

• 论 著 •

基因芯片法检测体检人群 ALDH2 基因多态性\*

徐筱婧<sup>1</sup>, 瞿 浩<sup>2</sup>, 张 华<sup>1△</sup>

(贵州省人民医院:1. 检验科;神经内科, 贵州贵阳 550002)

**摘 要:****目的** 采用基因芯片法检测体检人群 ALDH2 基因,评价该方法应用于临床检测的可行性。**方法** 检测对象为 100 例体检人员,采用基因芯片检测法,检测 ALDH2 基因第 487 突变位点 3 个不同的基因分型:GG 型、GA 型、AA 型。**结果** 共检出 GG 型 72 例,GA 型 26 例,AA 型 2 例。**结论** 基因芯片检测法可满足临床 ALDH2 基因检测的要求,具有较好的临床应用前景。

**关键词:**ALDH2 基因; 芯片检测

**DOI:**10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 01. 005 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)01-0011-03

Gene chip method for detecting ALDH2 gene polymorphism among populations of healthy physical examination\*

Xu Xiaojing<sup>1</sup>, Qu Hao<sup>2</sup>, Zhang Hua<sup>1△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Neurology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China)

**Abstract: Objective** To adopt the gene chip method to detect the ALDH2 gene polymorphism for evaluating the feasibility of this method used in clinical detection. **Methods** 100 individuals undergoing the healthy physical examination were selected as the detection objects. The gene chip method was adopted to detect the genotype GG, GA and AA in 487 mutation loci of ALDH2 gene. **Results** 72 cases of GG type, 26 cases of GA and 2 cases of AA were detected out. **Conclusion** The gene chip method could meet the requirements of clinical ALDH2 gene detection with better clinical application prospect.

**Key words:**aldehyde dehydrogenase 2 gene; gene chip

人乙醛脱氢酶 2(aldehyde dehydrogenase, ALDH2)是一种位于 12 号染色体编码基因呈高度多态性的四联体蛋白,为酒精代谢的关键酶<sup>[1]</sup>,芯片检测法是近年来兴起的一项基因检测技术,为探讨该方法临床应用可行性,笔者对 100 例体检样本进行了检测,现报道如下。

1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2010 年 11 月至 2011 年 9 月期间本院体检人员,共 100 例。其中男 79 例,女 21 例,年龄 20~66 岁,平均(42.29±7.52)岁,遵循受检者知情自愿原则。

**1.2 仪器与试剂** 上海百傲公司杂交仪、扫描仪;上海百傲科技公司 ALDH2 基因检测试剂盒、ALDH2 基因检测芯片判读系统;天根生化科技有限公司全血基因组 DNA 提取试剂盒;北京博奥科技公司 DNA 定量仪、普通 PCR 扩增仪。

1.3 方法

**1.3.1 标本采集与处理** 采集外周静脉血 2 mL(EDTA 抗凝),用上海百傲科技有限公司血液基因组 DNA 提取系统(离心柱型)试剂盒,提取全血 DNA。

**1.3.2 基因组 DNA 电泳分析** 2%琼脂糖凝胶,6×Loading buffer 1 μL 与 5 μL DNA 样本混匀后点样,5 μL Marker 点样,100 V 电泳 30 min,凝胶成像系统读取结果见图 2。

**1.3.3 PCR 反应** 按试剂盒说明书准备反应体系,见表 1。PCR 反应程序为:50 ℃ 5 min;94 ℃ 5 min;94 ℃ 25 s,60 ℃ 25 s,72 ℃ 30 s,35 cycles;72 ℃ 5 min。

**1.3.4 PCR 产物电泳分析** 2%琼脂糖凝胶,6×Loading buffer 1 μL 与 5 μL PCR 扩增产物混匀后点样,5 μL Marker

点样,100 V 电泳 30 min,凝胶成像系统读取结果见图 3。

表 1 PCR 扩增反应体系

试剂	体积(μL)
ALDH2 扩增液	22
反应液 A	1
基因组 DNA	3
总体积	25

**1.3.5 杂交** 按上海百傲基因检测试剂盒说明书配备杂交体系进行杂交,杂交程序设置见表 2,杂交总时间约为 1 h 40 min。

**1.3.6 芯片扫描及判读** 杂交完毕,用上海百傲基因芯片扫描仪进行扫描,ALDH2 判读系统进行基因型判读。芯片点阵见图 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

**1.4 统计学处理** 采用 Excel 统计软件进行数据处理。

2 结 果

**2.1 基因组 DNA 电泳结果** 如图 2 所示:提取的基因组 DNA 位于点样孔附近,条带完整、清晰、明亮,DNA 质量好,1~5 泳道均为样本基因组 DNA,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

**2.2 PCR 电泳结果** ALDH2 基因片段大小为 438 bp,目标片段在 250~500 bp 之间,与目的片段大小吻合。1~5 泳道均为 PCR 扩增产物。见图 3(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

\* 基金项目:贵州省科技厅社发与科技攻关项目(黔科合 LS 字[2011]011 号)。 作者简介:徐筱婧,女,初级检验技师,主要从事分子生物学研究。 △ 通讯作者,E-mail:780837482@qq.com。

表 2 杂交程序

步骤	取样位置			反应时间 (min)	取样次数(n)	反应温度 (℃)
	试管架位置	试剂名称	体积(μL)			
1	A	预杂交液	1 200	5	1	43
2	B	杂交反应液	200	30	1	43
3	C	洗液 1	800	6	2	43
4	D	洗液 2	1 600	5	2	28
5	E	抗体液	200	20	1	28
6	F	洗液 3	400	3	1	28
7	G	显色液	200	30	1	43

2.3 100 例样本各基因型比例 100 例检测样本中,共检测出野生纯合型(GG 型)72 例;杂合突变型(GA 型)26 例;突变纯合型(AA 型)2 例。100 例样本中各基因型所占比例分布见表 3。

表 3 100 例体检样本各基因型比例

基因型	n	百分率(%)
GG	72	72
GA	26	26
AA	2	2

2.4 ALDH2 基因芯片检测结果 为验证芯片结果的准确性,取部分样本进行测序,ALDH2 各基因型芯片扫描图及对应测序图,芯片检测结果与测序结果吻合见图 4~6(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

3 讨 论

人类 ALDH2 基因上共发现了 84 个单核苷酸多态性位点,其中在外显子 12 处发生点突变(Glu487Lys),谷氨酸 Glu(密码子 GAA)变为赖氨酸 Lys(密码子 AAA),使正常的等位基因 G,变为突变型等位基因 A,导致该基因编码的酶的催化能力下降<sup>[2]</sup>。因遗传,在人群中该酶基因型出现 3 种情况,具有正常催化活性的纯合子型:GG 型;催化活性下降的杂合子型:GA 型;催化活性失去的纯合子型:AA 型。乙醛脱氢酶是酒精代谢的关键酶。在肝脏内,乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase,ADH)催化乙醇脱氢生成乙醛,乙醛进一步在 ALDH 的催化下脱氢生成己酸,再经三羧酸循环途径氧化生成二氧化碳和水排出体外<sup>[3]</sup>。基因型 GA 和 AA 者,因不具有 ALDH 酶活性或酶活性下降,饮酒后可使乙醛氧化为乙酸延迟。乙醛损伤肝细胞可引起纤维变性,影响能量代谢并产生自由基,导致酒精中毒性肝炎、脂肪肝、纤维变性及肝硬化等。ALDH2 基因的作用除与酒精代谢相关外,另发现其与人类各系统及其他疾病间也密切相关。

有文献报道 ALDH2 是硝酸甘油(GTN)的有效代谢物一氧化氮(NO)形成的关键<sup>[4]</sup>。试验表明,ALDH2 基因在硝酸甘油对肺部及循环系统血管床的生物转化中发挥重要作用<sup>[5]</sup>,如果患者基因中携带有 ALDH2 基因(Glu487Lys)突变,可使硝酸甘油在体内的生物转化过程受阻,药物难以有效发挥作用<sup>[6]</sup>。

另外,相关文献报道,ALDH2 是不依赖乙醇的心血管疾病的独立影响因素,可通过减少活性氧簇(ROS)或解毒 4-HNE 途径抑制乙醛或缺氧而至的心肌细胞凋亡,对心功能不

全和心肌病起到保护作用<sup>[7]</sup>。ALDH2 缺陷型是冠心病的危险因素<sup>[8]</sup>,ALDH2 野生型伴随着更高的高血压风险<sup>[9]</sup>。由此可见,ALDH2 基因突变对多系统多类型疾病存在不良影响,ALDH2 基因型检测,可了解是否为突变基因携带,对各系统疾病均具有重要的临床指导意义。有利于对心血管病高危人群进行宣教,进行早期预防及干预;可指导硝酸甘油临床应用;以及在筛选酒精易感人群并采取有效的保护和干预措施等方面都具有潜在的应用价值。

本研究共检测样本 100 例,测出野生纯合型(GG 型)72 例;杂合突变型(GA 型)26 例;突变纯合型(AA 型)2 例。结合有关文献报道,江春晓等<sup>[10]</sup>曾检测 231 例样本,测出野生型 145 例,突变型 86 例;曹西蓉等<sup>[11]</sup>检测 60 例,测出(GG 型)37 例,(GA 型)21 例,(AA 型)2 例,提示 ALDH2 基因存在较高的突变率。

基因检测方法多样,目前线粒体 ALDH2 基因多态性检测方法主要有:PCR 产物限制性酶切片段长度多态性(PCR-RFLP)和直接测序法。PCR-RFLP 法的缺点是测定时间长、PCR 反应产生的气溶胶极易对其他标本产生污染、不能进行自动化的分析、结果的判读受到人为因素的影响等。测序法需要特殊的仪器和专门的操作人员,不适合在临床实验室应用<sup>[12]</sup>。本研究采用芯片检测法,该方法由 DNA 提取、杂交交叉、芯片扫描几个步骤组成,有以下几个优点:(1)各试剂在杂交仪内自动完成杂交、洗涤,一份标本一张芯片,避免了人工操作的污染,并且有效节省工作时间;(2)扫描仪自动分析图像,避免了人为判断的误差,相较传统方法较高效准确;(3)基因组 DNA 及 PCR 扩增产物经电泳分析证实为 ALDH2 基因,经测序验证,证实芯片检测结果与测序结果吻合,表明芯片检测结果可信;(4)实验操作简便,易于实验人员掌握;(5)相较于传统检测方法,芯片法的出现表明现代化检测技术在不断优化成熟。综上所述,表明芯片检测法快捷、高效、准确、先进,能满足临床对 ALDH2 基因检测的需求,是值得临床推广的一项新兴基因检测技术。本实验的不足之处:本研究方法属于临床实验性研究,样本量尚小,且限制在体检人群,下一步拟将扩大样本量,纳入临床各系统疾病患者,进一步观察 ALDH2 基因多态性芯片检测法在临床多系统疾病方面的指导意义。

参考文献

[1] 康品方,王洪巨,高琴.乙醛脱氢酶 2 与冠心病研究进展[J].中国老年学杂志,2012,32(2):414-416.  
[2] 屈启才,黄青青.乙醛脱氢酶 2 基因多态性与心脑血管疾病[J].医学综述,2010,16(4):487-489.  
[3] 张竹梅,边建超.乙醇代谢酶基因多态与肿瘤关系研究进展[J].中华医学遗传学杂志,2001,18(1):62-64.  
[4] 张怡,赵鹏飞,胡怡,等.线粒体乙醛脱氢酶 2 基因多态性对健康受试者硝酸甘油效应的影响[J].中国循环杂志,2013,28(7):528-531.  
[5] Adeleke M, Badejo Jr, chris Hodnette, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase mediates vasodilator responses of glyceryl trinitrate and sodium nitrite in the pulmonary vascular bed of the rat[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2010,299(8):819-826.  
[6] Li Y, Zhang D, Jin W, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2(ALDH2) Glu504Lys polymorphism contributes to the variation in efficacy of sublingual nitroglycerin[J]. J Clin Invest, 2006,116(5):506-511.  
[7] 潘强强,高琴,王洪巨.乙醛脱氢酶 2 与心血管疾(下转第 15 页)

于各种急性化脓性感染、急性风湿热、类风湿关节炎、菌血症、组织坏死、重症肺结核放射线损伤等。常规的 hs-CRP 的检测仅仅可在 CRP 浓度大于 10 mg/L 时测到,因而不能观察低水平(0.1~10.0 mg/L)的 CRP 变化,此浓度水平的 CRP 与心血管疾病有着较强的相关性<sup>[17]</sup>。目前免疫比浊法等高灵敏度检测方法应用,低水平的 CRP 亦可检测,因为检测方式的高灵敏度,所以这个水平的 CRP 为较高的 hs-CRP。hs-CRP 已在高血压疾病严重程度预测中得到广泛应用,本实验结果亦证实该蛋白可以敏感地反应妊娠高血压疾病的发病严重程度。

综上所述,妊娠高血压的发病机制与血清同型半胱氨酸、超敏 C-反应蛋白水平变化密切相关,妊娠高血压疾病组血清 Hcy 及 hs-CRP 水平明显升高,重度妊娠高血压疾病患者则明显高于中度和轻度妊娠高血压疾病患者组。动态监测孕妇血清中 Hcy 及 hs-CRP 水平有利于妊娠高血压疾病的预防及早期治疗,可以评价本病的病情发展及预后。综合评估本次研究的样本量偏小,随访时间短,有待今后进一步扩大样本量,更深入地研究血清 Hcy 及 hs-CRP 水平对于妊娠高血压疾病进程具有重大意义,为指导临床治疗提供参考价值。

参考文献

[1] Visser S, Hermes W, Ket JC, et al. Systematic Review and Meta-analysis on Non-classic Cardiovascular Biomarkers after Hypertensive Pregnancy Disorders[J]. Am J Obstet Gynecol, 2014, 28(2):242-247.

[2] Gruca-Stryjak K, Cofta S, Wysocka E, et al. Is there a relationship between pregnancy induced hypertension and obstructive sleep apnea case report[J]. Pneumonol Alergol Pol, 2014, 82(2):156-162.

[3] Myers JE, Kenny LC, McCowan LM, et al. SCOPE consortium. Authors' reply: Angiogenic factors combined with clinical risk factors to predict preterm pre-eclampsia in nulliparous women: a predictive test accuracy study[J]. BJOG, 2014, 121(4):507.

[4] Chen CW, Jaffe IZ, Karumanchi SA. Pre-eclampsia and cardiovascular disease[J]. Cardiovasc Res, 2014, 101(4):579-586.

[5] Wang W, Parchim NF, Iriyama T, et al. Excess LIGHT contributes to placental impairment, increased secretion of vasoactive factors, hypertension, and proteinuria in preeclampsia[J]. Hypertension, 2014, 63(3):595-606.

[6] Negi R, Pande D, Karki K, et al. Association of oxidative DNA damage, protein oxidation and antioxidant function with oxidative stress induced cellular injury in pre-eclamptic/eclamptic mothers during fetal circulation[J]. Chem Biol Interact, 2014, 208(1):77-

83.

[7] Liu LY, Yang T, Ji J, et al. Integrating multiple 'omics' analyses identifies serological protein biomarkers for preeclampsia[J]. BMC Med, 2013, 11(2):236.

[8] Yarde F, Maas AH, Franx A, et al. Serum AMH levels in women with a history of preeclampsia suggest a role for vascular factors in ovarian aging[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(2):579-586.

[9] Wenger NK. Recognizing pregnancy-associated cardiovascular risk factors[J]. Am J Cardiol, 2014, 113(2):406-409.

[10] Gilbert JS, Babcock SA, Regal RR, et al. Of risks and ratios: the usefulness of angiogenic balance for diagnosing preeclampsia at different gestational ages[J]. Hypertension, 2014, 63(2):210-211.

[11] Huang J, Wang L, Shi H, et al. Effect of lingguizhugan decoction on myocardial nuclear factor kappa B protein expression in rats with chronic heart failure[J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(3):343-348.

[12] Hofmann U, Frantz S. How can we cure a heart "in flame"? A translational view on inflammation in heart failure[J]. Basic Res Cardiol, 2013, 108(4):356.

[13] Khoo NK, Cantu-Medellin N, Devlin JE, et al. Obesity-induced tissue free radical generation: an in vivo immuno-spin trapping study[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(11/12):2312-2319.

[14] Celis R, Torre-Martinez G, Torre-Amione G. Evidence for activation of immune system in heart failure: is there a role for anti-inflammatory therapy[J]. Curr Opin Cardiol, 2008, 23(3):254-260.

[15] Kargin F, Takir HB, Salturk C, et al. The safety of beta-blocker use in chronic obstructive pulmonary disease patients with respiratory failure in the intensive care unit[J]. Multidiscip Respir Med, 2014, 9(1):8-10.

[16] Tabatabaian F, Dougherty K, Di Fulvio M, et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) and S6 kinase down-regulate phospholipase D2 basal expression and function[J]. Biol Chem, 2010, 285(25):18991-19001.

[17] Wang L, Liu ZQ, Huo YQ, et al. Change of hs-CRP, sVCAM-1, NT-proBNP levels in patients with pregnancy-induced hypertension after therapy with magnesium sulfate and nifedipine[J]. Asian Pac J Trop Med, 2013, 6(11):897-901.

(收稿日期:2015-07-15)

(上接第 12 页)

病研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(18):1962-1964.

[8] Chen L, Smith GD, Harbord RM, et al. Alcohol intake and Blood pressure: a systematic review implementing a Mendelian randomization approach[J]. Plos Med, 2008, 5(3):52.

[9] Nagasawa H, Wada M, Arawaka S, et al. A Ppymorphism of The aldehyde dehydrogenase 2 gene is a risk factor For multiple lacunar infarcts in Japanese men: the Takahata Study[J]. Eur J Neurol, 2007, 14(4):428-434.

[10] 江春晓, 陈玉国, 张运, 等. 中国汉族冠心病患者乙醛脱氢酶 2 基因多态性与 2 型糖尿病的关系[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(2):349-350.

[11] 曹西蓉, 吴德生, 周蓉, 等. 育龄期女性酒精代谢相关基因多态型的分布[J]. 环境与健康杂志, 2002, 1(1):25-28.

[12] 梁立武, 胡红焱, 王发强, 等. 荧光多聚酶链反应测定线粒体乙醛脱氢酶-2 GLu504Lys 多态性[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(4):451-455.

(收稿日期:2015-07-22)

