

中国汉族、布依族和壮族群体中聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 -1 基因多态性

唐焕文¹, 庄志雄², 梁海荣³, 李荣成⁴, 何云¹, 农艺⁴, 黄月葵⁴

(1. 中山大学公共卫生学院卫生毒理学教研室, 广东 广州 510080; 2. 深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518020; 3. 广西灌阳县卫生防疫站, 广西 灌阳 541600; 4. 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 广西 南宁 530021)

摘要:【目的】探讨人类聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1(PARP-1) 5个外显子核苷酸多态性。【方法】采用聚合酶链式反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)和银染技术检测3个民族(汉族、布依族和壮族)634名正常人PARP-1基因多态性。【结果】在3个民族634名正常人血标本的5个外显子扩增产物SSCP电泳条带中,219名汉族人PARP-1基因5个外显子均未检出多态性条带;203名布依族和212名壮族人PARP-1基因的5个外显子扩增产物中分别有2例的外显子20检出1条多态性条带,其余4个外显子扩增产物未见多态性条带。【结论】PARP-1基因第20外显子上可能存在多态性。

关键词: 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1; 聚合酶链反应; 多态现象, 单链构象; 多态性

中图分类号:Q754

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2003)05-0432-03

Human PARP-1 Gene Polymorphisms in Chinese Han, Buyi and Zhuang Populations

TANG Huan-wen¹, ZHUANG Zhi-xiong², LIANG Hai-rong³, LI Rong-cheng⁴,
HE Yun¹, NONG Yi⁴, HUANG Yue-kui⁴

(1. Department of Hygiene Toxicology, School of Public Health, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Shenzhen Center for Disease Prevention and Control, Shenzhen 518020, China; 3. Health and Anti-epidemic in Guanyang, Guanyang 541600, China; 4. Guangxi Center for Disease Prevention and Control, Nanning, 530021, China)

Abstract: 【Objective】To investigate nucleotide polymorphisms of five exons in human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) gene. 【Methods】PCR-SSCP silver staining was used to test the polymorphisms of PARP-1 gene in 634 Chinese Han, Buyi and Zhuang people (219, 203 and 212 respectively). 【Results】Polymorphisms of 5 exons of PARP-1 gene was not detected in 219 Han people and a polymorphism of exon 20 of PARP-1 gene was detected in 203 Buyi and 212 Zhuang people by PCR-SSCP. Other exons were not detected. 【Conclusion】Polymorphisms may exist in exon 20 of PARP-1 gene.

Key words: poly(ADP-ribose) polymerase-1; polymerase chain reaction; polymorphism, single-stranded conformation; polymorphisms

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(5): 432 ~ 434, 438]

聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1[poly(ADP-ribose) polymerase-1, PARP-1, EC2.4.2.30]是真核细胞中存在的一种蛋白质翻译后修饰酶。研究表

明, PARP-1在细胞受到环境因素作用后引起的DNA断裂及其后续反应中起重要作用,是细胞应激适应过程中的重要应激蛋白,可参与细胞内DNA

收稿日期:2003-03-19

基金项目:国家973计划资助课题(2002CB512904)

作者简介:唐焕文(1968-),男,广西桂林人,博士生,研究方向:分子毒理学;通讯作者:庄志雄教授。

复制、转录、修复、细胞转化乃至肿瘤形成等过程,对维持 DNA 的完整性方面起着重要的作用^[1],因此其在生命过程中的意义越来越受到重视。聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)银染技术是以单链 DNA 分子在非变性聚丙烯酰胺凝胶中的电泳速度为基础的,经不断地改进和完善,已被证实是一种简便、快速、灵敏的检测基因突变的方法。为了解 PARP-1 基因民族多态性情况,我们用这种方法检测了 3 个不同民族正常人 PARP-1 基因的多态性,以探讨其检测 PARP-1 基因多态性的可行性和效果。

1 方法

1.1 样本收集

2002 年 1~4 月在贵州地区和广西地区分别采集体检健康状况良好、无家族史和遗传病史、3 代及以上均为同一民族的 219 名汉族个体、203 名布依族个体及 212 名壮族个体。

1.2 血液 DNA 的抽提

全血离心后,按常规酚、氯仿法提取 DNA^[2]。

1.3 PCR 扩增

用 Williamstone 引物设计软件设计 PARP-1 基

因 5 个外显子的引物,并由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列、预计产物大小和反应条件见表 1。取 5 μL PCR 产物上样在 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,与 DNA 相对质量标准相比,若扩增物大小一致,无杂带,则可用于 SSCP 分析。

表 1 扩增 PARP-1 基因外显子的引物序列

Table 1 Primers used to PCR-amplify and sequences the exons of PARP-1 gene

Exon	Primer	Primer sequence(5'-3')	Length (bp)
11	Forward	TGAGGACAAAGGCACGAC	297
	Reverse	CGAGTTGACAGATGATGGG	
13	Forward	GCAGACAGTGTAAAGGGCA	313
	Reverse	CGTGAATGTAATGGCAGG	
16	Forward	CAGTCCCTTCTGAACCCT	175
	Reverse	CATTCCTTCTGTCCCTC	
17	Forward	GTTCTCAAAGGACCACCA	362
	Reverse	GAGTCTGTCTCATTACC	
20	Forward	AGCCCATTCCACCTGTCCCCAT	209
	Reverse	GCTCTCCCTTTTCCGACCTTCC	

1.4 PCR-SSCP 分析

1.4.1 电泳步骤 PCR 产物变性后,在经预变性的 80 g/L 聚丙烯酰胺凝胶上电泳,各外显子电泳条件见表 2。

表 2 PARP-1 基因外显子 PCR-SSCP 反应条件

Table 2 PCR-SSCP reactive conditions of the exons of the PARP-1 gene

Exon	PCR reactive conditions			SSCP conditions
	Pre-denaturation	Cycle paramete(30 cycle)	Extension	
11		94 °C 30 s→53 °C 30 s→72 °C 45 s		300 V 8 h
13		94 °C 30 s→55 °C 30 s→72 °C 45 s		300 V 9 h
16	95 °C 5 min	94 °C 30 s→54 °C 30 s→72 °C 45 s	72 °C 8 min	300 V 5 h
17		94 °C 30 s→55 °C 30 s→72 °C 45 s		300 V 10 h
20		94 °C 30 s→59 °C 30 s→72 °C 45 s		300 V 6 h

1.4.2 银染步骤 乙醇浸泡→HNO₃ 浸泡→Ag-NO₃ 浸泡→显影→醋酸浸泡。以上每一步后均用去离子水洗 2 次,观察结果并扫描成像保存。对阳性结果样本进行 2~3 次 PCR-SSCP 银染重复试验。

2 结果

2.1 PCR 扩增

3 个民族 634 人的 PARP-1 基因 5 个外显子均

得到成功扩增,PCR 反应产物均为单一区带,大小与预计扩增一致,见图 1。

2.2 SSCP 分析

219 名汉族人 5 个外显子均未发现异常带型,显示 2 条变性单链带(图 2)。203 名布依族和 212 名壮族人中均有 2 人的第 20 外显子 PCR 产物出现 2 种稳定的带型,显示 3 条变性单链带(异常泳动带位置在 2 条正常单链带的后方);其余结果显示 2 条变性单链带(图 3,4)。第 11、13、16、17 外显子均显示 2 条变性单链,不存在异常泳动带。

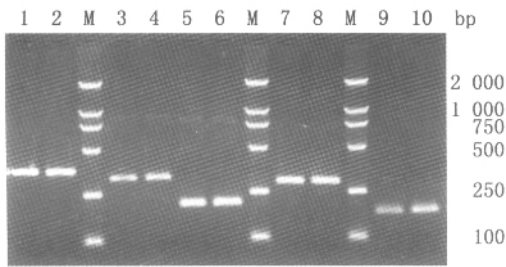


图 1 PARP-1 基因外显子的扩增片段

Fig. 1 Amplified fragments of the exons of PARP-1 gene (20 g/L agarose gel)

Lane 1 ~ 11: amplification results from genomic DNA of ten unrelated human; Lane 1 ~ 2: showed the exon 17, Lane 4 ~ 5: showed the exon 13, Lane 6 ~ 7: showed the exon 20, Lane 8 ~ 9: showed the exon 11, Lane 10 ~ 11: showed the exon 16, M: DNA mark DL2 000

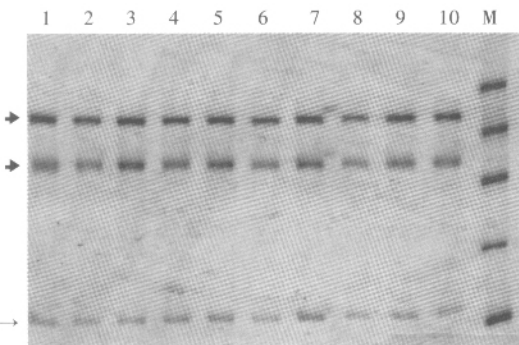


图 2 PARP-1 基因 exon20 正常 PCR 产物

Fig. 2 Normal electrophoregram in exon 20 of the PARP-1 gene (80 g/L non-denaturing polyacrylamide gel)

M: 100 bp marker; Lane 1 ~ 10: showed the normal degeneration PCR product; “→” showed the two normal single-stranded, “←” showed the renaturation bis-chain of normal PCR product, no abnormality chain existence

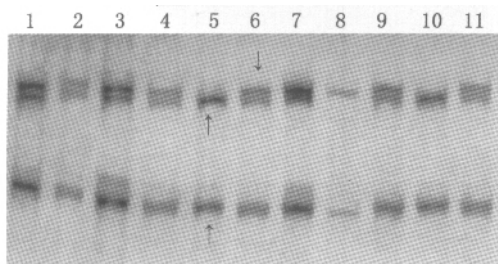


图 3 布依族 PARP-1 基因 exon20 PCR 产物的异常 SSCP 电泳图

Fig. 3 PCR-SSCP analysis of abnormal electrophoregram in exon20 of the PARP-1 gene derived from Buyi people (80 g/L non-denaturing polyacrylamide gel)

“↑” showed the two normal single-stranded, the abnormal single-stranded was showed “↓”; Lane 5, 8, 10 represents normal denatured PCR product, the rest represents abnormal denatured PCR product, the electrophoretic mobility shift of the abnormality chain was slower than that of normal single-stranded

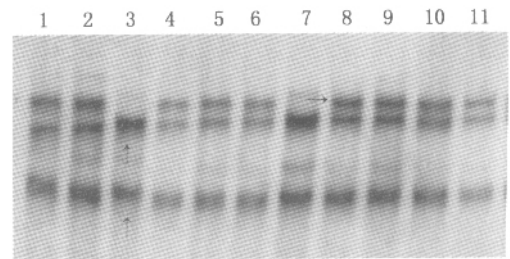


图 4 壮族人 PARP-1 基因 exon 20 PCR 产物的异常 SSCP

Fig. 4 PCR-SSCP analysis of abnormal electrophoregram in exon 20 of the PARP-1 gene derived from Zhuangzu people (80 g/L non-denaturing polyacrylamide gel)

“↑” showed the two normal single stranded, “→” showed the abnormal single-stranded. Lane 3, 7 represents normal denatured PCR product, the rest represents abnormal denatured PCR product, the electrophoretic mobility shift of the abnormality chain was slower than that of normal single-stranded

3 讨论

目前已有多种基因检测技术如不对称 PCR 产物的直接测序、限制性片段长度多态性分析等用于基因分析,但这些方法操作比较繁琐,局限性较大,不适合大样本实验研究。PCR-SSCP 银染是一种检测基因突变的技术,它具有简便、快速、敏感的特点,可检测 400 bp 以内核苷酸中 1 ~ 5 个碱基改变。有报道表明,这种方法可检出 200 bp 和 400 bp 大小 DNA 片段的单碱基突变分别达到 90% 和 80% 以上^[3]。PCR-SSCP 过程可在 24 h 内即完成,且能同时处理大量样本,可用于大样本的筛选和分子流行病学研究。但其检出率高低受许多因素影响,如碱基改变的类型,所有的颠换能导致构象改变,而转换不能^[4];电泳温度和凝胶浓度等。由于它不能确定碱基改变的准确数量或改变的位点,突变位点的准确定位必须依靠直接测序来完成,而本实验未对 SSCP 异常结果进行测序,故尚不能对这一结果作出肯定的结论。

本研究用 SSCP 技术检测了 3 个民族正常人 PARP-1 基因多态性。用这种方法在布依族和壮族人群中共检出 4 人有异常带型,且异常泳动带均位于 2 条正常单链带的后方,这有可能是同一种类型的变异,说明人 PARP-1 基因外显子 20 在不同民族间可能存在多态性。虽然 PARP-1 基因的多个外显子上均有可能存在多态,但不同的人群其多态可表

(下转第 438 页 to page 438)

上有几种不同的核心序列,并按一定的规律串联排列,这种排列模式称为模块结构(modular structure)^[7]。序列分析表明广东汉族人群 DYF155S1 基因座 3'端模块结构有 2 种: 43 和 4343, DYF155S1 基因座 5'端则有 3 种: 13、313、31313^[5],进一步说明了 DYF155S1 基因座 3'端变异较 5'端较低。与 Y-STR 基因座多态性比较: DYF155S1 基因座 3'端多态性比单个 Y-STR 基因座多态性高^[8],比多个 Y-STR 基因座组成的单倍型多态性略低^[5, 8];本实验将同 1 个人的 DYF155S1 基因座 3'端等位基因与庾蕾等^[5]调查的 5'端等位基因结合起来分析,发现有 142 种等位基因,其中 127 种等位基因只出现 1 次,基因多样性(h)为 0.9960,因此将 DYF155S1 基因座 3'端多态性与 5'端多态性结合起来,将会进一步提高该基因座的基因多样性,在法医实践有较好的应用前景。

本实验在引物 5'端用 6-FAM (6-carboxyfluorescein) 标记即荧光标记 MVR-PCR 方法获得相应男性个体的 DYF155S1 基因座分型图谱,而且同时采用银染方法获得与荧光标记 MVR-PCR 方法一致的分型结果。另外,本实验采用普通、经济的 Taq Plus 酶和 BioStar Taq 酶即可扩增出目的片段。本方法简便,经济, DNA 分型清晰,利于在法医学实践中应用和推广。

本方法采用荧光标记 MVR-PCR 方法不需要等位基因分型标准物作对照,更简便;同时,若将 1 型和 4 型核心序列特异引物标记不同颜色的荧光,在 ABI377 测序仪或其他的 DNA 自动分析上同一

泳道上电泳,将会提高工作效率和本基因座基因多态性的揭示能力。

参考文献:

- [1] Jobling M A, Bouzekri N, Taylor P G. Hypervariable digital DNA codes for human paternal lineages: MVR-PCR at the Y-specific minisatellite, MSY1 (DYF155S1) [J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(4): 643.
- [2] 庾 蕾, 黄艳梅, 伍新尧. 中国汉族人群 DYF155S1 位点等位基因结构研究[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2003, 24(1): 42.
- [3] 王保捷, 丁 梅, 赵 东, 等. 中国汉族与日本群体 DYF155S1 基因座的遗传多态性[J]. *中国法医学杂志*, 2002, 17(2): 67.
- [4] Jeffreys A J, Macleod A, Tamaki K, *et al*. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing[J]. *Nature*, 1991, 354(350): 204.
- [5] 庾 蕾, 伍新尧, 黄艳梅, 等. 用荧光标记 MVR-PCR 方法研究中国汉族人群 DYF155S1 基因座多态性[J]. *遗传学报*, 2003, 30(1): 15.
- [6] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. *Genetics*, 1989, 1239 (3): 585.
- [7] Dupuy B M, Andreassen R, Frones A G, *et al*. Y-chromosome variation in a Norwegian population sample [J]. *Forensic Sci Int*, 2001, 117 (3): 163.
- [8] 郑秀芬, 程俊峰, 叶 健, 等. 4 个 Y-STR 基因座的多态性及其法医学应用的研究 [J]. *遗传学报*, 2002, 29 (2): 95.

(编辑 黄小延)

(上接第 434 页 form page 434)

现在不同的外显子上。由于不同民族不同地区的人群,其遗传物质本身存在差异或长期地理隔离造成的生存环境的差异导致遗传物质的差异,其多态性可能会存在着民族间、地域间的差异^[5]。这对于研究不同民族的亲缘关系以及民族起源问题都有重要的科学价值。因此,进一步研究不同民族不同地区人群的 PARP-1 基因多态性分布的性质和特点,对明确其功能具有重要意义。

参考文献:

- [1] 任泽舫, 庄志雄. 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶、细胞凋亡与肿瘤[J]. *肿瘤防治研究*, 2000, 27(3): 236.

(编辑 黄小延)

- [2] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 108 ~ 109.
- [3] Hayashi K. PCR-SSCP: a method for detection of mutations[J]. *GATA*, 1992, 9(3): 73.
- [4] Chandler L J, Nordoff N G. Identification of genetic variation among St. Louis encephalitis virus isolates, using single-strand conformation polymorphism analysis[J]. *J Virol Methods*, 1999, 80(2): 169.
- [5] 郭奕斌, 杜传书. 中国汉族群体 MPSIV A 型 Stu I 位点的遗传多态性 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2003, 24(1): 23.