

应用 DHPLC 检测多巴胺 D₂受体基因在 中国人人群中的多态性^X

凌代俊¹,冯雁²,张岩²,黄爱群¹,徐希平^{1,2}

(1. 中国科学技术大学生命科学学院,安徽合肥,230027;2. 安徽医科大学生物医学研究所,安徽合肥,230031)

摘要:通过变性高效液相色谱(DHPLC)和DNA测序在41个中国汉族人DNA样本中检测DRD2基因编码区和拼接区的单核苷酸多态性(SNP),结果发现3个SNP: Intron5的+277G/A、Exon7的+42C/T和Exon7的+129T/C。Intron5 +277G/A是在中国汉族人群中发现的新SNP,Exon7 +42C/T和+129T/C在NCBI dbSNP中已有相应记录(分别为rs4986921和rs6275),它们均导致DRD2基因的同义突变,其中Exon7 +129C等位基因频率在研究样本中高达43.9%。这些结果为在中国汉族人群中开展DRD2基因相关的群体遗传学研究提供了遗传标记。另外,还探讨了DHPLC检测突变的干扰因素及控制措施,为国内同行开展类似工作提供参考。

关键词:变性高效液相色谱;DHPLC;多巴胺D₂受体;单核苷酸多态性

中图分类号:Q319.1,R394.33

文献标识码:A

0 引言

单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism,SNP)是自然存在于基因组中的、稳定的并有着广泛分布的单碱基变异,是个体间差异的主要遗传基础之一。SNP作为一种重要的遗传标记已成为功能基因组学研究的重要目标之一,特别是在复杂性疾病的易感基因定位研究中应用广泛^[1,2]。目前,已有多种技术可以用于未知SNP的检测,如化学裂解法、单链构象多态性(SSCP)、杂合双链分析(HTX)、变性梯度电泳(DGGE)、DNA序列测定、DNA芯片技术^[3]以及质谱法^[4]等。但这些技术有的敏感性较低、有的操作复杂或费用较高,难以广泛应用。近年发展起来的变性高效液相色谱(Denaturing High Performance Liquid Chromatography, DHPLC)技术是一种方法简便、可自动化操作、快速高效、95%以上的敏感性以及适合大片段PCR产物等特点的SNP检测手段^[5~7]。变性高效液相色谱又称为温度调控的杂合双链色谱(Temperature Modulated Heteroduplex Chromatography, TMHC)^[8],可在部分变性的温度下,通过离子反相高效液相色谱技术检测到不完全匹配的杂合双链。

多巴胺D₂受体(Dopamine Receptor D₂, DRD₂)是脑多巴胺神经系统中的主要成员之一,

X 收稿日期:200326217

作者简介:凌代俊,男,1970年生,硕士,E-mail:djlng@ustc.edu

DRD2 基因位于染色体 11q23 区,全长 270 kb,共有 8 个外显子,其中外显子 1(非编码区)和其它外显子间有 250 kb 的间隔.研究表明 DRD2 基因多态性可能与精神分裂症^[9]、帕金森病^[10]、肌张力障碍^[11]、药物成瘾^[12]等多种神经系统疾病的发生有关.为在中国人群开展 DRD2 基因相关的遗传学研究提供遗传标记,我们通过 DHPLC 方法和 DNA 序列测定在 41 个中国汉族人基因组 DNA 中检测了 DRD2 基因的编码区和外显子拼接区的突变.

1 材料和方法

1.1 DNA 样本

采用 41 个人类基因组 DNA 样本.基因组 DNA 样本由安徽医科大学生物医学研究所提供,原始样本随机选取于安徽安庆地区的汉族人群.DNA 样本提供者均为健康个体.

1.2 PCR 反应

采用 Primer3 软件设计了 9 对 PCR 引物,包含 DRD2 基因的 7 段编码区(Exon2~Exon8)和部分与外显子相接的内含子片段.每对引物与 DRD2 基因各外显子的相对位置见图 1,引物序列及扩增片段大小等见表 1.为提高检出率并加快检测速度,我们将 3 个不同样

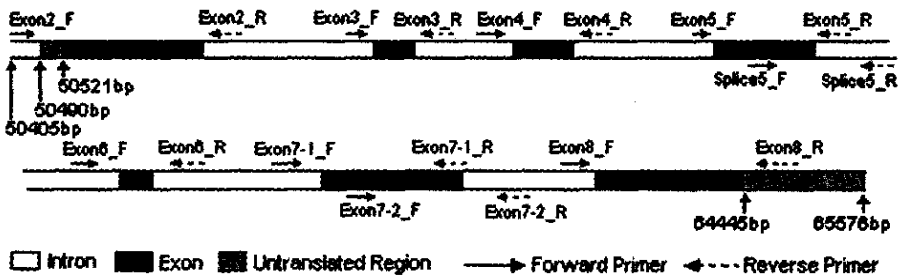


图 1 9 对 PCR 引物在 DRD2 基因中的相对位置 (DRD2 基因的参考序列为 NCBI-035088)

Fig 1 Nine pair primers were used to covering the coding regions and splicing regions of DRD2 gene (The reference sequence of DRD2 gene is from NCBI-035088)

表 1 引物序列,PCR 退火温度及 DHPLC 预测变性温度

Tab. 1 Primer sequences, PCR annealing temperatures and DHPLC melting temperatures predicted by DHPLC melt program

引物名称	引物序列		片断大小 bp	PCR T _m /	DHPLC R T _m /
	正向(5' 3')	反向(5' 3')			
Exon2	ttaatgccaggagtgtgctt	agccagtggggagctagagt	484	61	52, 57, 62
Exon3	gaagataagcggggcgaag	gcacagcatcacagacagag	401	62	62
Exon4	tgattaagtgttggccttgc	cagggtagtataggcctccat	472	61	57, 62
Exon5	gggctcttggaaattatgg	ccccacctgagcataaagat	340	58	62
Splice5	gtcacccctgctgtctacatca	ccgccttcagtcacaagat	378	61	61
Exon6	ctcctgatctctgagcccttct	tgtctcattcatgctctct	383	61	61
Exon721	ctgtggtgttgcaggagtctt	tgagtggcttctctctctct	420	57	63
Exon722	accatggtctccacagcact	gggtcctcttggcaggttt	432	61	61
Exon8	caccgtcttggcatacag	aagaggaggccgatccac	403	61	63

品进行等量混合,由混合样品进行 PCR“共”扩增. 30 μL 的 PCR 反应体系包括 50 ng 模板 DNA, 3 μL 的 10 \times PCR buffer(含 15 mM MgCl_2 , Applied Biosystems, CA, USA), 200 μM dNTP, 正向和反向引物各 240 nM, 0.58U HotStar TaqTM(QIAGEN, CA, USA). PCR 循环按常规程序进行, 不同引物的 PCR 退火温度见表 1.

1.3 DHPLC 分析

PCR 产物不作任何纯化处理,直接用于 DHPLC 分析. 各个扩增片段在 DHPLC 上运行的部分变性温度(T_m)由相应的野生型 DNA 片段(来自 DRD2 基因的参考序列)根据 DHPLC Melt 程序(<http://insertion.stanford.edu/melt.html>)进行预测. 每个 PCR 产物的 DHPLC 预测部分变性温度(Recommended Temperature, $R T_m$)见表 1. 实际运行包括 $R T_m - 2$ 、 $R T_m - 1$ 、 $R T_m$ 、 $R T_m + 1$ 和 $R T_m + 2$ 共 5 个部分变性温度,对于呈现突变或怀疑突变峰型的样品进一步在 50 (非变性温度)下检测,以排除可能存在的非特异性 PCR 产物所致的干扰峰. DHPLC 分析仪器为 Agilent 1100 HPLC(Agilent Technologies, USA), DNA 分离柱为 Eclipse dsD2 NA 分析柱(Agilent Technologies, USA). 流动相由 A 液(含 0.1 mM 乙二胺四乙酸, EDTA 和 0.1 M N_2 三乙基乙酰胺, TEAA)和 B 液(含 0.1 mM EDTA, 0.1 M TEAA 和 25% 乙腈)按设定梯度自动混合而成. 分离组分的检测由 260 nm 的紫外信号检测系统完成. 一次分析取 PCR 产物 3 ~ 5 μL (视 PCR 产物浓度而定),流动相的梯度为 8 min 内使 B 液由 60% 升至 80%,流速为 0.4 mL/min,完成一次分析和 DNA 分离柱的平衡与再生需要 15 min. 整个 DHPLC 分析自动完成.

1.4 DNA 序列分析

对于 DHPLC 分析中出现有双峰(或可疑双峰)的部分 PCR 产物进行 DNA 序列测定. 8 μL PCR 产物中加入 10 U 核酸外切酶(USB Corporation, OH, USA)和 2 U Shrimp Alkaline Phosphatase(USB Corporation, OH, USA),在 37 下反应 45 s, 90 15 min 终止反应. 5.1 μL 单向测序反应体系中包含 50 ng 处理后的 PCR 产物, 0.2 μM 正(或反)向引物, 2 μL 的 BigDye Terminator(含必要的 dNTP, ddNTP 及 DNA 聚合酶, Perkin Elmer 公司, MA, USA). 经过 33 个扩增循环,分别为 96 12 s, 50 5 s 和 60 4 min. 最后产物经两次的沉淀、洗脱和离心,在 ABI377 测序仪(Perkin Elmer 公司, MA, USA)上进行测序,测序结果在 SequencherTM3.1.1 软件上进行分析.

1.5 利用限制性片断长度多态性(RFLP)进行基因型检测

通过 DHPLC 检测发现并经序列分析验证明确的一个多态性(Exon7 +129T/C),可以被限制酶 Nco (New England Biolab, MA, USA)识别. 我们利用 RFLP 方法在 41 个 DNA 样本中进行了该多态性基因型的检测. PCR 产物中加入 3 U Nco , 37 酶切 14 h. 酶切产物在 EB 染色的 2% 琼脂糖凝胶中电泳分离,紫外灯下判断结果. +129T/C 野生型等位子被切割成 238bp + 182bp 两个片段,而突变型不能被切割(420 bp).

2 结果

图 2 为 DHPLC 分析结果. Exon2 ~ Exon6 和 Exon8 等片段在不同的部分变性温度条件下均得到对称性单峰(其代表峰形见图 2A),表明在这些区域没有突变存在. Exon722 片段在不同的部分变性温度下大部分的峰形呈现如图 2B 所示的大小两个峰,根据两峰的峰高比(约 0.09),

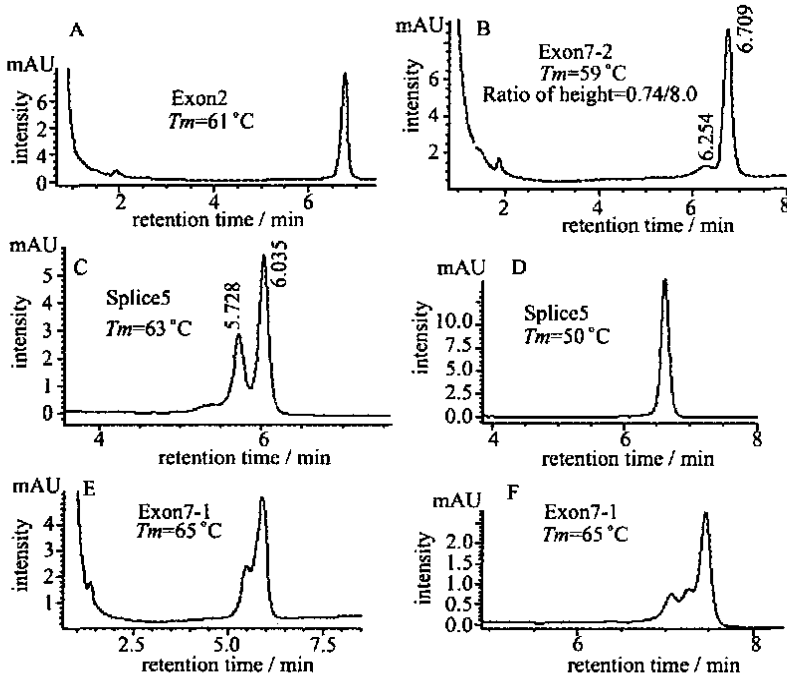


图 2 PCR 产物在变性和非变性温度下的 DHPLC 峰型

Fig. 2 DHPLC peaks

该小峰可能为 PCR 扩增的杂带. Splice5 片段和 Exon721 片段在部分变性温度下均检测到突变峰形(双峰或多峰),而相同 PCR 产物在 50 的非变性温度下仍为对称性单峰. 不同样品的 Splice5 片段在同一 DHPLC 运行条件下突变峰形基本相同(代表峰形见图 2C),提示 Splice5 片段具有单一类型的突变(即只有两种等位基因片段存在). 而 Exon721 片段的突变峰形有多种,如融合单峰、非典型的双峰和三峰等(图 2E 和 F). 这种同一 DHPLC 运行条件下的多种峰形,提示该片段可能有多个突变位点,或存在多种突变类型(即两种以上的等位基因片段存在).

DNA 序列分析发现,Splice5 片段在 341 位点存在一个 G/A 突变(图 3A),Exon721 片段在 154 位点存在一个 C/T 突变(图 3B),在 241 位点存在一个 T/C 突变(图 3C). 通过 Blast 分析,Exon721 片段中的 C154T 突变位于 DRD2 基因 Exon7 的 +42 位置,对应于 NCBI dbSNP 中的 rs4986921,使 DRD2 基因产生一个同义突变(CTC → CTT,编码 284 位的亮氨酸). T241C 突变位于 Exon7 的 +129 位置,对应于 dbSNP 的 rs6275,也是一个同义突变(CAT → CAC,编码 313 位的组氨酸). 而 Splice5 片段中的 G/A 突变位于 DRD2 基因 Intron5 的 +227 位置,NCBI dbSNP 中未见

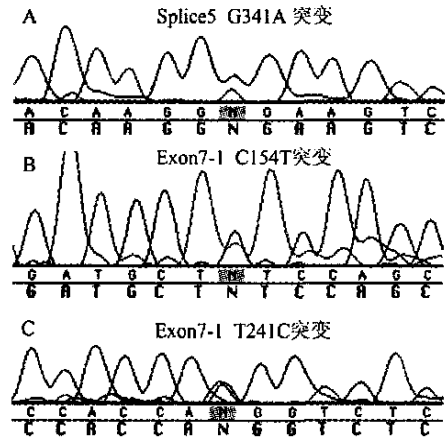


图 3 DNA 序列分析结果

Fig. 3 Mutations detected by DNA sequencing

有相应记录.

由于 Splice5 片段只有单类型突变,我们对照并结合测序结果,利用样品的 DHPLC 结果直接进行了等位基因频率估计.分析结果显示,Intron5 + 277 G/A 的基因型在我们的检测样本中 GG 型 36 人,AG 型 5 人,AA 型 0 人.等位子 + 277 - A 的频率为 6.1%. Exon721 片段存在多类型突变,难以通过 DHPLC 峰型进行等位基因频率估计,我们应用 RFLP 对该片段中 + 129T/C 位点进行了基因型分析.在 41 个 DNA 样品中 TT 型 16 人,TC 型 14 人,CC 型 11 人,其中 + 129 - C 等位子频率为 43.9%. Exon7 + 42C/T 突变频率没有进行估计.

3 讨论

DRD2 基因多态性可能和多种神经系统疾病的发生有关^[9~12],因此检测中国汉族人 DRD2 基因中的 SNP 对于在中国人群开展相关神经系统疾病的易感基因研究非常重要.通过 DHPLC 分析和 DNA 序列测定,我们在 DRD2 基因编码区及外显子与内含子拼接区检测到 3 个 SNP: Intron5 的 + 227 G/A 突变、Exon7 的同义突变 + 42C/T 和 + 129T/C,其中 Intron5 的 + 227 G/A 突变在 dbSNP 中未见有记录,是本次检测发现的新 SNP,而 Exon7 中的两个 SNP 分别对应于 NCBI dbSNP 中的 rs4986921 和 rs6275. + 129T/C 在我们的检测样本中有较高的突变频率(43.9%),提示该 SNP 可作为一个理想的遗传标记(Genetic Marker).我们在 DRD2 基因的 Exon2 ~ Exon6 和 Exon8 等区域未检测到突变.

DRD2 基因共有 8 个外显子,其中 Exon2 ~ Exon8 编码 DRD2 的 443 个氨基酸.其 mRNA 通过不同的拼接方式可以产生至少两种产物:D2S 和 D2L [13]. Exon6 (编码 29 个氨基酸)在 D2S 中没有参与编码.在实验设计中,我们特别延长了与 DRD2 基因 Exon6 拼接有关的 DNA 序列(分别为 Splice5 片段、Exon6 片段和 Exon721 片段,见图 1).我们在 DRD2 基因 Intron5 的 + 227 位置检测到一个 G/A 突变,在 Exon7 的 + 42 位置检测到一个 C/T 突变,其中 Exon7 中的 + 42C/T 突变距离 Intron6 和 Exon7 的剪切位置较近,与 DRD2 基因中 Exon6 的选择性剪切关系有待于进一步研究.

DHPLC 检测 DNA 突变主要是通过适当的部分变性温度和洗脱条件下使不匹配的异源双链 DNA 与匹配的同源双链 DNA 得以分离,因此对于单个纯合突变型 DNA 片段与单个纯合野生型 DNA 片段,DHPLC 不易分辨(均为单峰,出峰时间稍有差别).混合样品在 PCR “共”反应过程中易于促使突变型产物与野生型产物之间形成不匹配的异源双链,从而提高了 DHPLC 的突变检出率,同时也提高了 DHPLC 分析的效率. DHPLC 只能定性检测有无突变的存在,并不能根据峰型确定突变类型.但是在同样的检测条件下出现不同的峰型则代表不同的序列,受检样本出现相同的峰型提示它们的序列相同,据此可以用来估计突变频率^[14,15].在本研究中,我们通过 DHPLC 直接估计了 Intron5 的 + 227 G/A 的突变频率,等位基因 + 277A 的频率在我们的样本中为 6.1%.

另外,在 PCR2DHPLC 检测中,由于 PCR 产物中杂带的存在会导致目的峰周围出现干扰峰,这些干扰峰往往会误判为突变峰形.在实际检测中我们通过以下几种方法来排除干扰峰:()通过提高 PCR 反应的特异性以防止杂带的产生;()通过比较部分变性温度和非变性温度下的峰形来排除干扰峰.凡是在部分变性温度下呈现的双峰或多峰在 50 的非变性温度下同样表现出来,则提示有干扰峰的存在;()通过保留时间来判断有无干扰峰存

在,因突变引起的双峰或多峰的保留时间应相差不大;()通过峰高比来排除干扰峰的存在.如图 2B 所示双峰的峰高比约为 1/10,提示这一小峰可能为干扰峰.因为在三种单个 DNA 样品组成的混合样中,如果其中有一个或一个以上样品有突变存在,经 PCR 共扩增后,产物中的不匹配异源双链应接近于或超过 1/3(见图 2C).因此 1/10 的峰高比远离期望的峰高比.在对 Exon722 片段进行 PCR-DHPLC 重复检测时,未发现类似小峰的出现.

总之,我们利用 DHPLC 在部分中国汉族人的 DRD2 基因外显子和拼接区中共获得 3 个 SNP.由于我们的样本是来自中国安庆地区的汉族人群,检测结果在中国汉族人群中有很好的代表性.因此该结果对于今后开展 DRD2 基因相关的神经系统疾病遗传学研究或人群生态遗传学研究提供了基础资料.另外,本文还对 DHPLC 检测突变的干扰因素及控制措施进行了探讨,为国内同行开展类似工作积累了经验.

参 考 文 献

- [1] Collins F S, Patrinos A, Jordan E, *et al.*. New goals for the U. S. Human Genome Project: 1998-2003 [J]. *Science* 1998, 282 (5389):682-689.
- [2] Riley J H, Allan C J, Lai E, *et al.* The use of single nucleotide polymorphisms in the isolation of common disease genes [J]. *Pharmacogenomics*, 2000, 1(1):39-47.
- [3] Hacia J G, Brody L C, Collins F S. Applications of DNA chips for genomic analysis [J]. *Mol Psychiatry*, 1998, 3(6):483-492.
- [4] Krebs S, Medugorac I, Seichter D, *et al.*. A MALDI mass spectrometry-based method for SNP discovery [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(7):e37.
- [5] Gross E, Arnold N, Gøtte J, *et al.*. A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC [J]. *Hum Genet*, 1999, 105(12):727-738.
- [6] Spiegelman J I, Mindrinos M N, Oefner P J. High-accuracy DNA sequence variation screening by DHPLC [J]. *Biotechniques*, 2000, 29(5):1084-1090, 1092.
- [7] Wolford J K, Blunt D, Ballecer C, *et al.*. High-throughput SNP detection by using DNA pooling and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) [J]. *Hum Genet*, 2000, 107(5):483-487.
- [8] Oefner P J, Underhill P A. Comparative DNA sequencing by denaturing high performance liquid chromatography [J]. *Am J Hum Genet*, 1995, 57:266.
- [9] Schindler KM, Pato MT, Dourado A, *et al.*. Association and linkage disequilibrium between a functional polymorphism of the dopamine D₂ receptor gene and schizophrenia in a genetically homogeneous Portuguese population [J]. *Mol Psychiatry*, 2002, 7(9):1002-1005.
- [10] Wang J, Liu Z L, Chen B. Association study of dopamine D₂, D₃ receptor gene polymorphisms with motor fluctuations in PD [J]. *Neurology*, 2001, 56:1752-1759.
- [11] Klein C, Brin M F, Kramer P, *et al.* Association of a missense change in the D₂ dopamine receptor with myoclonus dystonia [J]. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1999, 96:5173-5176.
- [12] Noble EP. Addiction and its reward process through polymorphisms of the D₂ dopamine receptor gene: a review [J]. *Eur Psychiatry*, 2000, 15(2):79-89.
- [13] Gros B, Sokoloff P, Martres M P, *et al.*. Alternative splicing directs the expression of two D₂ dopamine receptor isoforms [J]. *Nature*, 1989, 342:923-926.
- [14] Arnold N, Gross E, Schwarz-Boeger U, *et al.*. A highly sensitive, fast, and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers [J]. *Hum Mutat.*, 1999, 14(4):333-339.
- [15] Wagner T, Stoppa-Lyonnet D, Fleischmann E,

et al.. Denaturing High Performance Liquid Chromatography Detects Reliably BRCA1 and

BRCA2 Mutations [J]. *Genomics*, 1999, 62: 3692376.

Mutation Detection of the DRD2 Gene in Chinese Population by Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) and DNA sequencing

LING Daijun¹, FENG Yan², ZHANG Yan², HUANG Ai2qun¹, XU Xi2ping^{1,2}

(1. School of Life Science, USTC, Hefei 230027, China)

(2. Institute of Biomedicine, Anhui Medical University, Hefei 230027, China)

Abstract : To provide available genetic polymorphisms for population genetics studies related to human dopamine receptor D2 (DRD2) gene in Chinese population, we used denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) and DNA sequencing to screen mutation in the coding and mRNA splicing regions of the DRD2 gene in 41 subjects of Han Chinese. We found three single nucleotide polymorphisms (SNP): one is +277G/A in intron 5, the other two are +42C/T and +129T/C in exon 7. It is the first time for the +277G/A polymorphism in intron 5 of the DRD2 gene to be detected in Chinese Han population in present study. The +42C/T and +129T/C, both of which cause synonymous mutation in the DRD2 gene, had corresponding ID with rs4986921 and rs6275 respectively in NCBI dbSNP. We also genotyped the +277G/A polymorphism and the +129T/C polymorphism with DHPLC and restriction fragment length polymorphism (RFLP) respectively. The +277G/A had medium mutation frequency with 6.1% for +277A allele in our sample. The +129T/C was highly polymorphic (43.9% for +129C allele) in our population. Because we used healthy and randomly selected subjects from our study area, our results can be expected to stand for the situation of general Han Chinese of that area. For further studies on genetic etiology of some neurological diseases in Chinese population, present study provided some preliminary information of the DRD2 gene as a candidate susceptibility gene of those diseases. Additionally, we also assessed some interfering factors and their control methods during DHPLC analysis, which will be useful for our peers to do the similar research.

Key Words : DHPLC; DRD2; SNP; genetic marker