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(3): 221-224]

血管紧张素 II 2 型受体基因 (AGTR2) 全长 6754 bp, 包括 3 个外显子和 2 个内含子 (GenBank:

收稿日期: 2003-10-20

作者简介: 张 敏 (1973-), 女, 云南昆明人, 博士生, 医师; 马 虹, 博士生导师, 通讯作者. E-mail: minniech2003@21cn.com

序列号 AY324607)。1994 年 Koike^[1]等人从成年女性白细胞中分离出 AGTR2 基因, 其外显子核苷酸序列编码 363 个氨基酸, 与小鼠和大鼠具有高度的同源性。1995 年 Chassagne 等^[2]将其定位于 Xq22-q23。AGTR2 的作用目前还不完全清楚, 可能是一种潜在的心脏、血管保护性受体^[3,4], 还可能与大脑发育和认知功能有关^[5]。根据 GenBank 的 dbSNP 数据库资料^[6], AGTR2 的单核苷酸多态性 (SNPs) 位点有 12 个, 其中有 7 个 cSNPs (即存在于 mRNA 序列的 SNPs 位点)。而根据美国西雅图华盛顿大学基因科学院 (Genome Sciences, University of Washington, Seattle, WA, USA) 2003 年 6 月 17 日向 GenBank 提交的 AGTR2 全长序列的最新资料 (AY324607), AGTR2 的 SNPs 位点有 30 个, 包括 12 个 cSNPs。上述数据均来自于国外人群。广东汉族人群作为中国南方汉族人群的重要组成部份, 有其特殊的遗传特性, 在这一特定人群中 AGTR2 基因是否存在其特有的 SNPs 位点, 我们就这一问题进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 样品收集

从中山大学附属第一医院收集门诊和住院病人 121 例, 均为祖籍广东的汉族人, 男 63 人, 女 58 人, 年龄 55 ~ 86 岁, 平均年龄 (68.0 ± 9.7) 岁。

1.2 DNA 提取

外周静脉血, EDTA-K2 抗凝, 酚/氯仿法分离白细胞提取基因组 DNA, 纯度经紫外分光光度计测定为 $A_{260} : A_{280} \geq 1.8$ 。

1.3 引物设计

如前所述, dbSNP 数据库收集的 AGTR2 的 SNPs 位点有 12 个, 包括 7 个 cSNPs, cSNPs 相对比较集中, 分别位于第 3 外显子 (E3) 和 3' 非翻译区 (3'UTR) 的两个 400 bp 左右的片段内。我们根据 AGTR2 的 SNPs 的位点分布特点设计了两对 PCR 引物, 引物序列为: P1: 5'ATCAACATGGCTACTTGCTT3', P2: 5'GTGCTCATCTCTCTTACAAT3', P3: 5'GTACCAATCTGTCATCTACC 3', P4: 5'TCGC AGC-TATTAATGACACC3'。

P1 + P2 引物扩增 nt30 1228 ~ nt301 634 之间 407 bp 的片段, P3 + P4 引物扩增 nt300 539 ~ nt300 985 之间 447 bp 的片段, 参照序列为 NT_011565.6。这两对引物所扩增的预期片段包含已知的 7 个 cSNPs 位点

1.4 目的片段扩增

PCR 反应体系: DNA 模板 0.1 ~ 0.5 μg , 10 pmol/ μL 上、下游引物各 4 μL , 10 × PCR Buffer 10 μL (包含 20 mmol/L MgCl_2^{2+}), 10 mmol/L dNTP 2 μL , Taq 酶 2.5 U (Taq 酶和 dNTP 购自 Roche Molecular Biochemicals 公司), 最后用无菌去离子水补至 100 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环, 最后以 72 °C 延伸 5 min。取 2 μL PCR 产物进行 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳 (EB 染色), 鉴定 PCR 产物的浓度、纯度和片段长度。

1.5 PCR 产物的 SSCP 分析

取 3 μL PCR 产物, 加入 60 μL SSCP 上样缓冲液 (100 mL 缓冲液含 95 mL 甲酰胺, 0.67 g/L EDTA · 2Na, 0.05 g 溴酚蓝, 0.05 g 二甲苯晴, pH8.0), 98 °C 变性 3 min, 迅速置冰冷却 5 min 后取 15 μL 上样。采用 75 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 在 4 °C, 恒压 200 V (10 V/cm) 条件下电泳 5 h, 银染显色。

1.6 PCR 产物序列测定和生物信息学分析

根据银染结果, 我们按照随机数字表抽取部分带型不同的 PCR 产物, 共 16 个样品、32 个 PCR 产物进行序列测定: ①应用大连宝生物公司的 PCR Fragment Recovery Kit (Code D301CA), 按说明书对相应样品的 PCR 产物进行割胶纯化。纯化的 PCR 产物直接作为测序模板, 测序引物为 P1、P2、P3、P4, 共进行了 64 个测序反应 (测序由大连宝生物技术公司完成)。②对所测得的序列进行生物信息学分析: 通过 BIASTn^[7] 软件分析所获得序列在参照序列的对应位置, 以及二者不同的位点; 应用欧洲生物信息学研究所 ClustalW 软件^[8] 在线分析所有的已测序列, 以进一步确证 SNPs 位点见图 1。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

P1 + P2 引物和 P3 + P4 引物扩增的 PCR 产物与预期片段长度一致, 分别为 407 bp 和 447 bp。PCR 扩增片段特异性适合于下游分析, 见图 1。

2.2 SSCP 分析结果

图 2 为两种 PCR 产物的 SSCP 带型。同样大小的 PCR 产物有明显不同的带型, 说明这两个 DNA 片段中存在单链构象多态性。

2.3 目的片段的测序及 BIASTn 软件分析结果

图 3 是部分样品分别应用 P1、P2、P3 和 P4 所

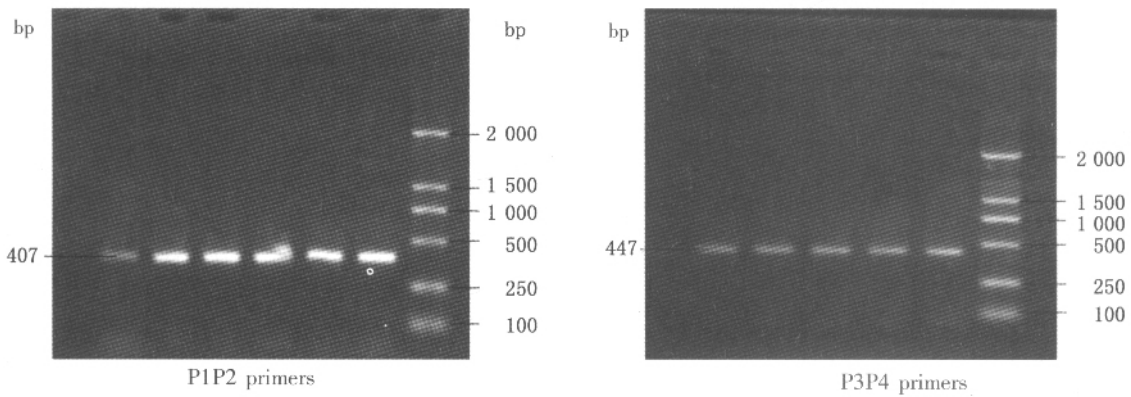


图 1 PCR 扩增片段

Fig. 1 PCR amplified fragments (electrophoresis on 12 g/L agar gels)

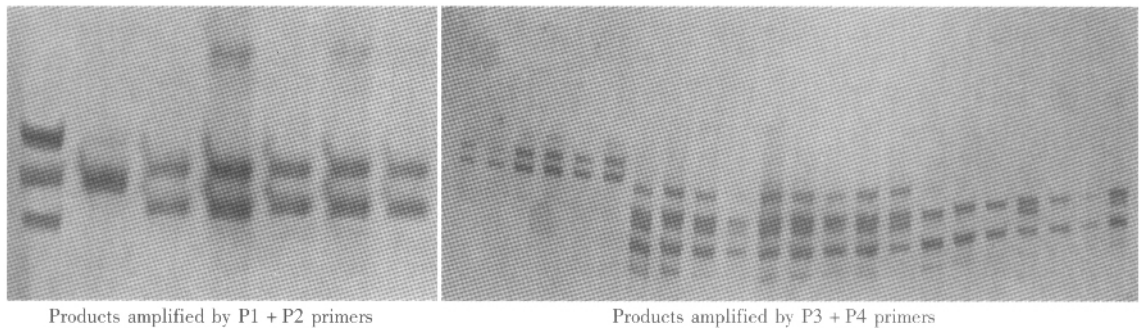


图 2 PCR 产物的 SSCP 带型

Fig. 2 The SSCP band patterns of PCR products

测序列的序列图谱。对所测得的序列进行 BLASTn 分析，对应序列为 AGTR2 的参照 DNA 序列 (GenBank: AL732602.5, NM000686.3)。所扩增的序列经 BLASTn 分析与参照序列仅有少数几个核苷酸不同,这表明这些位点可能为 SNPs 位点。为进一步确证 SNPs 位点,我们应用 ClustalW 软件在线分析了所有的已测序列,进一步结合序列图谱图 3,最后得到 5 个 SNPs 位点,见表 1: G300663A, A300672T, A300818T, G301404T 和 A301410G(以 DNA 序列 NT_011565.6 为参照排序);其中 G301404T 和 A301410G 位于 3'UTR, G300663A,

A300672T 和 A300818T 位于 E3 编码蛋白质的序列,分别对应如下氨基酸变异: V184I, I187F 和 R235S。这 5 个 SNPs 位点中, A301410G 对应 GenBank dbSNP 数据库中的 rs5194,其余 4 个为新发现的 SNPs 位点。将此数据提交 GenBank 进行注册,获得登陆号:AY359674-AY359675。结合 SSCP 结果,得到样品的等位基因频率见表 2,各等位基因频率均大于 1%。

3 讨论

在西雅图华盛顿大学 2003 年 6 月向 GenBank

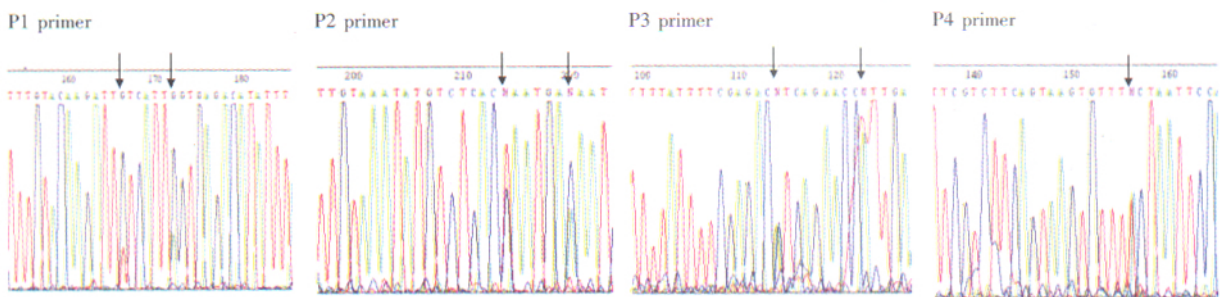


图 3 PCR 扩增片段的测序分析

Fig. 3 Sequence analysis of the PCR amplified fragments

P1 primer and P2 primer : Mutations of G301404T and A301410G ; P3 primer: Mutations of G300663A and A300672T ;

P4 primer: Mutation of A300818A

表 1 广东人突变热区的 SNPs 位点

Table 1 SNPs in the hotspot regions of AGTR2 in Cantonese

SNP site	SNP ID	Contig accession	Pos in contig	DNA Chg	AA Chg	Type	mRNA accession	Protein accession	Cod Pos	Pos in Prot
G300663A		NT_011565.6	300663	G/A	V/I	coding-nonsynon	NM_000686	NP_000677	1	184
A300672T		NT_011565.6	300672	A/T	I/F	coding-nonsynon	NM_000686	NP_000677	1	187
A300818T		NT_011565.6	300818	A/T	R/S	coding-nonsynon	NM_000686	NP_000677	3	235
G301404T		NT_011565.6	301404	G/T	-	mRNA - 3'UTR	NM_000686	-	-	-
A301410G	rs5194	NT_011565.6	301410	A/G	-	mRNA - 3'UTR	NM_000686	-	-	-

表 2 具体样品的 SNPs 基因型及等位基因频率

Table 2 The genotype and allele frequency of AGTR2 SNPs

SNPs sites	Genotypes	Females	Males	Allele frequency
G301404T	G/G	44	55	0.87/0.13
	G/T	13		
	T/T	1	8	
A301410G	G/G	12	31	0.48/0.52
	G/A	31		
	A/A	15	32	
G300663A, (V184I)	G/G	45	56	0.89/0.11
	G/A	13		
	A/A	0	7	
A300672T, (I187F)	A/A	41	53	0.84/0.16
	A/T	15		
	T/T	2	10	
A300818T, (R235S)	A/A	52	59	0.94/0.06
	A/T	6		
	T/T	0	4	

提交的 AGTR2 全长序列中, 30 个 SNPs 位点与 db-SNP 数据库中所记录的数据有很大不同, 特别是位于编码区的 cSNPs 位点以前都未见报道。现有的资料表明了 AGTR2 是一个高突变的基因, 因此在不同的人群中 AGTR2 可能存在更多的单核苷酸多态性位点。

广东人群是中国南方汉族人群的重要组成部分, 在遗传方面有其特殊之处: 根据 80 年代初的数据, 广东人 α 地中海贫血的发生率为 7.3%, β 地贫检出率 1.83% ~ 3.36%, 高于全国统计检出率 2.95% 和 0.67%^[9]; G6PD 缺乏症的发生率也高达 8.65%^[10], 表明广东人的遗传特征与其他人群存在不同。目前报道的人类 AGTR2 之 SNPs 位点资料均来源于国外人群, 中国人 AGTR2 的 SNPs 位点尚未见报道。本文以祖籍广东的汉族人群为研究对象, 仅在 E3 和 3'UTR 的两个片段、长 854 bp 的区域内就发现了 5 个 SNPs 位点 (基因频率均 > 1%), 除 A301410G 与 SNPs 数据库中的位点相同外, 其余 4 个位点均为新发现的 SNPs 位点, 这进一步说明 AGTR2 是一个高突变的基因, 广东人群 AGTR2 的

多态性位点多, 且与国外显著不同。

AGTR2 为 X 染色体上的基因, 根据我们的测序结果, 在男性个体中至少可以看出 G-A-A-G-A, G-A-A-G-G, G-A-A-T-A 这 3 种单倍型。如扩大样品数量, 还可能发现其他单倍型。我们的研究可能为将来对某些复杂疾病, 如高血压病、冠心病、糖尿病等进行研究提供了有用的遗传学信息。

参考文献:

- [1] Koike G, Horiuchi M, Yamada T, et al. Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 203(3): 1842-50.
- [2] Chassagne C, Beatty B G, Meloche S. Assignment of the human angiotensin II type 2 receptor gene (AGTR2) to chromosome Xq22-q23 by fluorescence in situ hybridization[J]. *Genomics*, 1995, 25(2): 601-3.
- [3] Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E Jr, et al. Targeted deletion of angiotensin II type 2 receptor caused cardiac rupture after acute myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2002, 106(17): 2244-9.
- [4] Oishi Y, Ozono R, Yano Y, et al. Cardioprotective role of AT2 receptor in postinfarction left ventricular remodeling[J]. *Hypertension*, 2003, 41(3 Pt 2): 814-8.
- [5] Vervoort V S, Beachem M A, Edwards P S, et al. AGTR2 mutations in X-linked mental retardation[J]. *Science*, 2002, 296(5577): 2401-3.
- [6] 美国国立生物信息技术中心. SNP[DB/OL]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>, 2003-08-11.
- [7] 美国国立生物信息技术中心. blastn 在线软件. Version 2.2.8[CP/OL]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, 2004-02-10.
- [8] 欧洲生物信息学研究所 Clustal w 在线软件. version 1.82 [CP/OL]. <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>, 2004-03-30.
- [9] 广东省血红蛋白病研究协作组. 广东省地中海贫血的研究[A]. 广东省血红蛋白病研究资料汇编[C]. 广州: 广东省血红蛋白病研究组, 1986, 5: 10-15.
- [10] 吴梓, 黄绍良, 梁嘉泰, 等. 新生儿红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏的实验调查[J]. *中华血液学杂志*, 1980, 1(2): 72-6. (编辑 黄小延)