

doi:10.3969/j.issn.1673-9833.2012.06.024

基于磁性纳米颗粒微阵列技术的 MT-2A 基因 启动子单核苷酸多态性分析

荣高翔, 傅娟

(湖南工业大学 绿色包装与生物纳米技术应用重点实验室, 湖南 株洲 412007)

摘要: 根据高通量检测手段对冶炼作业人群中金属硫蛋白 MT-2A 基因启动子核心区域进行单核苷酸多态性 (SNP) 分析。通过磁性纳米颗粒微阵列技术对冶炼作业工人 (288 例) 的 MT-2A 基因启动子位点进行高通量 SNP 检测, 并进行测序验证。结果表明: 该冶炼作业人群中 MT-2A 基因启动子核心区域的 3 种基因型 (AA, AG 和 GG) 频率分别为 87.4%, 11.8% 和 0.8%, 等位基因 (A 和 G) 频率分别为 93.2% 和 6.8%。该人群 MT-2A 基因型与等位基因频率均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡检测 ($p>0.05$)。最后, 利用直接测序法对 PCR 产物进行测序, 所得结果与 SNP 分析结果一致。

关键词: 磁性纳米颗粒; 微阵列技术; 金属硫蛋白; 单核苷酸多态性

中图分类号: Q524+.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9833(2012)06-0100-05

Analysis of Single Nucleotide Polymorphism in the Promoter of MT-2A Gene by Magnetic Nanoparticle-Based Microarray Technology

Rong Gaoxiang, Fu Juan

(Key Laboratory of Green Packaging and Biological Nanotechnology, Hunan University of Technology,
Zhuzhou Hunan 412007, China)

Abstract: By high throughput detection means, the single nucleotide polymorphisms (SNPS) analysis is conducted on metallothionein MT-2A gene promoter core region of metallurgy operation population. The MT-2A gene promoter sites of metallurgy workers (288 cases) are carried on high throughput SNP detection by magnetic nanoparticles microarray technology, and the sequencing test is also made. The results show that three genotypes (AA, AG and GG) frequency of the MT-2A gene promoter core region in the workers are 87.4%, 11.8% and 0.8%, and alleles (A and G) frequency are 93.2% and 6.8%, respectively. The MT-2A genotype and allele frequencies are consistent with Hardy-Weinberg equilibrium ($p>0.05$). Finally applies the direct sequencing method for PCR product sequencing test, and the obtained results are consistent with the result of SNP analysis.

Keywords: magnetic nanoparticles; microarray technology; metallothionein; single nucleotide polymorphism

收稿日期: 2012-09-12

基金项目: 湖南省教育厅基金资助项目 (10C0629), 湖南省自然科学基金资助项目 (11JJ5011)

作者简介: 荣高翔 (1988-), 男, 湖南常德人, 湖南工业大学硕士生, 主要研究方向为环境生物医学工程,

E-mail: rgx3233052@163.com

0 引言

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是重金属代谢应答反应中一类重要的小分子蛋白。根据等电点和氨基酸组成的不同,发现MT基因在哺乳动物中至少有MT-1, MT-2, MT-3和MT-4等4种主要形式^[1]。其中MT-1和MT-2基因表达范围最广,几乎存在于哺乳动物的所有器官或组织中,尤以肝、肾细胞为主,而且主要被镉特异性诱导^[2-3]。在正常水平下,MT-2A基因型的表达量多于MT-1基因,约占所有金属硫蛋白异构体表达量的50%^[4]。有报道表明,造成MT-1与MT-2A基因表达量的差异,可能与MT-2A基因启动子区域的增强子活性较强有关^[5]。针对美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中人类MT-2A基因已发现的27个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNPs)位点中,核心启动子区域TATA盒附近-5A/G(rs 28366003) SNP位点备受关注。本文拟对湖南省株洲市某冶炼厂作业人群外周血中MT-2基因核心启动子区域TATA盒附近-5A/G的SNP位点进行检测,分析该人群中基因型分布特点,以期为深入探讨我国汉族人群MT-2A基因多态性特点提供一定参考,也可为进一步探讨MT-2A基因在重金属毒性易感中的作用奠定一定基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

以湖南株洲某冶炼厂作业工人共288例为研究对象(均为汉族);其中,男性176例,平均年龄为(42.52 ± 14.20);女性112例,平均年龄为(38.81 ± 12.48),在研究对象知情并同意下,各抽取外周静脉血5 mL,经EDTA抗凝处理后,于-80℃保存,以备基因组DNA提取。

1.2 主要材料与仪器

MT-2A基因扩增上游引物(FP)5'-GGG CCG CCT TCA GGG AAC TG-3',生物素修饰的下游引物(bio-RP)5'-bio-GGA CTT GGA GGA GGC GTG GT-3';检测等位基因特异性的野生型荧光探针(W-probe) Cy3-CGCTGCACTCCAC和突变型荧光探针(T-probe) Cy5-CGCTGCGCTCCAC;上述引物和探针均由上海生工生物工程有限公司标记并合成;γ-氨基丙基三乙氧硅烷(γ-Aminopropyltriethoxysilane, APTS)和戊二醛均购于Sigma公司;杂交液和链霉亲和素均购于上海生工生物工程有限公司;粒径约100 nm的SiO₂/(PMMA/Fe₃O₄)(polymethylmethacrylate, PMMA)磁

性纳米颗粒为本实验室自备;所有化学试剂均为国产分析纯;Taq DNA聚合酶、DNA marker、dNTP为Promega产品;琼脂糖购于上海生工BBI公司;PTC220型PCR扩增仪为MJ Research公司产品;GenePix 4100A荧光扫描仪为美国Axon仪器公司产品;Nano2 Plotter型点样仪为美国Affymetrix产品。

1.3 基因组DNA的提取与鉴定

人外周血基因组DNA提取采用改良碘化钾方法,DNA含量和纯度鉴定采用核酸蛋白定量仪和琼脂糖凝胶电泳法。具体方法是取EDTA-Na₂抗凝外周血400 μL加至1.5 mL离心管中,加灭菌去离子水900 μL,10 000 r/min离心5 min,弃去上清液;在沉淀中加入5 mol/L KI溶液100 μL,旋涡振荡使其充分溶解,静置2 min;加入质量分数为0.9%的NaCl溶液300 μL,氯仿/异戊醇(24:1)750 μL,旋涡震荡,充分混匀,静置2 min;12 000 r/min离心5 min,吸取上清液;在上清液中加入400 μL异丙醇,轻轻混匀,10 000 r/min离心5 min,弃去上清液;在沉淀中加入1 000 μL体积分数为70%的冰乙醇,10 000 r/min离心5 min,弃去乙醇,在真空冷冻干燥仪中干燥;加入80 μL灭菌去离子水或TE,55℃水浴30 min溶解;鉴定则是取5 μL DNA工作液用质量分数1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA片段的完整性;最后将提取的基因组DNA置于-20℃冰箱冷冻储存。

1.4 磁性纳米颗粒表面的引物连接

利用APTS与戊二醛在SiO₂/(PMMA/Fe₃O₄)磁性纳米颗粒表面修饰上醛基,然后取修饰醛基的磁性颗粒10 mg加入含体积分数10%亲合素的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)2.5 mL中,于37℃下孵育3 h。将10 μmol/L生物素标记的50 μL下游引物加入包被亲合素的磁性纳米颗粒中,室温下孵育1 h,并将该溶液不断振荡混匀。反应结束后,用外加磁场将颗粒从反应介质中分离出来,并用PBS溶液反复清洗产物,最后以4.0 mg/mL的质量浓度分散在PBS溶液中备用。

1.5 基于磁性纳米颗粒表面的基因特定片段PCR扩增及鉴定

30 μL PCR反应体中含有10 × PCR缓冲液3 μL,1.25 mmol/L MgCl₂,0.2 mmol/L dNTP,0.3 mmol/L上游引物,12.5 μL连接下游引物的磁性纳米颗粒悬液,1.25 U的Taq DNA聚合酶(5 U/μL)和基因组DNA 50 ng。PCR扩增条件为:95℃预变性5 min;94℃变性1 min,60℃退火1 min,72℃延伸1 min,共35个循环;最后在72℃再延伸10 min。将PCR反应产物于95℃变性5 min,置于冰上骤冷,用外加磁场将颗粒从溶液

中分离出来, 上清液通过质量分数 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 100 V, 20 min, 溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 染色, 用 Gel Doc 2001 型凝胶成像仪观察并记录扩增结果。

1.6 双色荧光杂交的微阵列 SNP 分型

参考文献[6]的方法进行 SNP 分型检测, 即将固定有 ssDNA 的磁性纳米颗粒反复清洗后, 分别加入 10 mmol/L 荧光标记探针 W-probe 和体积分数 T-probe 各 1 μ L 与杂交液混匀后于 37 $^{\circ}$ C 杂交 1 h, 然后经柠檬酸钠溶液 (saline sodium citrate, SSC) 和体积分数 0.1% 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS), 反复清洗后, 将其均匀地分散于 15 μ L 体积分数 3%SSC 缓冲液中, 于 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 置于冰上骤冷, 磁分离后吸取上清液点样于干净的载玻片上, 经荧光扫描仪扫描分析, 获得样品分型图像, 并经分析软件 Genepix 6.0 分析后转化为数据。

1.7 测序验证

根据磁性纳米颗粒微阵列 SNP 分型结果, 各抽取 1 份 MT-2A 基因的多态等位基因型 (AA 型、AG 型、GG 型) 的 PCR 扩增产物, 送上海生工生物工程有限公司直接测序, 以验证其分型的准确性。

1.8 数据处理

数据采用统计分析软件包 SPSS 16.0 处理。应用拟合优度 χ^2 检验 MT-2A 基因型频数是否符合 Hardy-Weinberg (H-W) 遗传平衡定律。

2 结果

2.1 基因组 DNA 的鉴定

图 1 为基因组 DNA 产物。如图所示, 改良 KI 法提取后的 DNA 产物经质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳检测发现, 8 个样品均具有一条较清晰的泳带, 说明基因组 DNA 产物的提取合格, 可以用于进行 PCR 的扩增。

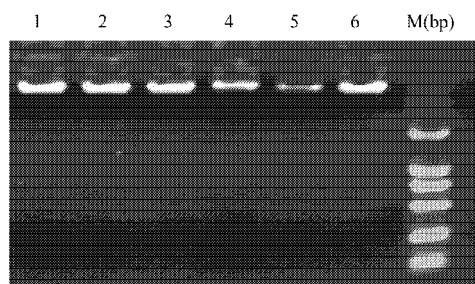


图 1 基因组 DNA 产物的 1% 琼脂糖电泳图
Fig. 1 The 1% agarose pattern of DNA products

2.2 磁性纳米颗粒介导的 MT-2A 基因 PCR 扩增

图 2 为 PCR 扩增产物的电泳图。如图所示, 磁性

纳米颗粒介导的 MT-2A 基因 PCR 扩增产物经质量分数 2% 琼脂糖凝胶电泳检测发现, 与标准分子量 Marker 条带相比, 各泳道中均在约 222 bp 大小相对应位置有一条清晰的亮带, 说明磁性纳米颗粒表面介导的 PCR 反应体系中能扩增出所需的片段。

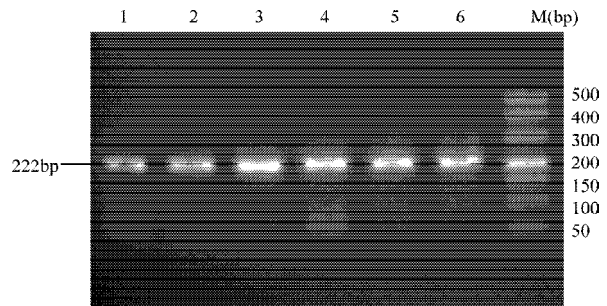


图 2 PCR 扩增产物的 2% 琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 2 The 2% agarose gel pattern of PCR products

2.3 基于磁性纳米颗粒微阵列技术的 MT-2A 基因 SNP 分型

图 3 为 PCR 产物的荧光信号扫描图。如图所示, 经荧光扫描仪检测获得双色荧光杂交微阵列芯片中 SNP 分型信号呈现的绿色、黄色和红色分别代表随机 6 个样品在 MT-2A 基因 rs28366003 位点的 3 种基因型。其中样品 S1, S2, S3 的绿色信号代表 AA 基因型; 样品 S4, S5 的黄色信号代表 AG 基因型; 样品 S6 的红色信号代表 GG 基因型。虽然不同的样品具有不同的荧光强度, 但该分型结果均具有较高的正错配信号比。

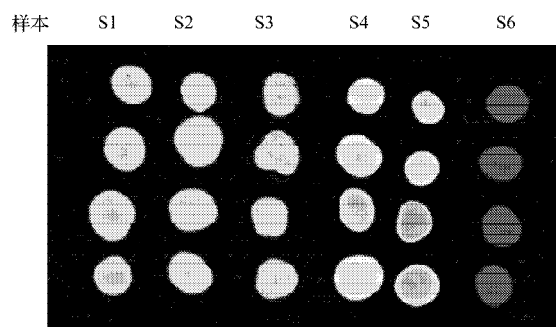


图 3 M-2A 基因 rs28366003 位点 SNP 分型荧光信号扫描图
Fig. 3 The fluorescence signal scanning of MT-2A gene rs28366003 site SNP genotyping

2.4 直接测序验证

针对基于磁性纳米颗粒微阵列技术的 MT-2A 基因 SNP 分型检测结果, 选取 S1, S4, S6 进行直接 PCR 产物的测序, 结果如图 4 所示。在 MT-2A 基因 rs28366003 位点处 (方框标注处), 样品 S1 只检测到单一的 A 峰, 显示其为 AA 基因型; 样品 S4 在该处同时检测到 A 峰和 G 峰, 显示其为 AG 基因型; 而样

品 S6 只检测到单一的 G 峰, 表明其为 GG 基因型。其测序结果与基于磁性纳米颗粒微阵列技术的 MT-2A 基因 SNP 分型结果完全一致。

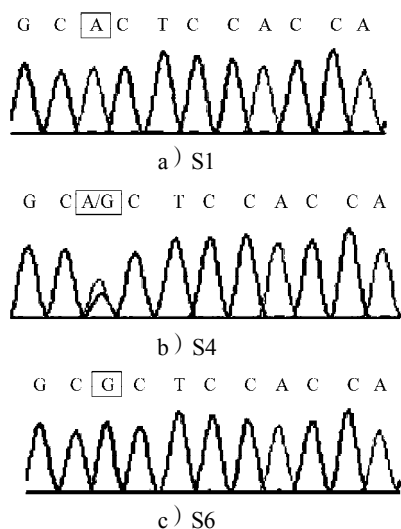


图4 样品 S1, S4, S6 测序图

Fig. 4 The sequencing graph of sample S1, S4 and S6

2.5 MT-2A 基因型和等位基因频率分析

MT-2A 基因型和等位基因频率分析如表 1 所示, 288 个样品的基因型 (AA 型, AG 型和 GG 型) 频率分别为 87.4%, 11.8% 和 0.8%。其等位基因 A 和 G 的频率分别为 93.3% 和 6.7%。经拟合优度 χ^2 检验, 该人群 MT-2A 基因型与等位基因频率均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡 ($p > 0.05$)。

表 1 MT-2A 基因基因型和等位基因频率分布

Table 1 The distribution of genotype and allele frequencies of MT-2A gene

| 样本 n/例 | 基因型频率 (95% CI) | | | | | | 等位基因频率 (95% CI) | | | | | | χ^2 |
|-----------|----------------|------|----|------|----|-----|-----------------|------|----|-----|-------|--|----------|
| | AA | | AG | | GG | | A | | G | | | | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | | | |
| 288 | 251 | 87.4 | 34 | 11.8 | 3 | 0.8 | 536 | 93.3 | 40 | 6.7 | 0.058 | | |

3 结语

MT 基因是机体内重金属应答反应中的一类重要基因, 在机体中的表达水平可反映该基因的应答功能。而基因表达主要由核心启动子区域的顺式作用元件和 TATA 盒决定。金属硫蛋白的核心启动子区域包括金属反应元件 (MREs)、糖皮质激素反应元件 (GRE)、抗氧化反应元件 (ARE)、环磷酸腺苷反应元件 (cAMP)、组织纤维蛋白溶酶原激活剂 (TPA) 反应元件和干扰素反应元件。在人体 MT-2A 基因上游区域中, 至今发现了 7 个金属反应元件 (MREa 到 MREg)。在 TATA 盒附近, 金属转录因子 (MTF-1)

激活金属硫蛋白启动子区域的金属反应元件 (MREs) 进行转录。当人体暴露于金属或氧化压力下时, 金属转录因子便会被激活并实现上述金属反应元件的转录。而 MT 基因的转录需要 MER 进行调控。相较于其他普通区域的基因, 位于核心启动子区域, 特别是在 TATA 盒附近的基因发生突变将使目的基因的表达产生更大的影响, 会降低 MTF-1 结合 MREs 的亲合力, 并减少金属硫蛋白基因的转录^[7]。K. Kita 等研究发现人群 MT-2A 基因启动子区域 -5A/G 的 SNP 分型与体内 MT-2A 基因的转录水平表达减少密切相关^[8]。因此, 本文研究 MT 基因核心启动子区域的多态性分布特点具有重要意义。

本研究通过应用基于磁性纳米颗粒微阵列技术对 MT-2A 基因 rs28366003 位点进行 SNP 分型具有高效、简单和廉价的特点。随机选取的 288 例冶炼作业工人血液样本中, 大多数个体具有 AA 基因型, 为 251 例; AG 基因型为 34 例, GG 基因型为 3 例。经检验, 该人群 MT-2A 基因型与等位基因频率均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。有研究报道, GG 基因型个体比 AA 基因型个体有较低含量的锌和较高的镉与铅, 推测 GG 基因型个体可能对重金属毒性易感^[9]。本研究初步探讨冶炼作业人群中 MT-2A 基因核心启动子区域 SNP 分型分布特点, 对深入大规模研究我国重金属暴露人群的 MT-2A 基因功能具有重要意义。关于 MT-2A 基因的 SNP 位点与重金属毒性易感是否存在关联有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Miles A T, Hawksworth G M, Beattie J H, et al. Induction, Regulation, Degradation, and Biological Significance of Mammalian Metallothioneins[J]. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 2000, 35(1): 35-70.
- [2] Cherian M G, Jayasurya A, Bay B H. Metallothioneins in Human Tumors and Potential Roles in Carcinogenesis[J]. Mutat. Res., 2003, 533(1/2): 201-209.
- [3] Wolff N A, Lee W K, Abouhamed M, et al. Role of ARF6 in Internalization of Metal-Binding Proteins, Metallothionein and Transferrin, and Cadmium-Metallothionein Toxicity in Kidney Proximal Tubule Cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2008, 230(1): 78-85.
- [4] Skroch P, Buchman C, Karin M. Regulation of Human and Yeast Metallothionein Gene Transcription by Heavy Metal Ions[J]. Prog. Clin. Biol. Res., 1993, 380: 113-128.
- [5] Samson S L, Gedamu L. Molecular Analyses of Metallothionein Gene Regulation[J]. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 1998, 59: 257-288.

- [6] 刘洪娜, 李松, 王志飞, 等. 一种基于磁性纳米粒子 PCR 的高通量 SNP 分型方法[J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(6): 1035-1038.
Liu Hongna, Li Song, Wang Zhifei, et al. High-Throughput SNP Genotyping Method with PCR on Magnetic Nanoparticles[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2007, 28(6): 1035-1038.
- [7] Koizumi S, Suzuki K, Ogra Y, et al. Transcriptional Activity and Regulatory Protein Binding of Metal-Responsive Elements of the Human Metallothionein-IIA Gene[J]. Eur. J. Biochem, 1999, 259(3): 635-42.
- [8] Kita K, Miura N, Yoshida M, et al. Potential Effect on Cellular Response to Cadmium of a Single-Nucleotide A → G Polymorphism in the Promoter of the Human Gene for Metallothionein IIA[J]. Hum. Genet., 2006, 120: 533-560.
- [9] Kayaalti Z, Mergen G, Söylemezoğlu T. Effect of Metallothionein Core Promoter Region Polymorphism on Cadmium, Zinc and Copper Levels in Autopsy Kidney Tissues from a Turkish Population[J]. Toxicol App Pharmacol, 2010, 245(2): 252-255.

(责任编辑: 申剑)

(上接第 33 页)

- Phase Circuit[J]. Electrical Measurement & Instrumentation, 2008(1): 4-7.
- [2] 陆秀令, 张松华, 曹才开, 等. 单相电路谐波及无功电流新型检测方法[J]. 高电压技术, 2007, 33(3): 163-166.
Lu Xiuling, Zhang Songhua, Cao Caikai et al. New Detecting Method for Harmonics and Reactive Currents in Single-Phase Circuits[J]. High Voltage Engineering, 2007, 33(3): 163-166.
- [3] 戴朝波, 林海雪, 雷林绪. 两种谐波电流检测方法的比较研究[J]. 中国电机工程学报, 2002, 22(1): 80-84.
Dai Chaobo, Lin Haixue, Lei Linxu. A Study on the Comparison of Two Harmonic Current Detecting Methods [J]. Proceedings of the CSEE, 2002, 22(1): 80-84.
- [4] 李圣清, 罗晓东, 李永安, 等. 基于前向线性预测理论的混合电力滤波器谐波电流预测方法[J]. 中国电机工程学报, 2011, 31(34): 100-104.
Li Shengqing, Luo Xiaodong, Li Yongan, et al. A Harmonic Current Forecasting Method for Hybrid Active Power Filters Based on the Forward Linear Prediction Theory[J]. Proceedings of the CSEE, 2011, 31(34): 100-104.
- [5] 张国荣, 王英. 自适应神经网络在谐波电流检测中的应用[J]. 电力系统及其自动化学报, 2010, 22(3): 46-49.
Zhang Guorong, Wang Ying. Application of Adaptive Neural Networks in Harmonic Current Detection[J]. Proceedings of the Chinese Society of Universities for Electric Power System and Its Automation, 2010, 22(3): 46-49.
- [6] 段文杰, 张建伟. 基于单位功率因数的谐波电流检测与仿真[J]. 农业与技术, 2012, 32(5): 227-228.
Duan Wenjie, Zhang Jianwei. Harmonic Current Detection and Simulation Based on the Unit Power Factor[J]. Agriculture and Technology, 2012, 32(5): 227-228.
- [7] 吕晓琴, 张秀峰, 章春军. 无锁相环单相电路谐波及无功电流综合检测新方法[J]. 电力系统保护与控制, 2010, 38(6): 45-48.
Lü Xiaoqin, Zhang Xiufeng, Zhang Chunjun. New Detecting Method of Harmonics and Reactive Currents in Single Circuit without Phase Lock Loop[J]. Power System Protection and Control, 2010, 38(6): 45-48.
- [8] 丁菊霞, 张华俊, 张秀峰. 基于平均值理论的无锁相环单相电路谐波电流检测方法[J]. 电力系统保护与控制, 2010, 38(13): 26-30.
Ding Juxia, Zhang Huajun, Zhang Xiufeng. A Harmonics-Detection Method without PLL and Based on Average Theory in Single-Phase Circuit[J]. Power System Protection and Control, 2010, 38(13): 26-30.
- [9] 赵琛. 一种优化的基于 i_p-i_q 法的谐波电流检测方法[J]. 工矿自动化, 2010(12): 43-46.
Zhao Chen. An Optimized Harmonic Current Detection Method Based on i_p-i_q Method[J]. Industry and Mine Automation, 2010(12): 43-46.
- [10] 李天博, 孙雨华, 廖志凌. 一种单相电路无功电流实时检测新方法的研究[J]. 电测与仪表, 2003(7): 8-11.
Li Tianbo, Sun Yuhua, Liao Zhiling. Study on a New Detecting Method for Instantaneous Reactive Currents in Single-Phase Circuit[J]. Electrical Measurement & Instrumentation, 2003(7): 8-11.

(责任编辑: 申剑)