

· 论 著 ·

宁夏汉族人 126 名甘露糖结合凝集素基因多态性分析*

马力通¹, 李 璐¹, 王玉炯^{2△}

(1. 内蒙古科技大学生物工程与技术研究所, 包头 014010;

2. 宁夏大学西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 银川 750021)

摘 要:目的 检测宁夏汉族人群中甘露糖结合凝集素(MBL)基因多态性, 获得数据为进一步研究 MBL 基因突变与疾病间的关联性提供依据。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法, 检测 126 名宁夏汉族健康个体的 MBL 基因 3 个多态性位点, 并与广东汉族人群 MBL 基因多态性的分布进行比较。结果 在宁夏汉族人群中, 只检测出两种等位基因: 野生型 A 和变异型 B, 未检出变异型 C、D 等位基因, 同时发现 MBL 基因的基因频率 A 为 0.853 2, B 为 0.146 8, 基因型频率分别是 AA 为 0.714 3, AB 为 0.277 8, BB 为 0.007 9。结论 宁夏汉族 MBL 基因多态性符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, 具有群体代表性, 与文献中的广东汉族人群相比较有一定的差异。

关键词:甘露糖结合凝集素; 基因多态性; 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性; 宁夏; 汉族

中图分类号:R181.37; R446.61

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)06-0643-02

Analysis of mannose binding lectin gene polymorphisms in 126 individuals of Han nationality from Ningxia*

MA Li-tong¹, LI Jun¹, WANG Yu-jiong^{2△}

(1. Institute of Bioengineering & Technology in Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010 China;

2. Key Laboratory of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biotechnology Resources in Western China, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract:Objective To investigate mannose binding lectin(MBL) gene polymorphisms of Han nationality in Ningxia for further research about relationship of MBL gene mutation and disease. **Methods** Three polymorphic loci in MBL of 126 normal Chinese Han individuals from Ningxia province were analyzed by PCR and restriction enzyme analysis. To compared the genotype and allele frequency of MBL in different Han population from China. **Results** We only found the A and B allele. The allele frequencies of MBL gene were 0.853 2 (A), 0.146 8 (B). The genotype frequencies of MBL gene were 0.714 3(AA), 0.277 8(AB), and 0.009 0(BB). **Conclusion** The distribution of polymorphism in MBL gene is consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium. And it is significantly different among the Han population of Ningxia and Guangdong.

Key words: MBL; gene polymorphisms; PCR-RFLP; Ningxia; Han nationality

甘露糖结合凝集素(mannose binding lectin, MBL)是参加天然免疫的宿主防御分子, 它能够通过凝集素途径激活补体系统和吞噬作用从而在宿主免疫防御中发挥重要作用^[1]。迄今为止, 所发现的 MBL 基因结构区突变均为第 1 外显子的点突变, 分别是密码子 54(GGC→GAC, Gly→Asp)、57(GGA→GAA, Gly→Glu)以及密码子 52(CGT→TGT, Arg→Cys)(简称为 MBL-54、MBL-57 和 MBL-52, 相应突变的等位基因命名为 B、C、D, 野生型为 A), 这些基因的突变干扰了 MBL 形成稳定的功能性的多聚体, 使血清中 MBL 水平下降, 从而导致了调理缺陷, 这与临床反复感染、系统性红斑狼疮、艾滋病以及乙型肝炎等多种疾病的发生相关。在 MBL 研究的基础上, 临床治疗中研究者成功尝试输入天然血浆 MBL 或输入重组 MBL 来改善由 MBL 缺失引起的慢性疾病的状况^[2]。MBL 基因点突变存在种族差异。目前, 尚无宁夏汉族人群 MBL 基因突变类型及其频率研究的报道。为此研究中国宁夏汉族人群的 MBL 基因突变, 为进一步了解 MBL 基因突变与疾病的关系提供数据支持。

1 对象与方法

1.1 研究对象 126 名无血缘关系的健康个体均来自于宁夏地区, 其中男 84 名, 女 42 名, 年龄 6~69 岁, 其父母均为宁夏汉族。在知情同意的原则下, 抽取研究个体的外周静脉血待用。

1.2 MBL 基因的扩增 参照文献[3]提取外周血基因组 DNA, 以所提取基因组 DNA 作为模板扩增 MBL 基因外显子 1, 参照文献[4]设计引物, 引物由华美生物公司合成。引物序列为(1) MBL54 和 MBL57 的 PCR 引物序列, Forward: 5'-AGT CGA CCC AGA TTG TAG GAC AGA G-3', Reverse: 5'-AGG ATC CAG GCA GTT TCC TCT GGA AGG-3'。(2) MBL52 的 PCR 引物序列, Forward: 5'-CAT CAA CGG CTT CCC AGG CAA AGA CGC G-3', Reverse: 5'-AGG ATC CAG GCA GTT TCC TCT GGA AGG-3'。PCR 反应体系为 20 μL: 基因组 DNA 1.5 μL, 10×PCR Buffer 2 μL, 2 μM 引物各 2 μL, 2.5 mM dNTPs 1.6 μL, 5 u/mL Taq DNA 聚合酶 0.2 μL, 10.7 μL ddH₂O。PCR 反应条件为(1) MBL54 和 MBL57 的反应条件: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 58℃ 40 s, 72℃ 60 s, 35 个循环; 最后 72℃ 5 min。(2) MBL52 的反应条件: 在密码子 52 位处利用 SDM-PCR 引入一个新的酶切位点 Mlu I, 其 PCR 反应条件为 94℃ 4 min; 94℃ 40 s, 65℃ 40 s, 72℃ 60 s, 28 个循环; 最后 72℃ 5 min。PCR 扩增产物 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离, 在紫外灯下观察结果。

1.3 限制性内切酶酶切 酶切反应体系 15 μL PCR 扩增产物 1.5 μL, Buffer 2 μL, BSA 0.2 μL, 限制性内切酶 0.2 μL, ddH₂O 11.1 μL。PCR 扩增产物分别被 Ban I、Mbo II、Mlu I 于 50℃、37℃、37℃ 酶切 4~5 h。酶切产物经 80 g/L 非变性

* 基金项目: 教育部科学技术研究重点基金资助项目(205172)。

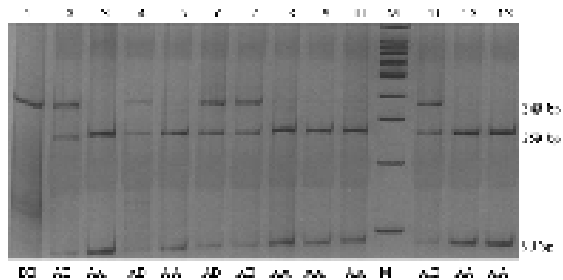
△ 通讯作者, 电话: (0951)2062023; E-mail: wyj@nxu.edu.cn。

聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电泳结束后常规银染,凝胶成像仪观察结果并拍照。

1.4 统计学方法 计算出宁夏汉族 MBL 基因的各种基因型频率和等位基因频率,使用 SPSS12.0 软件包进行数据统计处理,利用 χ^2 检验分析 MBL 基因多态性分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡以及各组间差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MBL 基因多态性 PCR-RFLP 结果 见图 1。



M: 100 bp DNA ladder marker; 1~13: Ban I 酶切产物; 1: 纯合型 BB; 2, 4, 6, 7, 11: 杂合型 AB; 3, 5, 8, 9, 10, 12, 13: 纯合型 AA。

图 1 MBL 基因多态性 PCR-RFLP 结果

2.2 宁夏汉族 MBL 基因多态性分布情况 在宁夏汉族只检测出两种等位基因野生型 A 和变异型 B(54 位密码子由 GGC → GAC)未检出变异型 C、D 等位基因。126 名共检出野生型 AA 为 90 名,突变杂合型 AB 为 35 名,突变纯合型 BB 为 1 名;基因型频率分别为 0.714 3, 0.277 8, 0.007 9; A、B 基因频率分别为 0.853 2, 0.146 8。经 χ^2 检验,符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,说明本研究人群具有群体代表性。

2.3 与其他汉族人群 MBL 基因多态性分布的比较 宁夏汉族与广东汉族^[5]均只检出 A、B 两种等位基因,经 χ^2 检验,宁夏汉族与广东汉族^[5]之间 MBL 基因多态性分布差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 1)。并且前者 B 的等位基因频率明显高于后者。

表 1 宁夏、广东两地汉族 MBL 基因多态性分布情况

组别	n	基因型频率[n(%)]			基因频率	
		AA	AB	BB	A	B
宁夏汉族	126	90(71.43)	35(27.78)	1(0.79)	0.853 2	0.146 8
广东汉族 ^[5]	166	147(88.55)	19(11.45)	0(0.00)	0.942 8	0.057 2

3 讨论

MBL 是第 1 个被发现的具有防御功能的 C 型凝集素。编码 MBL 的基因含有 4 个外显子,分别编码 N-端富含半胱氨酸区、胶原样区、颈区和糖识别区。其中外显子 1 编码 N-端富含半胱氨酸区和部分胶原区。MBL 结构基因外显子 1 第 52、54、57 位的突变使其产物不能形成稳定的功能性的多聚体结构,从而造成 MBL 不能发挥调理作用和激活补体凝集素途径的作用。

人群中 MBL 的基因突变率很高,并且 MBL 结构基因各点突变的基因频率与种族有关。南部非洲人以 57 位密码突变多见。MBL-54 突变主要发生在欧洲、亚洲人群中,而在黑人中 MBL-54 突变极罕见。MBL-52 突变少见且种族差别不明显。国外近年来已在几个种族人群中研究 MBL 基因多态性

与感染性疾病、自身免疫性疾病的相关性^[6]。国内对汉、维、蒙、藏、彝族的研究中未发现 MBL-52、MBL-57 的基因突变,但是 MBL-54 的基因突变却很常见^[7]。本文所取样本为一般人群,除了要求为汉族外,未作任何限制,故可以代表宁夏地区的汉族人群。

本实验确定了宁夏汉族人群 MBL 基因多态性位点等位基因的分布情况,研究结果显示,宁夏汉族人群与文献^[5]中的广东地区汉族相比较,MBL 基因多态性分布差异显著,并且宁夏汉族人群 B 的等位基因频率明显高于后者。汉族是中华民族的主要成员。汉族的形成和发展,经历了一个十分复杂的融合、迁移的历史过程,是历史上融合了许多古代的非汉族人群而形成的。杜若甫和肖春杰^[8-9]认为以长江为界,中国汉族人群分南、北两大类型。各地汉族与当地的少数民族在遗传结构上十分相近,而南、北方汉族的遗传结构却相差甚远,接近于南、北方少数民族间的平均差异。宁夏汉族 MBL 基因多态性分布与广东汉族^[5]相比有明显差异,证实了同一人种内部 MBL 各等位基因分布存在地理差异也进一步支持中国汉族人群可分为南北两类的假设。同时本研究对宁夏汉族 MBL 基因多态性获得的数据为进一步研究 MBL 基因突变与疾病间的关系提供数据支持。

参考文献:

- [1] Eveline CA, Andy IH, Jelle S, et al. Mannose binding lectin plays a crucial role in innate immunity against yeast by enhanced complement activation and enhanced uptake of polymorphonuclear cells[J]. BMC Microbiol, 2008, 18: 229.
- [2] Takahashi K, Shi L, Gowda LD, et al. Relative roles of complement factor 3 and mannose-binding lectin in host defense against infection[J]. Infect Immun, 2005, 73(12): 8188.
- [3] 黄霞,毛伟,王蓉感,等.用 PCR-SSP 方法研究重庆地区人群 HLA-DRB1 基因多态性[J]. 重庆医学, 2005, 34(2): 242.
- [4] Malik S, Arias M, Di Flumeri C, et al. Absence of association between mannose binding lectin gene polymorphisms and HIV-1 Colombian population[J]. Immunogenetics, 2003, 55(1): 49.
- [5] 王方勇,陈政良,吕成伟,等.广东地区汉族人 MBL 基因 GGC54GAC 点突变的初步筛查[J]. 免疫学杂志, 2002, 18(B06): 1.
- [6] Peter G, Flemming L, Hans OM, et al. Mannose-binding lectin deficiency-revisited[J]. Mol Immunol, 2003, 40(2-4): 73.
- [7] 施红,王福生,金磊,等.中国五个民族的甘露糖结合蛋白基因多态性特点及意义[J]. 中华医学遗传学杂志, 2001, 18(3): 202.
- [8] 杜若甫,肖春杰.从遗传学探讨中华民族的源与流[J]. 中国社会科学, 1997, 4: 139.
- [9] 肖春杰,杜若甫, Cavalli-Sforza LL. 中国人群基因频率的主成分分析[J]. 中国科学(C 辑), 2000, 30(4): 434.