

PCR-RFLP法鉴定人ALDH2基因型

时天麒, 康宇佳, 石金磊*

上海科技大学生命科学与技术学院, 上海

收稿日期: 2022年3月28日; 录用日期: 2022年4月15日; 发布日期: 2022年4月21日

摘要

ALDH2编码乙醛脱氢酶, 是人体乙醇代谢途径的重要组分。人类ALDH2基因存在SNP (单核苷酸多态性) 现象, 其gDNA在37,030位发生单碱基替换后导致乙醛脱氢酶失活, 且该突变基因在东亚人群中具有较高频率。根据此单碱基的差别, 本文采用PCR-RFLP方法, 通过提取、纯化、酶切受试者口腔上皮细胞基因组DNA, 实现了对于三种ALDH2基因型的鉴定, 其创新点在于简化实验步骤、提升产物回收效率的同时使判断更加准确。结论: PCR-RFLP法鉴定人ALDH2基因型可作为分子遗传学实验教学的案例。

关键词

ALDH2基因型, PCR-RFLP, 分子遗传学

Identification of Human ALDH2 Genotype by PCR-RFLP Method

Tianqi Shi, Yujia Kang, Jinlei Shi*

School of Life Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai

Received: Mar. 28th, 2022; accepted: Apr. 15th, 2022; published: Apr. 21st, 2022

Abstract

ALDH2 encodes aldehyde dehydrogenase, which is an essential component of human ethanol metabolism. The SNP (Single Nucleotide Polymorphism) of human ALDH2 gene inactivates aldehyde dehydrogenase due to the replacement of base 37,030 in the genomic sequence, and the frequency of the mutant ALDH2 gene is particularly high in East Asian population. Aimed at the difference of this single base, this paper applies PCR-RFLP to distinguish the three ALDH2 genotypes after extraction, purification and enzymatic digestion of the genomic DNA from human oral epithelium.

*通讯作者。

The innovation of this work is mainly reflected in simplifying the experiment procedures as well as improving the efficiency of DNA purification and the accuracy of genotyping. We propose that human ALDH2 genotyping by PCR-RFLP can be used as a typical sample of experimental teaching of molecular genetics.

Keywords

ALDH2 Genotype, PCR-RFLP, Molecular Genetics

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 背景介绍

乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)是一种能够催化乙醛等脂肪族醛的氧化的蛋白质[1]。人类基因组研究共发现 19 种功能性 ALDH 基因,可分为 ALDH1~4 共四类,其中 ALDH2 基因由于表达量最高、存在遗传多态性而不同于其他三类[2]。人类 ALDH2 基因位于 12q24.2 位置,全长 43,438 bp,共 15 个外显子,编码由 517 个氨基酸残基组成的 56 kDa 蛋白;该蛋白定位于线粒体基质,并通过 Glu487 和 Arg475 残基之间的氢键形成四聚体后发挥催化功能[3]。

ALDH2 基因存在序列多态性,最常见的突变是 g.37030G>A,使得 ALDH2 氨基酸序列第 487 位上的谷氨酸被赖氨酸所替换,导致合成的乙醛脱氢酶出现明显的催化活性丧失,其中编码正常酶的野生型基因(G)又称 ALDH2*1,编码失活酶的突变型基因(A)又称 ALDH2*2。生化研究显示,乙醛脱氢酶四聚体只要有一个亚基缺少或结构改变就足以导致整个酶活性的下降甚至丧失,因此 Glu487/Lys487 杂合子(ALDH2*1/2)编码的酶并不具有很高的催化活性,只有野生型纯合子(ALDH2*1/1)活性的约 10%~20%,而 Lys487 突变纯合子(ALDH2*2/2)损失了 96%的酶活性,基本不具备对于乙醛氧化代谢的能力[4]。在肝实质细胞主要采用的乙醇代谢途径 II 中,如果乙醛脱氢酶催化活性下降,人体摄入乙醇后产生的乙醛不能被有效代谢,就会导致大量乙醛分子进入血液并参与全身循环;而乙醛由于能够刺激血管扩张,其在面部毛细血管中的积累就会导致面红耳赤的现象,即常说的“喝酒脸红”。

ALDH2 基因多态性的出现频率因种族而异。相比于欧美和非洲人群,东亚人群中 ALDH2*2 基因有更为广泛的分布,因此乙醛代谢能力不足的东亚人占比大,在饮酒后更容易出现脸红等酒精并发症,故称“Asian Glow”[5][6]。其中,中国汉族人群中 ALDH2*2 等位基因频率为 17%至 29%;而 ALDH2*1/*2 杂合子的基因型频率为 36%至 44%,ALDH2*2/*2 纯合子基因型频率为 7%至 8% [7][8],均处于世界范围内的较高水平。

除了与个体出现面红、头痛、恶心和心悸等酒后反应的程度有关,ALDH2 在疾病诱发和药物代谢等方面也有重要意义。例如,消化道(食道、胃、结肠)及消化腺(肝脏)肿瘤的发生被认为与 ALDH2 基因突变有高度联系[9],这是因为乙醛本身化学性质活泼,未能被 ALDH2 充分代谢的大量乙醛能够与多种蛋白质反应形成复合体,诱导氧化应激、产生自由基而破坏基因结构。此外,硝酸甘油(NTG)是常用的治疗急性心绞痛的即时药物,能够通过扩张血管、降低心脏前负荷并增加供氧量,从而缓解心肌缺氧导致的心绞痛。而 ALDH2 作为人体内促进 NTG 生物代谢的限速酶,通过其酯酶活性催化 NTG 水解产生 NO,因此 ALDH2 突变的个体不能有效地代谢 NTG、使其发挥正常的药理学作用,从而无法通过服用 NTG 实

现对心绞痛的有效治疗[8]。综上所述, 鉴定个体的 ALDH2 基因型对于疾病预防、科学用药等方面都有非常重要的临床参考价值。

2. 实验用品

2.1. 试剂

人唾液 DNA 提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; PCR 试剂(Green Taq Mix)及 DNA Ladder 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 引物由铂尚生物技术(上海)有限公司合成; PCR 产物纯化试剂盒购自 MACHEREY-NAGEL 公司; AcuI 限制性内切酶购自 NEB 公司。

2.2. 仪器

台式离心机, NanoDrop2000 超微量分光光度计, 涡旋振荡器, PCR 仪, 金属浴, 电子天平, 微波炉, 电泳仪, 凝胶成像仪等。

2.3. 耗材

一次性纸杯, 灭菌离心管(2 mL, 1.5 mL, 0.2 mL), 移液吸头等。

3. 实验方法

3.1. 人口腔上皮细胞 DNA 的提取

受试者先用饮用水漱口, 以清除口腔内食物残渣, 再在口腔内含蒸馏水约 5 mL, 并用力作咀嚼咕漱运动, 3 分钟后吐入纸杯中, 根据人唾液 DNA 提取试剂盒说明书提取口腔上皮细胞基因组 DNA, 并用 NanoDrop 2000 测定浓度、分析相对纯度。在本次实验中, 笔者挑选 ALDH2 野生型纯合(GG)、突变型纯合(AA)以及杂合(AG)三种基因组 DNA 样本进行后续实验。

3.2. 含有突变位点序列的 PCR 扩增

笔者综合参考引物序列特异性、长度、碱基类型分布等因素, 在 ALDH2 基因突变位点旁 AcuI 酶切位点的上游 134 bp、下游 253 bp 处分别设计引物 ALDH2-F、ALDH2-R, 序列如下:

ALDH2-F: 5'-TCAAATTACAGGGTCAACTGCTA-3' (23 nt)

ALDH2-R: 5'-GGGAAATTAGTAGGAAACACTGATG-3' (25 nt)

此对引物在适宜的 PCR 条件下, 可特异地扩增出 387 bp 的短片段。

部分 PCR 体系及扩增条件如下:

50 μ L 的 PCR 体系中, 加入约 100 ng 高纯度的基因组 DNA 作为模版, 上下游引物的终浓度控制在 0.32 μ M 左右为宜;

PCR 程序: 预变性: 95.0 $^{\circ}$ C, 3 min; 变性: 95.0 $^{\circ}$ C, 15 s; 退火: 52.2 $^{\circ}$ C, 15 s; 延伸: 72.0 $^{\circ}$ C, 28 s; 补充延伸: 72.0 $^{\circ}$ C, 5 min。循环次数: 35 次。

3.3. PCR 扩增产物的纯化

根据 PCR 产物纯化说明书要求, 对 PCR 扩增产物进行纯化, 最终用 20 μ L 70 $^{\circ}$ C 预热的灭菌去离子水洗脱, 并用 NanoDrop 2000 测定浓度、分析相对纯度。

3.4. PCR 扩增产物的酶切

酶切条件: 20 μ L 总体系中, 加入 250 ng PCR 产物、4U AcuI、2.0 μ L 10 \times CutSmart buffer; 混合均

匀后, 在 37℃ 孵育 60 min, 将酶换为等量灭菌去离子水作为酶切反应的阴性对照。

3.5. 酶切产物的电泳检测

取酶切反应产物及阴性对照组, 加入 Loading Buffer 后, 在 2% 琼脂糖凝胶中上样, 并在常规电泳槽中, 130 V 恒压电泳 30 min, UV302 检测条带分布情况以判断基因型。

3.6. 测序结果分析

使用 SnapGene, 将 PCR 产物的测序结果与 ALDH2 参考序列相比对(NCBI RefSeq: NM_000690.4), 得到模板的 ALDH2 基因型, 并与酶切结果相比较, 从而判断 PCR-RFLP 结论的正确性。

4. 实验结果

4.1. 基因组 DNA 的提取结果

3 种基因型个体的口腔上皮细胞基因组 DNA 按照试剂盒说明书进行提取。其中, GG 型基因组 DNA 的浓度是 27.8 ng/μL, AG 型基因组 DNA 的浓度是 22.4 ng/μL, AA 型基因组 DNA 的浓度是 56.9 ng/μL, 且 A260/A280 均在 1.8 左右, 如表 1 所示。结果表明 DNA 的质量和纯度很好, 可以作为后续 PCR 实验的模板。

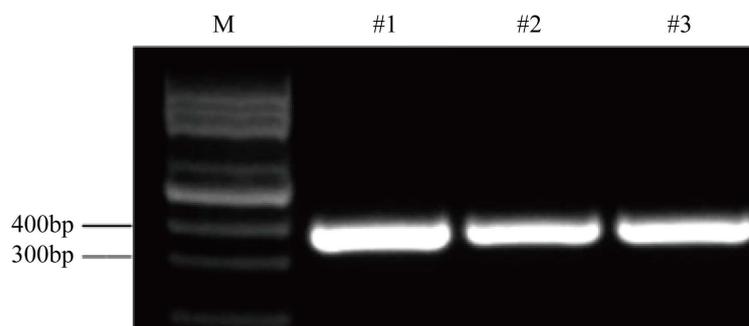
Table 1. Concentration and purity of genomic DNA extracts

表 1. 基因组 DNA 提取浓度及纯度

基因型	野生型纯合子 GG	杂合子 AG	突变型纯合子 AA
gDNA 浓度(ng/μL)	27.8	22.4	56.9
A260/A280	1.84	1.76	1.72

4.2. PCR 产物条带及纯化结果

ALDH2-F/R 用于扩增出一段含有 ALDH2 突变位点的 DNA 片段, 长度为 387 bp。为验证其扩增特异性, 在三种基因型模板的 PCR 反应结束后, 各取 10 μL 上样, 在 2% 琼脂糖凝胶中电泳 20 min, 凝胶显影结果如图 1 所示, 可见每一个扩增体系均有单一的目的条带产生, 条带位置在 300 bp 与 400 bp 之间, 与预期大小相符。



图注: M 表示 100 bp Marker, #1、#2、#3 分别为基因型为 GG、AG、AA 模板的 PCR 产物, 长度均为 387 bp。

Figure 1. Electrophoresis result of PCR products of three genotypes

图 1. 三种基因型 PCR 产物的电泳结果

4.3. PCR 产物的纯化结果

3 种基因型 PCR 产物按照试剂盒说明书进行纯化。其中, GG 型 PCR 产物纯化后的产物浓度是 153.8 ng/μL, AG 型 PCR 产物浓度是 132.2 ng/μL, AA 型 PCR 产物浓度是 83.7 ng/μL, 且 A260/A280 都在 1.8 左右, 如表 2 所示。结果表明 DNA 的质量和纯度很好, 可以用于后续的酶切实验。

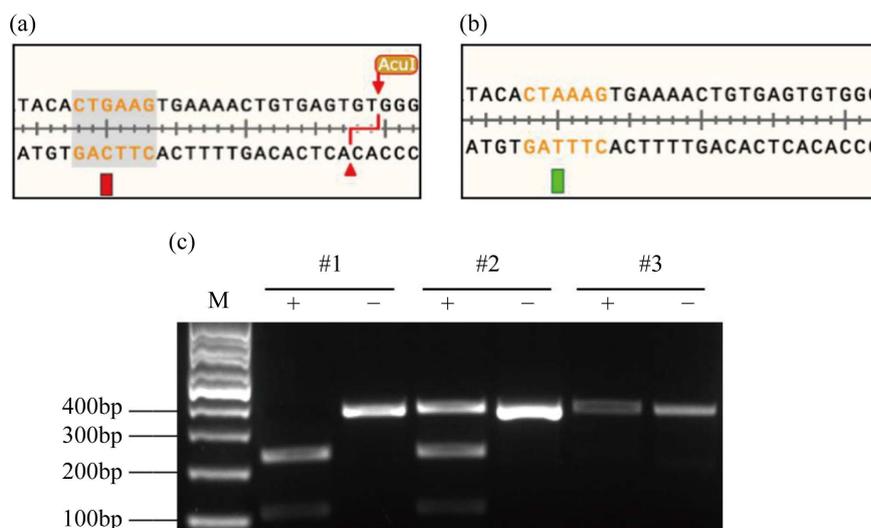
Table 2. Concentration and purity of purified PCR products

表 2. 纯化 PCR 产物的浓度及纯度

基因型	野生型纯合子 GG	杂合子 AG	突变型纯合子 AA
PCR 产物浓度(ng/μL)	153.8	132.2	83.7
A260/A280	1.79	1.74	1.80

4.4. 酶切结果

AcuI 能够识别野生型 ALDH2 基因的 5'-CTGAAG-3'序列并在距其 14 bp 的位置产生酶切, 但对于 G>A 突变型的 ALDH2 (5'-CTAAAG-3')便不能识别, 因而无法发生酶切(如图 2(a)、图 2(b)所示)。理论上三种基因型的 AcuI 酶切条带长度分布如表 3 所示(+表示有此长度条带出现, □代表不会出现该条带)。另外, 表中标注的 DNA 片段的长度均为估值, 实际长度可能受具体扩增状态的影响而与这些值相差几个碱基, 不过此微小的差异对条带区分几乎没有影响。通过组内对比, 可见用相同的 AcuI 体系酶切后, #1 组 PCR 产物得到 134 bp 和 253 bp 两个条带, #2 组 PCR 产物得到 134 bp、253 bp、387 bp 三个条带, #3 组 PCR 产物仍然只有 387 bp 的原长条带, 且三种条带的分离明显, 易于观察。此条带结果和表 3 的理论预测结果相符。



图注: (a) 野生型 ALDH2 基因组的 37,030 位(G/C)以及 AcuI 的识别、酶切位点。(b) 突变型 ALDH2 基因组的 37,030 位(A/T), AcuI 无法识别并酶切。(c) AcuI 酶切产物电泳结果。其中 M 表示 100 bp DNA Marker, #1、#2、#3 分别对应基因型为 GG、AG、AA 的模板, +为加入 AcuI 的实验组, -为将酶替换成等量灭菌去离子水的阴性对照组。

Figure 2. The principle and results of PCR-RFLP identification

图 2. PCR-RFLP 鉴定法的原理依据及结果

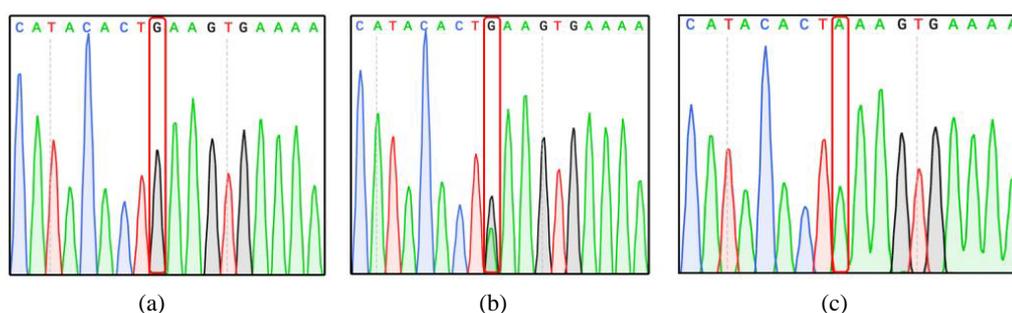
Table 3. Digested band distribution and corresponding genotypes**表 3.** 酶切后条带分布与对应基因型

基因型		野生型纯合子 GG	杂合子 AG	突变型纯合子 AA
条带长度	387 bp	□	+	+
	253 bp	+	+	□
	134 bp	+	+	□

表注: +代表会出现该条带, □代表不会出现该条带。

4.5. 测序结果

#1、#2、#3 三种模板的 PCR 产物均有清晰的测序峰图。其中, 图 3(a)为#1 模板(野生型纯合子 GG)的测序结果, 由于 DNA 双链均没有发生 g.37,030G>A 的突变, 所以在 37,030 位的测序峰为 G 的单峰(如红框中所示); 图 3(b)为#2 模板(杂合子 AG)的测序结果, 由于 DNA 双链中的一条链发生 g.37,030G>A 的突变, 另一条链未发生突变, 所以在 37,030 位的测序峰为 A、G 的套峰(如红框中所示); 图 3(c)为#3 模板(突变型纯合子 AA)的测序结果, 由于 DNA 双链中都发生了 g.37,030G>A 的突变, 所以在 37,030 位的测序峰为 A 单峰(如红框中所示)。此结果印证了 PCR 限制性酶切多态性结果的正确性。



图注: (a) #1 测序结果, 框中为野生型纯合子基因组 DNA 的 37,030 位(G)。 (b) #2 测序结果, 框中为杂合子基因组 DNA 的 37,030 位(A/G)。 (c) #3 测序结果, 框中为突变型纯合子基因组 DNA 的 37,030 位(A)。

Figure 3. Sequencing result of genomic DNA**图 3.** 基因组 DNA 的测序结果

5. 讨论

在对含有突变位点的片段进行 PCR 扩增时, 可参考文中的体系配比及扩增条件, 但模板来源、DNA 聚合酶类型等具体因素都会对最适扩增条件产生影响, 因此需要做预实验摸索。其中, 如果提取的基因组 DNA 溶液浓度很低(如小于 10 ng/μL), 可直接取 5 μL 量加入 PCR 体系, 无需考虑 100 ng 的推荐添加量, 但引物添加量要适当降低, 以避免过多引物二聚体的产生。

为保证后续测序和酶切实验样品的等同性, 如果模板量充足, 建议一次做两份 50 μL 的 PCR 体系, 一份用于测序, 一份用于 PCR 产物的纯化后回收。此外, 为确保扩增条带的单一性, 可取少量 PCR 产物(10 μL)上样电泳, 以避免非特异性扩增对后续酶切条带分析产生干扰。如果扩增产物电泳后出现杂带, 可适当提升退火温度以提升 PCR 产物的纯度; 如果扩增条带是单一的, 即可取另一管 PCR 产物送测序, 测序引物使用 ALDH2-F/R 均可。

参考 NEB 酶切体系, 笔者建议在配置 PCR 扩增片段的酶切体系时, 应当注意相应的最大催化效率,

即一定酶切体系能够切割的底物存在最大量,且实验证明此最大量由酶的添加量决定,与酶切时间无关。如果酶切体系中加入明显超过此限度的 DNA 片段,很可能导致无论酶切多长时间,总有一部分存在识别位点的序列无法被充分切割,电泳后停留在片段原长(387 bp)的位置上,对于野生型纯合子(无原长条带)与杂合子(有原长条带)的区分产生很大的干扰。对于本实验中使用的 *AcuI*,笔者验证其最大催化效率约为 62.5 ng/U,且此值一方面适用于多种酶切体系量(20 μ L、40 μ L、50 μ L 均可);另一方面,只要酶切时间达到最低标准(60 min),其酶切产物量足够在凝胶显影时显示出明亮的条带。以上可作为读者配置酶切体系时的参考。

6. 结论

ALDH2 基因对于人体意义重大。人们已发现其与药物代谢、神经疾病以及癌症的发生均密切相关[8][9]。数据统计表明,东亚人种有世界范围内较高频率的 ALDH2 突变基因[5][6],且该突变位点恰好位于 *AcuI* 酶的识别区域,因此笔者认为可利用 PCR-RFLP 方法实现对中学生 ALDH2 基因型的快速、准确判断,并将其作为分子遗传学的教学实验开展,以帮助学生认识到个体之间乙醛代谢能力的差别并选择健康的饮酒方式。

虽然有人曾利用 PCR-RFLP 方法鉴别小鼠的 ALDH2 基因型[10],但实验证明该引物应用于人的基因组模板时,一方面会产生少许杂带,另一方面其扩增片段设计得过短且酶切后的两片段长度十分相近,导致酶切产物电泳后经常出现片段重叠现象而严重影响基因型判断。因此,笔者严格挑选了合适的扩增长度和引物搭配,能够同时解决上述两个问题——既省去了 PCR 后电泳的时间、提升了 PCR 产物的回收效率,又大幅提高了酶切产物的分离程度、使基因型判断更为准确。笔者随后利用测序证实本实验方法切实有效。

本实验可作为分子遗传学理论与实验技术相互融合的教学案例,其利用了 PCR、产物纯化、酶切、电泳、DNA 测序等经典分子生物学技术,通过 PCR-RFLP 方法实现教学实验室中的 ALDH2 基因型快速鉴别,解决了和人们生活习惯密切相关的分子遗传学问题。其不但巩固了学生基本分子生物学的实验技术和遗传学基础知识,更是借助简单的例子让学生充分理解分子遗传学手段在人类基因型分析中的指导性作用,并激发他们学习分子遗传学的兴趣、实现生物学与实际生活互相渗透的教学目标。

基金项目

上海科技大学生命科学与技术学院本科生实验室运行经费——2022A0202-405-18。

参考文献

- [1] Tsou, P.-S., *et al.* (2011) Differential Metabolism of Organic Nitrates by Aldehyde Dehydrogenase 1a1 and 2: Substrate Selectivity, Enzyme Inactivation, and Active Cysteine Sites. *The AAPS Journal*, **13**, 548-555. <https://doi.org/10.1208/s12248-011-9295-4>
- [2] Yoval-Sánchez, B. and Rodríguez-Zavala, J.S. (2012) Differences in Susceptibility to Inactivation of Human Aldehyde Dehydrogenases by Lipid Peroxidation Byproducts. *Chemical Research in Toxicology*, **25**, 722-729. <https://doi.org/10.1021/tx2005184>
- [3] Matsumoto, A. (2016) Nihon Eiseigakuzasshi. *Japanese Journal of Hygiene*, **71**, 55-68. <https://doi.org/10.1265/jjh.71.55>
- [4] 叶懿, 陈帆, 卢翔, 等. 基因多态性、饮酒种类与乙醇代谢的相关性[J]. 法医学杂志, 2018, 34(2): 142-146. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-5619.2018.02.007>
- [5] Gross, E.R. *et al.* (2015) A Personalized Medicine Approach for Asian Americans with the Aldehyde Dehydrogenase 2*2 Variant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **55**, 107-127. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124915>
- [6] Wang, W.J., Wang, C.G., Xu, H.X. and Gao, Y.H. (2020) Aldehyde Dehydrogenase, Liver Disease and Cancer. *Inter-*

-
- national Journal of Biological Sciences*, **16**, 921-934. <https://doi.org/10.7150/ijbs.42300>
- [7] Zhang, L.-Q., *et al.* (2017) Association of Genotypes of rs671 withinALDH2 with Risk for Gastric Cardia Adenocarcinoma in the Chinese Han Population in High- and Low-Incidence Areas. *Cancer Biology & Medicine*, **14**, 60-65.
- [8] Xia, J.-Q., *et al.* (2015) Effect of Aldehyde Dehydrogenase 2 Gene Polymorphism on Hemodynamics after Nitroglycerin Intervention in Northern Chinese Han population. *Chinese Medical Journal*, **128**, 180-185. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.149192>
- [9] Chen, C.-H., Ferreira, J.C.B., Gross, E.R. and Mochly-Rosen, D. (2014) Targeting Aldehyde Dehydrogenase 2: New Therapeutic Opportunities. *Physiological Reviews*, **94**, 1-34. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2013>
- [10] Jin, S.F., *et al.* (2015) ALDH2(E487K) Mutation Increases Protein Turnover and Promotes Murine Hepatocarcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 9088-9093. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510757112>