

吸烟者基因分型与吸烟行为的相互关系

Peter Bauer¹*, Susan Collins², and Anil Batra²

¹Department of Medical Genetics, University of Tübingen, Germany; ²Clinic for Psychiatry and Psychotherapy, University of Tübingen, Germany

* 联系作者: peter.bauer@med.uni-tuebingen.de

简介

吸烟行为同时受遗传和环境因素影响。此外,初始吸烟者和较长烟龄者之间至少存在 50% 的遗传可能性。目前大量的研究都试图摸清,过去认为与吸烟及成瘾相关联的神经生物学通路(如中央多巴胺能、5-羟色胺能及烟碱能通路)中多种遗传学标记分子与吸烟行为的不同表现间都有什么关系。为了研究未来的遗传性分析的可行性,我们利用LightCycler® 480系统的HybProbe杂交探针法对288位吸烟成瘾者的14个SNP位点进行基因分型。

Table 1: SNP frequency and associated smoking intensity.

SNPs	Frequency	Percentage	Smoking intensity M(SD)
ANKK 1(N=270)			
GG	179	66.3%	23.37(8.94)
GA	77	28.5%	23.04(8.01)
AA	14	5.2%	25.21(8.45)
DRD 3(n=271)			
AA	138	50.9%	23.52(7.87)
AG	109	40.2%	23.65(9.22)
GG	24	8.9%	22.08(10.83)
DRD 4(n=270)			
GG	246	91.1%	23.59(8.72)
GA	23	8.5%	22.32(8.66)
AAa	1	0.4%	---
COMT (n=268)			
AA	63	23.5%	24.18(9.45)
Other genotypes	205	76.5%	23.27(8.49)
SLR6A3 (n=264)			
CC	262	99.2%	23.54(8.73)
CTb	2	0.8%	---
MAOA (n=269)			
AA	45	16.7%	24.66(11.36)
GA	70	26.0%	21.69(7.74)
GG	154	57.2%	23.93(8.21)

材料与方 法

血液样本来自 272 名志愿者,自愿提供用于分析涉及尼古丁上瘾的靶基因样本。DNA 的分离采用手动高盐法(236 份样本)或 MagNA Pure Compact 全自动快速核

酸纯化系统和 Nucleic Acid Isolation Kit I (36 份样本)。

用于分析 14 个不同的 SNP 位点的引物和 HybProbe 探针 (Figure 1) 由 Tib Molbiol (柏林) 设计,使用 BiRobot 8000 自动化平台完成 384 孔板上的 LightCycler® 480 Master 的分装和加样。PCR 反应体系请详见参考文献 [1], 每个反应使用 10 pmol 引物和 3 pmol 杂交探针(受体和供体), PCR 的反应体积为 10 µl, 扩增 55 个循环并且利用 touchdown PCR 程序设计(逐步降低退火温度从 65°C 到第十个循环的 55°C, 每个循环降低 1°C)。

优化基因分型检测

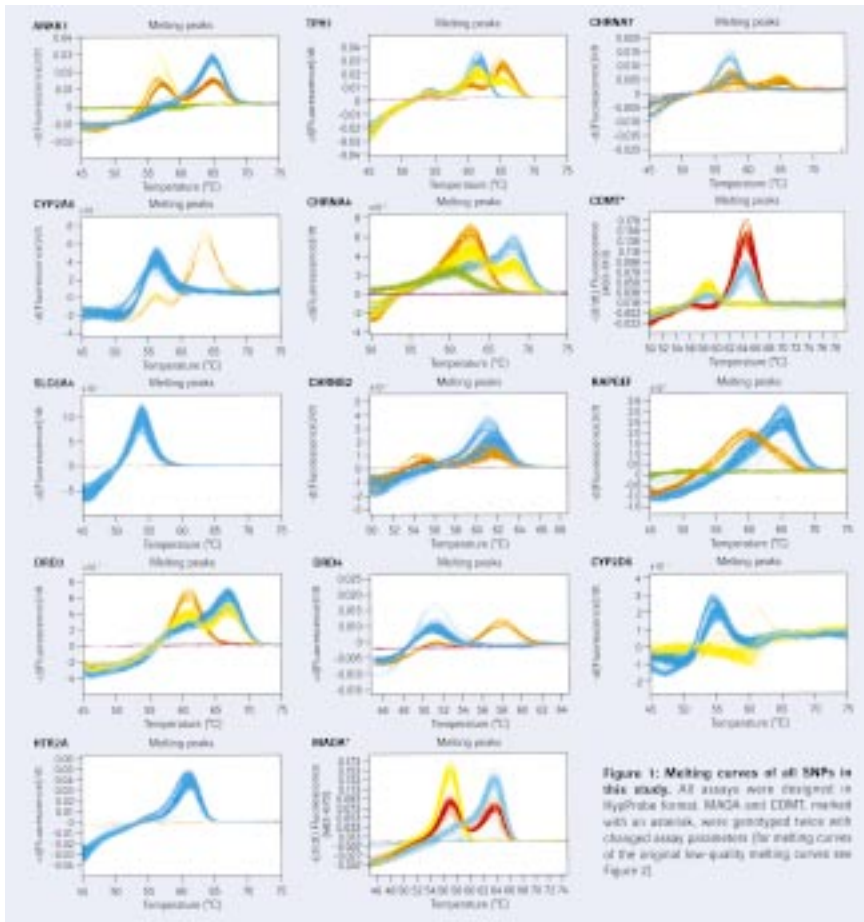
通过 touchdown PCR 程序以及不对称扩增(优先扩增与受体和供体探针互补的单链)从 14 个基因分型测定中得到 12 个强信号结果 (Figure 1), 其中的 2 个 SNP 位点的检测 (COMT 和 MAOA), 还需要用其他方法进行验证, 以得到可靠的分型结果。

COMTV158M 多态性

标准法对于错配(低溶解温度)和非错配(高溶解温度)等位基因显示了很不平衡的溶解峰值 (Figure 2)。改变引物和探针的浓度已经不能改善这种模式。在这种情况下, 我们只能区分纯合子基因型 BB (紫色) 和所有其他基因型 (AA 和 AB, 黄色和蓝色样本)。最后, 我们决定把未标记的正向引物向上游移动 50 个碱基, 并通过这一简单的改动, 大大改善了的基因分型检测结果。重复实验后我们得到 268 份可靠的基因型结果 (其中 1.5% 由于技术性操作失败)。

MAOA 多态性

在这个例子中, 同样地, 高温溶解峰的溶解曲线呈现多种形态, 因此并不能得到精确的基因分型 (Figure 2)。偏斜的溶解图并不能可靠区分 AB 基因型 (黄色曲线) 和 BB 基因型 (红色曲线)。在 20 µl 的反应体系中, 我们

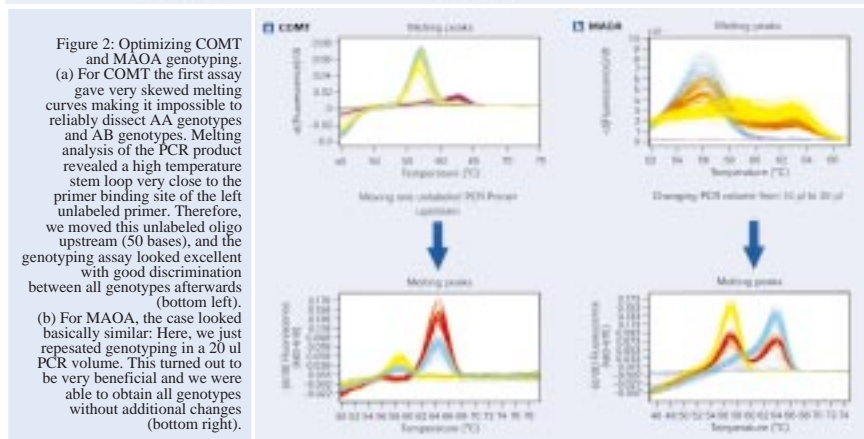


(SLC6A4, HTR2A, RAPGEF) 被错误地标注在公共数据库中，虽然 PCR 结果很好，但并没有杂合型。MAOA 和 COMT 的基因型要通过上移未标记探针和加倍反应体积从 10 μ l 到 20 μ l 得以改进。

在 14 个 SNP 位点中 11 个 SNP 位点是多态性的。对于这 11 个 SNP 位点，基因型数据并没有显著偏离哈代-温伯格平衡，从而证明基因分型系统的高精确性。此外，我们利用一个单独的限制性片段长度多态性方法验证了 ANKK1 基因的 SNP (RFLP 数据未显示)，得到完全相同的基因型。在这项研究中 LightCycler® 480 Instrument 基因分型的成功率 95% 以上 (见 Table 1)，LightCycler® 480 仪器在此发挥了很好的作用。

结论

我们的基因分型资料表明，利用 LightCycler® 480 仪器与 HybProbes 对多巴胺系统进行遗传变异分析是可行的。这一新的高通量技术，使我们得到更多可靠的基因分型结果，从而能更准确地分析基因变异与吸烟行为的关系，进一步的研究将在临床相关协会报道。



会得到较好的熔解曲线图，因此两倍 PCR 反应体积的再次基因分型法也是一种技术上的处理方法。同样，我们也能提供 MAOA 可靠的基因分型结果 (1.9% 技术性操作失败可能来源于不好的 DNA 质量)。

结果与讨论

我们对于 272 名吸烟者的 14 个 SNP 位点进行分析，系统失败率只占百分之三以下。其中的 3 个 SNP 位点

参考文献

1. Walter et al. (2006) Biochemica 2:8-11

产品名称	包装规格	序列号
MagNA Pure Compact Instrument	1 instrument	03 731 146 001
MagNA Pure Compact	1 kit (32 isoations)	03 730 964 001
Nucleic Acid Isolation kit 1		
LightCycler® 480 Instrument	1 instrument (96 well)	04 640 268 001
	1 instrument (384 well)	04 545 885 001
LightCycler® 480 Genotyping Master	4*384 μ l (5*conc.)	04 707 524 001