

班级：整合科学综合实验课程 2

学号：2200017797

姓名：侯书洋

邮箱：2200017797@stu.pku.edu.cn

实验名称：哺乳动物和人类同源基因遗传多样性的检测

实验日期：2023 年 10 月 13 日、10 月 20 日、10 月 27 日

一. 摘要:

本实验首先以实验参与者为样本探究 ALDH2 和 TAS2R38 基因在人群中的多态性，其次利用 UCSC 等数据库中不同物种的 ALDH2 和 TAS2R38 基因的同源序列分别构建系统发生树。通过干实验、湿实验结合的方式，以 ALDH2 和 TAS2R38 为例检测人类和哺乳动物同源基因的遗传多样性，同时初步学习研究基因多样性、生物演化的基本方式。

二. 前言:

在人体中：属于 ALDH 家族的 ALDH2 编码靶向线粒体的乙醛脱氢酶，在乙醇代谢途径中发挥着至关重要的作用；属于 TAS2R 家族的 TAS2R38 编码一种细胞膜上的 GPCR 受体，可以对特定的物质(如 PTC、PROP 等)产生苦觉。对 ALDH2 和 TAS2R38 基因多态性的研究，最早源于人们对人群中一些“有趣”性状的研究，如东亚地区人群中普遍存在的“饮酒后脸红”现象(Asian Flash)，以及有些人可以尝出 PTC 及其类似物的苦味(Taster)而有些人则不能(Non-Taster)。

作为生物学中的“历史学”，系统发育学家们不满足于对性状进行基因层面、分子层面的解释，而是把目光移向更广阔的天地：去探寻群体甚至物种间基因的多样性，去溯源基因的演化历程等。构建系统发生树作为系统发育学研究的基本手段，应该是生物学家所必须具备的基本素养。

本文中第三部分总结了实验的基本流程，第四部分对获得的结果(包括湿实验所获的凝胶电泳的胶图和测序结果，以及干实验所构建的系统发生树)进行初步的讨论，第五部分为依据实验结果和参阅文献进行更进一步的讨论。

三. 实验原理、基本流程与实验步骤方法:

(一) 实验原理:

3.1.1 基因组 DNA 的提取:

1. 蛋白酶 K (Protease K)用于消化伴随 DNA 的蛋白质成分(如组蛋白等);
2. Buffer AL 是含有高浓度盐酸胍的细胞裂解液；盐酸胍也是强的蛋白变性剂，便于将 DNA 链从染色质丝中释放出来；
3. Buffer AW1 含有高浓度盐酸胍和氯化钠，洗掉滤柱上非特异性结合的蛋白；
4. Buffer AW2 的基本成分为 Tris-HCl、水和乙醇，可以洗掉滤柱上残留的盐酸胍、氯化钠等盐离子；
5. Buffer AE 的基本成分为 Tris-HCl 和 EDTA，可以将滤柱上吸附的 DNA 洗脱。

3.1.2 Nanodrop 的吸光度信号:

1. A260 是核酸(DNA、RNA)最高吸收峰的大致波长，因此 A260 的值反映被测液中核酸的浓度大小；
2. A280 是蛋白质和酚类物质最高吸收峰的大致波长；
3. A230 是一些盐类、多糖、有机溶剂等较高吸收峰的大致波长；

3.1.3 系统发生树与构建系统发生树的常用方法:

1. 系统发生树:

系统发生树(phylogenetic tree)是物种间、群体间、基因间乃至个体谱系关系的一种表现形式。在离散数学中,定义图(graph)为一组顶点(vertex)和定义在顶点集合上的二元关系边(edge),一棵树(tree)就是一个没有回路的连通图(Tucker, 1995)^[1];在生物学中,用节点(node)代替顶点,用分枝(branch)代替边。

系统发生树中,外界点(external node)或叶(leaf)代表现存的物种,而内节点(internal node)通常代表已经灭绝的祖先。具有明确的根的树被称为有根树(rooted tree),未知或未明确指出树根的树称为无根树(unrooted tree)。大多数重建系统发生树的方法不能确定树根而只能产生无根树,一种常见的构建有根树的方法是外类群置根法(outgroup rooting):在重建系统发生树的过程中人为引入(已经被承认的)和其它物种关系较远的物种(称为外类群, outgroup),最后在所构建出的无根树中,将树根置于连接所选择的外类群的分枝上,从而使得其它的物种(这些物种相对而言构成内类群, ingroup)所在的子树有根。此外,在系统发生树中,一棵树的分枝样式被称为树的拓扑结构(topology),树中一个分枝的长度可以表示序列间的分歧程度或者该分枝进化所经历的时间长短。

表征一组物种之间关系的系统发生树称为物种树(species tree),表征来自物种的一组或多组同源基因序列之间关系的系统发生树称为基因树(gene tree)。一系列研究表明,有很多因素可能导致构建的基因树不同于对应构建的物种树,比如在物种早期进化期间可能存在横向基因转移(lateral gene transfer, LGT) (Doolittle, 1998)^[2]。在本次干实验模块,我们利用不同物种 ALDH2 和 TAS2R38 的同源序列建立基因树,在后续的结果讨论中也可以看到所构建基因树与 UCSC 数据库中给出的物种树存在拓扑结构上的差异(见:五.(三)部分)。

2. 系统发生树的构建方法:

本次干实验中利用三种方法构建系统发生树:最大似然法(Maximum Likelihood)、邻接法(Neighbor Joining)、最小进化法(Minimum Evolution)。系统发生树的构建方法大致上可分为两大类:基于代数的算法(聚类算法)和基于最优化的算法(搜索方法)。聚类算法中,通过给定序列之间的相互比对可以获得距离矩阵(distance matrix),之后便基于对距离矩阵的操作将其转化为一棵系统发生树,代表性的算法有邻接法。搜索方法中,在构建系统发生树之前先给定一个最优标准(目标函数)与序列比对的数据配合,在最优标准下具有最高得分的树才是对真实系统发生树的估计,代表性的算法有最小进化法(最优函数为树的总枝长,可以看作在给定的一个图中求解其最小生成树)和最大似然法(最优函数为对数似然分值,利用置换模型来计算似然函数)。

本次实验构建系统发生树利用软件 MEGA11。

(二) 实验基本流程:

1. 签订知情同意后,以小组为单位获取个体乙醛脱氢酶(ALDH2)和苦味受体(TAS2R38)的基因测序结果,并依据基因测序结果分析表型;
2. 基于数据库中不同物种 ALDH2 和 TAS2R38 的同源序列,利用系统发生学的基本原理分别构建系统发生树;
3. 综合上述实验结果,进行相关表型、基因多样性等方面的分析。

^[1] Tucker, A. (1995), Applied Combinatorics. Wiley, New York: p.1

^[2] Doolittle, F. W., (1998), You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes, Trends in Genetics (14)

(三) 实验步骤与方法:

3.3.1 表型调查与基因组 DNA 的提取:

1. 依据个人经历(比如: 自己或者父母喝酒是否会脸红)表征实验参与者的乙醛代谢能力; 利用丙基硫氧嘧啶(PROP)的苦味试纸检测实验参与者对特定苦味的敏感程度;
2. 充分漱口后, 用消毒棉签在口腔内壁反复用力刮擦数次后, 将棉签封存在洁净的信封中阴干, 作为个人的 DNA 提取物; 同时, 转交一份 DNA 提取物给同组的搭档;
3. 将棉签头剪下后置于 1.5 mL 无菌离心管中, 并向其中依次加入 200 μ L PBS 缓冲液、20 μ L 蛋白酶 K 和 200 μ L Buffer AL, 充分震荡混匀后 56°C 金属浴加热 10 min;
4. 转移液体至新的 1.5 mL 无菌离心管中, 注意用枪头挤压出棉签头残余的液体; 将得到的液体在 14000 rpm 下离心 1 min, 取上清液转移至新的 1.5 mL 无菌离心管中, 转移时注意避免吸入固形杂物;
5. 向离心管中加入 200 μ L 无水乙醇, 混匀后将所得溶液转移至 DNeasy Mini Spin Column 滤柱中;
6. 将滤柱置于 2 mL 收集管上, 在 14000 rpm 下离心 1 min, 离心后丢弃滤液;
7. 将滤柱置于新的 2 mL 收集管上, 向滤柱中加入 500 μ L Buffer AW1(已提前添加无水乙醇), 在 14000 rpm 下离心 1 min, 离心后丢弃滤液;
8. 再将滤柱置于新的 2 mL 收集管上, 向滤柱中加入 500 μ L Buffer AW2(已提前添加无水乙醇), 在 14000 rpm 下离心 3 min, 离心后丢弃滤液;
9. 晾干至滤柱无明显乙醇气味后, 将滤柱放置在新的 1.5 mL 收集管上; 向滤柱中滤膜中心位置滴加 50 μ L Buffer AE, 静置 1-2 min 后在 14000 rpm 下离心 1 min; 收集离心所得滤液, 得到相应的 DNA 提取原液;
10. 取 1 μ L DNA 提取原液, Nanodrop 检测(利用 Buffer AE 调零)其中 DNA 的浓度, 记录检测数据; 如果 DNA 浓度不理想, 将滤液重新加回滤柱中, 再次静置、离心后检测, 直到 DNA 浓度数据正常;
11. 取含 100 ng 以上的 DNA 溶液, 混以对应量 $\times 6$ 的 Loading Buffer 做 1% 琼脂糖凝胶电泳(0.1 g 琼脂糖 \sim 10 mL TAE \sim 0.5 μ L Gene Color), 选用 1 kbp Ladder DNA Marker (DM1201)标定产物片段长度, 电压选用 120 V; 获取并保存相应电泳结果图;
12. 取剩余的 DNA 原液用 Buffer AE 稀释至 5 ng/ μ L 左右, 标记后低温储藏。

3.3.2 检测位点的引物设计:

1. 在 UCSC 基因组数据库中检索人类(GRCh38/hg38)的 ALDH2 和 TAS2R38 基因序列, 并下载其完整的 CDS 序列和目标片段附近的连续全场序列;
2. 利用在线序列处理平台 Benchling, 在 ALDH2 基因的 CDS 序列中定位第 1510 位点突变, 在 TAS2R38 基因的 CDS 序列中定位第 145、785、886 位点突变;
3. 分别在相应的目标片段连续全场序列中定位上述标记的点突变作为检测位点, 并利用 Benchling 内置的 Wizard 工具分别设计各检测位点的 PCR 扩增引物。

3.3.3 目标片段的 PCR 扩增和测序:

1. 取公用引物(已提前设计)干粉于 1.5 mL 无菌离心管中, 在 12000 rpm 下离心 1 min 后, 加入适量 TLE 溶解至 100 μ M 储存液;
2. 取 Forward、Reverse 引物储存液各 5 μ L, 加入 90 μ L TLE 后, 获得 100 μ L 5 μ M 的 Primers Mix 工作液;
3. 使用 15 μ L PCR 体系(成分如图一), 分别配置 6 个样品的 PCR 扩增体系(3 对引物 \times 2 个模版), 每个样品做 1 次重复, 并加设 1 组空白对照, 共计 13 份 PCR 体系;

15 uL PCR体系	
Reagent	Volume (uL)
蒸馏水	2.95
10 × Buffer	1.50
dNTP	1.20
Primers Mix (5 uM)	2.00
Mg^{2+}	1.20
TaqGold	0.15
Template	6.00
Total	15.00

(图一: 15 μ L PCR 体系成分表)

- 将配置好的 PCR 小管做好标记后, 涡旋混匀并使用小离心机离心;
- 设定 PCR 扩增的运行程序(程序如图二), 将 PCR 小管进行扩增反应;

Touch Down PCR Programme		
Process		Times
a	96°C 15min	1
b	96°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 45 s	2
c	96°C 15 s, 58°C 30 s, 72°C 45 s	2
d	96°C 15 s, 56°C 30 s, 72°C 45 s	2
e	96°C 15 s, 54°C 30 s, 72°C 45 s	2
f	96°C 15 s, 52°C 30 s, 72°C 45 s	2
g	96°C 15 s, 50°C 30 s, 72°C 45 s	42

(图二: 梯度降温 PCR 扩增程序)

6. PCR 扩增结束后, 取 5 μ L DNA 扩增产物溶液混以 1 μ L 6× Loading Buffer, 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳(0.15 g 琼脂糖~10 mL TAE~0.5 μ L Gene Color); 选用 100 bp Ladder DNA Marker (DM1001)检测扩增产物片段的长度, 电压设置为 120 V;

- 依据电泳结果, 选择需要送往测序的 DNA 扩增产物(每人送测 6 份 PCR 样品)。

3.3.4 系统发生树的构建:

- 从 UCSC、NCBI 等基因数据库中分别下载 ALDH2 和 TAS2R38 在不同物种中的同源序列, 注意选取物种的范围并且做好同源序列的信息标注;
- 利用 MEGA 程序, 分别用最大似然法(Maximum Likelihood)、邻接法(Neighbor Joining)、最小进化法(Minimum Evolution)构建 ALDH2 和 TAS2R38 的系统发生树;
- 依据上述所得系统发生树, 查阅文献资料, 进行不同物种间相关表型、基因型层面的多样性分析。

四. 实验结果:

1. 表型调查结果:

下图(图三)是实验参与者有关乙醛代谢和苦味敏感的表型调查的统计结果:

No.	姓名	酒精代谢能力自述	苦味自我认知	苦味试纸测试结果描述
1	苗昕湜	山东人/东北人, 自己喝酒不脸红; 爸爸喝酒会脸红, 妈妈不常喝	苦味敏感, 不怎么能接受苦味	4-5分, 非常苦
2	吴偲媛	爸爸浙江人, 喝酒会脸红; 妈妈江苏人, 不常喝	没什么特别的感觉, 一般苦味敏感	2-3分, 一般苦
3	陈俭德	河南/江西人, 自己喝二两白酒就会脸红; 爸爸妈妈都有脸红现象	应该不太敏感, 会吃苦瓜等蔬菜	2分, 一般苦
4	侯书洋	爸爸会脸红, 安徽人; 妈妈喝得少, 但是不脸红	没觉得菜类很难吃, 不太敏感	4-5分, 非常苦
5	张雅芝	湖北人, 爸爸妈妈喝酒都脸红, 但自己喝酒不脸红	爱吃苦瓜, 爱吃蔬菜	3分, 一般苦

(图三: 乙醛代谢和苦味敏感的表型调查统计表)

从上图可知, 参与实验的五名同学中, 乙醛代谢能力方面, 既有饮酒后脸红的表型也有饮酒后不脸红的表型, 但苦味敏感的表型主要集中在对 PROP 试纸感到“一般苦”和“非常苦”的类型 (Taster) 上。

2. Nanodrop DNA 提取原液分光结果:

下图(图四)是利用微量分光光度计 Nanodrop 对 DNA 提取原液吸光度信号检测结果的汇总表(用 Buffer AE 调零), 其中 HSY_Self 命名组为自己的 DNA 提取原液, HSY_wsy 命名组为同小组搭档的 DNA 提取原液。

Nanodrop Results:				
HSY_Self			HSY_wsy	
Nucleic Acid	87.5 ng / uL		Nucleic Acid	100.5 ng / uL
A260	1.749		A260	2.009
A280	0.909		A280	1.027
A260 / A280	1.92		A260 / A280	1.96
A260 / A230	3.42		A260 / A230	3.02
Factor	50.00		Factor	50.00

(图四: Nanodrop 对 DNA 提取原液的吸光度测量结果)

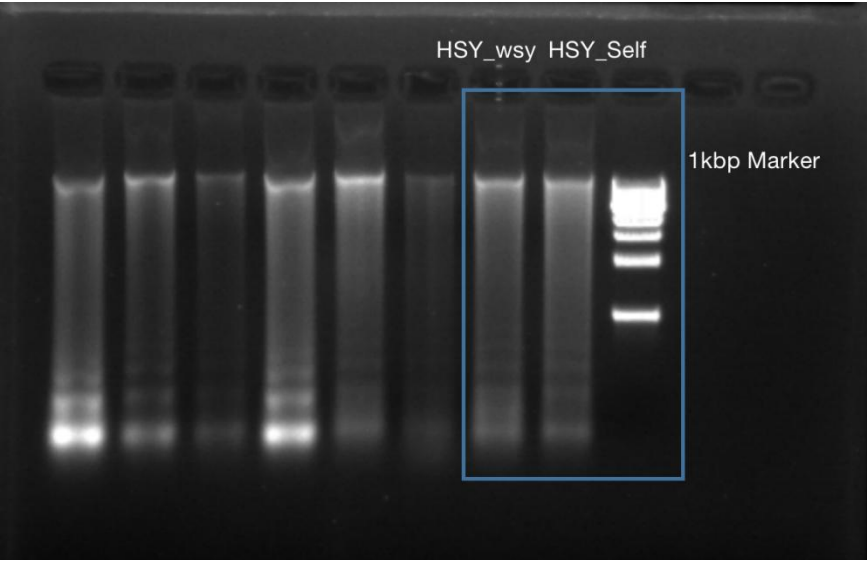
实验中所得两组 DNA 提取原液的浓度均大于 80 ng/μL, 达到了预期的标准值。260 nm 与 280 nm 吸光度比值(A260/A280)落在正常范围的边缘(1.8-2.0) (Loughrey, Matlock, 2021)^[1], 而由于正常情况下纯净的 RNA A260/A280 比值比 DNA 略大, 所以两组 DNA 提取原液中可能掺杂了一定量的 RNA 杂质。此外, 两组提取液 260 nm 与 230 nm 吸光度比值(A260/A230)明显偏大, 说明提取液中可能存在较多的糖等碳水化合物或者一些无机盐类的杂质(在含有螯合了二价阳离子的 EDTA 溶液中测量 DNA A260/A230 比值可以超过 3.0) (Koetsier, et al, 2020)^[2]。

3. DNA 提取原液琼脂糖凝胶电泳结果图:

下图(图五)为对 DNA 提取原液进行 1% 琼脂糖凝胶电泳的结果胶图, 7、8 两孔分别为同组搭档(HSY_wsy)和自己(HSY_Self)的 DNA 提取原液, 第 9 孔为 1kbp Ladder DNA Marker (DM1201)。

^[1] Loughrey, S., Matlock, B. (2021). Detection of Protein in Nucleic Acid Samples Using the NanoDrop One Spectrophotometer. Thermo scientific

^[2] Koetsier, G., Cantor, E., et al. (2020). A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. NEB



(图五: DNA 提取原液的琼脂糖凝胶电泳胶图)

DNA 提取原液的凝胶电泳胶图中, 7、8 孔有较为明显的主带, 主带位置大致与 9 孔 1kbp Marker 第一条亮带平齐, 但亮度相比明显偏暗。此外, 7、8 孔的条带中也有明显的拖尾现象。

出现上述现象的原因可能是 DNA 提取原液中掺杂了较多的 RNA 杂质。在进行 DNA 原液提取的时候, 我们并没有用 RNA 酶消化, 这可能使得最后富集到的 DNA 中仍保有较多 RNA 杂质。这些短链 RNA 杂质在电泳时迁移速率比长链 DNA 快, 因此条带中会出现拖尾; 此外, 这些短链 RNA 杂质也会与 DNA 竞争 Gene Color 的着色, 使得胶图中主带的亮度下降。

4. 检测位点的 PCR 引物设计结果:

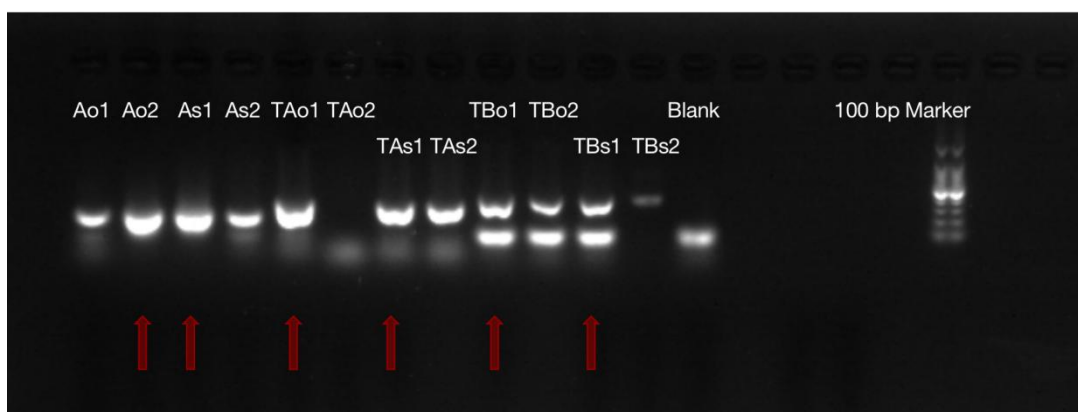
下图(图六)为针对 ALDH2 第 1510 位点, TAS2R38 第 785、886 位点和 TAS2R38 第 145 位点设计的三组引物的序列信息, 其中 M13F 和 M13R 为固定序列。三组引物对应最终 PCR 产物的长度依次为 314、371、329。

Gene	Position	Forward/Left Primer				
		M13 F	Sequence	Length	Tm	GC%
ALDH2	1510	TGTAAAACGACGGCCAGT	gaacttcagcaggcctgagtcce	25	64.5	64
TAS2R38	785、886	TGTAAAACGACGGCCAGT	CCATTCTCAGCACAGTGTCCGG	22	59.6	59.09
TAS2R38	145	TGTAAAACGACGGCCAGT	CCAGAGGTTGGCTTGGTTTGCAAT	24	60.2	50
		Reverse/Right Primer				
		M13 R	Sequence	Length	Tm	GC%
ALDH2	1510	CAGGAAACAGCTATGACC	cccataacccccaagagtgat	21	55.3	52.38
TAS2R38	785、886	CAGGAAACAGCTATGACC	CTGGGATGCTGACTGTCTCCCT	22	59.5	59.09
TAS2R38	145	CAGGAAACAGCTATGACC	ACATCATGTTGACTCTAACTCG	22	52.2	40.91

(图六: ALDH2、TAS2R38 基因测序位点的引物设计)

5. 目标位点 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果图:

下图(图七)为 PCR 扩增产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳的结果图。标注中, 首起 “A” 表示对 ALDH2 第 1510 位点的扩增产物片段, 首起 “TA” 表示对 TAS2R38 第 145 位点的扩增产物片段, 首起 “TB” 表示对 TAS2R38 第 785、886 位点的扩增产物片段; 中缀 “o” 表示该 DNA 序列来源同组搭档(Others), 中缀 “s” 表示该 DNA 序列来源自己(Self); 后随数字 1、2 代表重复实验。Blank 为蒸馏水对照组(选用 ALDH2 位点扩增所需的公用引物填充)。



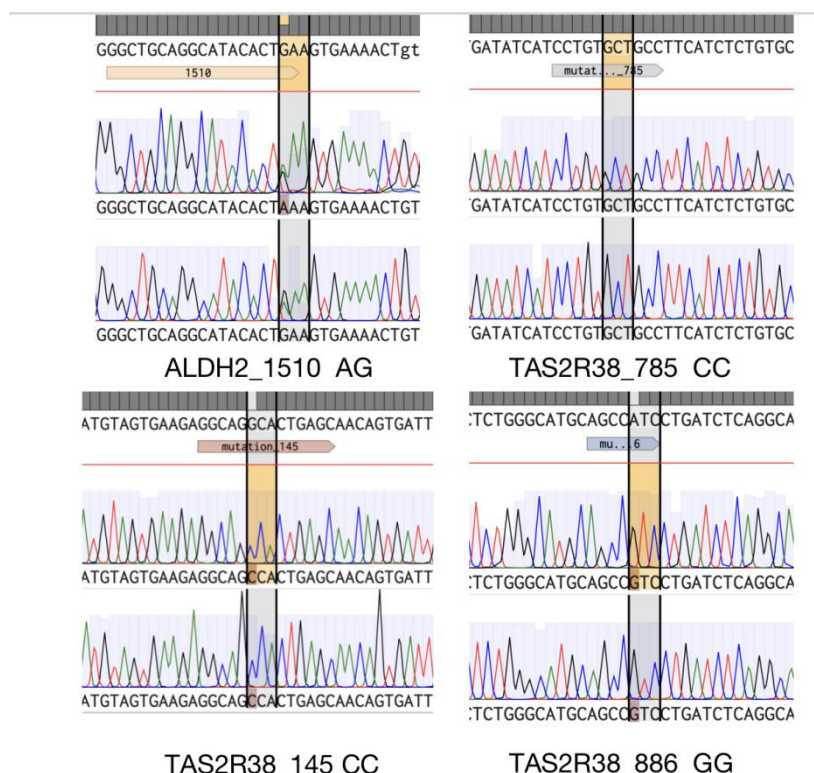
(图七: PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果图)

除了 TAo2 和 TBs2 两组, 其余孔道均收获了较亮的主带(对应成功扩增的 DNA 片段, 大致长度均在 200-300 bp)。对比蒸馏水 Blank 组, TBo1、TBo2、TBs1 三组也伴有较多的引物自聚的产物(靠下的第二条亮带)。12 组实验组的凝胶电泳结果图中均没有明显的拖尾现象, 说明产物纯度较为理想。

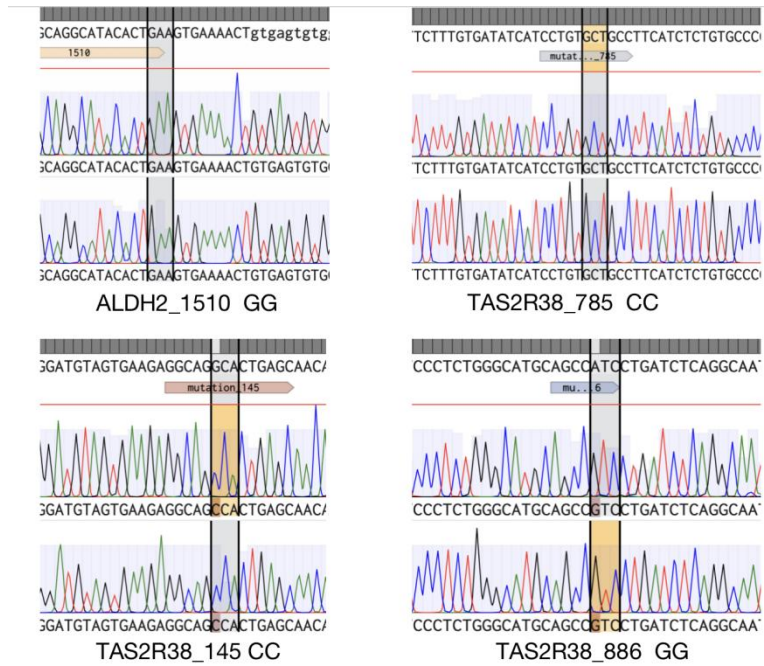
结合图七的 PCR 扩增产物电泳结果, 选择 Ao2、As1、TAo1、TAs1、TBo1、TBs1 六组送测(图七中用红色箭头指出)。

6. ALDH2、TAS2R38 目标位点 Sanger 测序结果:

利用 Benchling 软件, 得到 ALDH2(位点 1510)和 TAS2R38(位点 145、785、886)的基因测序结果如下, 其中组图八为自己(Self)的测序结果, 组图九为同组搭档(Others)的测序结果。



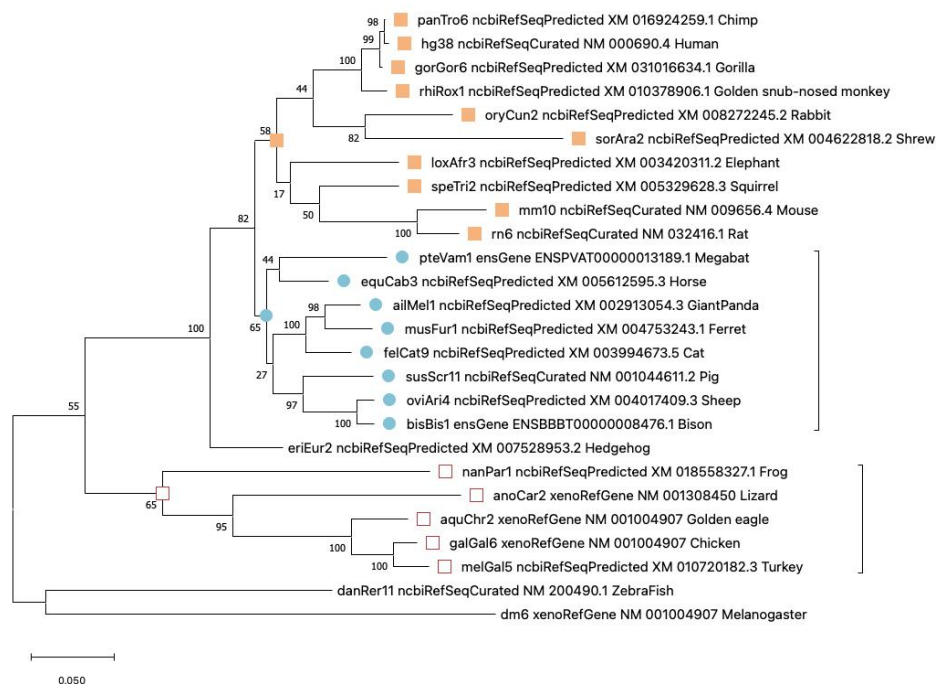
(组图八: 对应自己的目标基因位点测序结果。其中 ALDH2 外显子基因第 1510 位为杂合 AG, 对应的是 ALDH2 Glu/Lys 杂合突变型; TAS2R38 外显子第 145、785、886 位均纯合, 对应的表型均是 Taster)



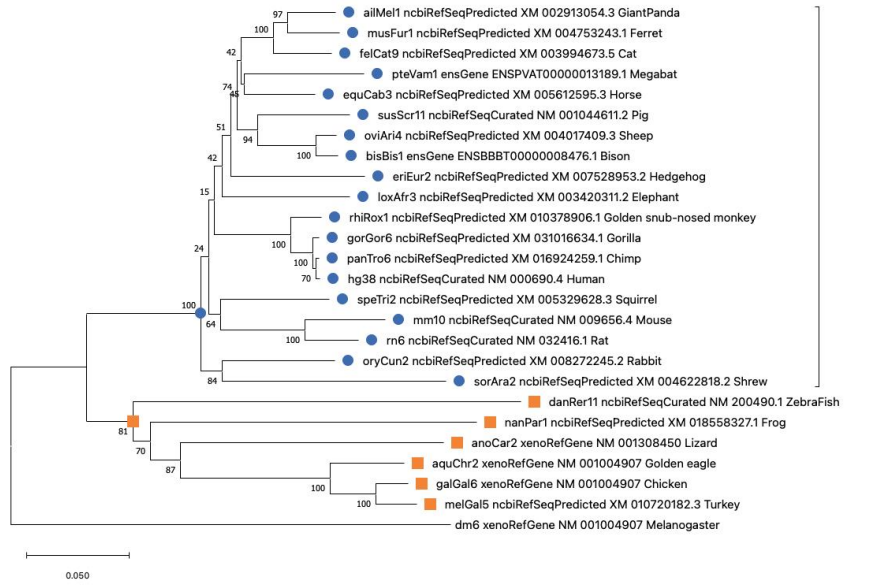
(组图九：对应同组搭档的目标基因位点测序结果。其中 ALDH2 外显子基因第 1510 位为纯合 GG，对应的是 ALDH2 Glu/Glu 纯合野生型；TAS2R38 外显子第 145、785、886 位均纯合，对应的表型均是 Taster)

7. 利用 ALDH2、TAS2R38 同源序列绘制系统发生树：

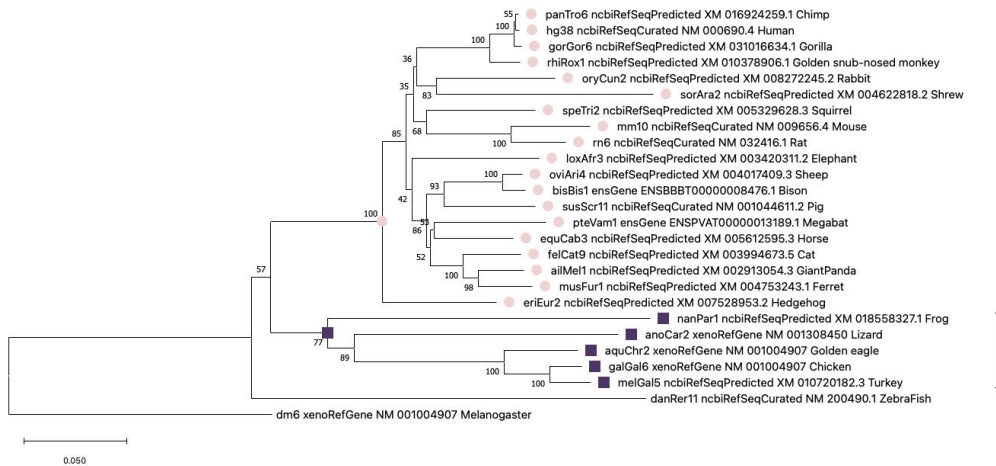
从 UCSC 数据库中获取不同物种的 ALDH2 和 TAS2R38 的同源序列信息，利用 MEGA 软件分别建立最大似然法(Maximum Likelihood)、邻接法(Neighbor Joining)、最小进化法(Minimum Evolution)的系统发生树如下(图十是以 ALDH2 同源序列建树，图十一是以 TAS2R38 同源序列建树， Bootstrap = 500)：



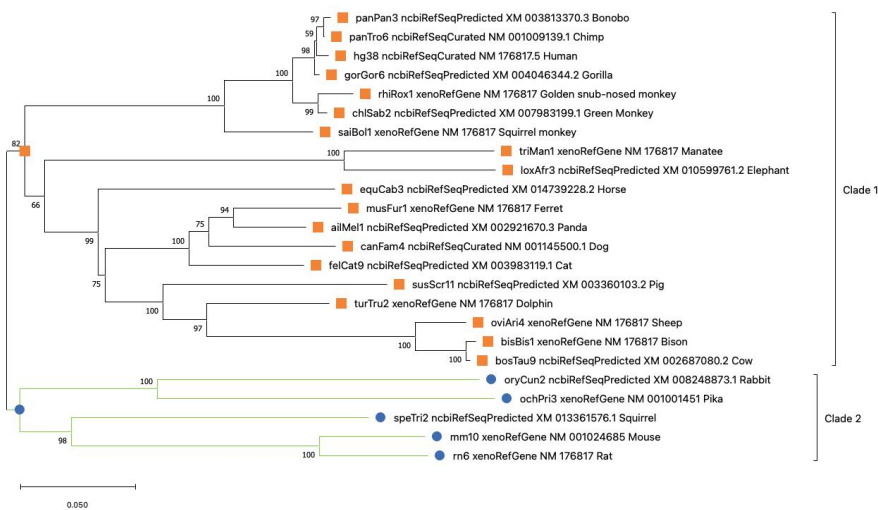
(图十_1：ALDH2_Maximum Likelihood 建树)



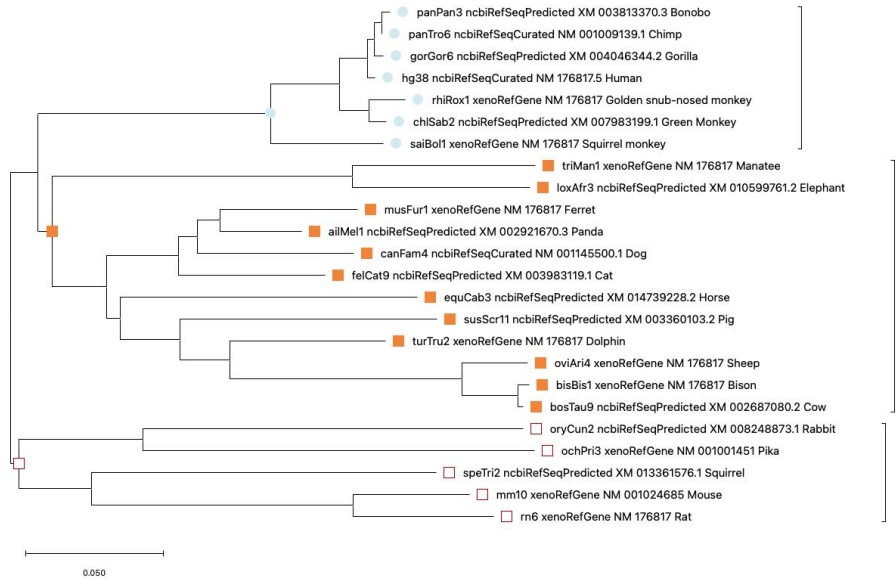
(图十_2: ALDH2_Neighbor Joining 建树)



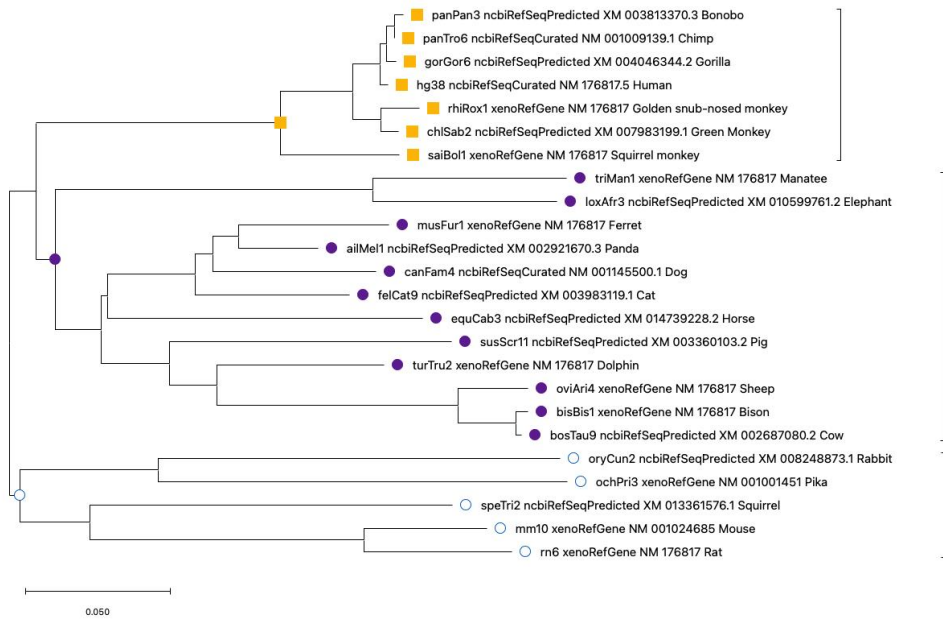
(图十_3: ALDH2_Minimum Evolution 建树)



(图十一_1: TAS2R38_Maximum Likelihood 建树)



(图十一_2: TAS2R38_Neighbor Joining 建树)



(图十一_3: TAS2R38_Minimum Evolution 建树)

五. 实验结果讨论:

(一) ALDH2 与 TAS2R38 基因位点突变信息统计:

下图(图十二)是对 2017-2023 所有实验参与者 ALDH2、TAS2R38 相应位点突变信息的统计汇总:

基因位点	碱基	频率
ALDH2_1510	G	84.13%
	A	15.87%
TAS2R38_145	C	71.74%
	G	28.26%
TAS2R38_785	C	69.17%
	T	30.83%
TAS2R38_886	G	69.17%
	A	30.83%

Total Results(2017-2023)						
基因	位点	基因型	推测表型	总人数	频数	频率
ALDH2	ALDH2_1510	GG	野生型纯合, 饮酒不脸红	63	43	68.25%
		AG	杂合, 饮酒脸红		20	31.75%
		AA	突变型纯合, 饮酒脸红		0	0.00%
TAS2R38	TAS2R38_145	CC	野生型纯合, 苦味敏感	46	24	52.17%
		CG	杂合, 苦味敏感		18	39.13%
		GG	突变型纯合, 苦味不敏感		4	8.70%
	TAS2R38_785	CC	野生型纯合, 苦味敏感	60	29	48.33%
		CT	杂合, 苦味敏感		25	41.67%
		TT	突变型纯合, 苦味不敏感		6	10.00%
	TAS2R38_886	GG	野生型纯合, 苦味敏感	60	29	48.33%
		AG	杂合, 苦味敏感		25	41.67%
		AA	突变型纯合, 苦味不敏感		6	10.00%

(图十二：2017-2023 实验参与者基因型数据汇总，数据来源：北京大学罗述金课题组)

就上组图统计数据而言，实验参与者中 ALDH2 第 1510 位突变为 A 的频率为 15.87%，这和 Goedde 等人(1992)提到 ALDH2 突变基因在中国的频率大致为 15.9%(Goedde, et al,1992)^[1]接近。

人体中 ALDH2 位于 12 号染色体，靶向线粒体，是酒精代谢过程中氧化乙醛生成乙酸的关键酶。在人类基因组 ALDH 家族中只有 ALDH2 表现出遗传的多态性，其中广受研究的是位于 ALDH2 外显子氨基酸序列第 487 位的突变(Glu 突变为 Lys)。其中可以认为 Glu 对 Lys 等位基因是不完全显性，但 ALDH2 Glu/Lys 杂合子编码的酶活性比 ALDH2 Glu/Glu 纯合子的酶活性低至少 100 倍(Brooks, et al, 2009)^[2]。此外，根据 Mimy 等人(2007)^[3]的统计结果，ADH(乙醇脱氢酶)基因的多态性位点(ADH1B)在中国等东亚地区突变的频率也很高(接近 70%)，该位点杂合或者纯合突变都会提高编码的 ADH 酶活性。因此在东亚，人群中同时携带 ADH1B 突变和 ALDH2 突变的概率较高，而两种突变共同作用会使得乙醇在代谢过程中快速变成乙醛并在血液中累积，从而使得饮酒后 4h 内人体血液中乙醛含量显著高于代谢正常类型组(wild type)^[4]；而乙醛会刺激毛细血管舒张，这可能是东亚地区人群喝酒常会“脸红”的原因之一。

此外, ALDH2 基因第 1510 位的突变会使人体在摄入乙醇后细胞中线粒体内乙醛浓度异常升高, 会对线粒体的正常机能产生影响, 这可能会诱发肝癌等疾病。上世纪九十年代开始, Yamamoto 等人(1992)^[5]、Boonyaphiphat 等人(2002)^[6]、Borras 等人(2000)^[7]就相继指出 ALDH2 基因杂合突变与食管癌、酒精性肝病等多种生理疾病有强的正相关性。因此, 从健康角度考虑, 喝酒“脸红”并非是人们认为的“酒量好”的象征; 为了“锻炼酒量”而“硬喝酒”会对身体带来很大的代谢负荷。

^[1] Goedde, H. W., et al. (1992), Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations, Human Genetics (88): p344-346

^[2] Brooks, P. J., et al. (2009), The Alcohol Flushing Response: An Unrecognized Risk Factor for Esophageal Cancer from Alcohol Consumption, PLOS Medicine (6)

^[3] Mimy, Y. E., Susan, E. L., & Tamara, L. W., (2007), Prevalence of ALDH2, ADH1B, and ADH1C Genotypes in Asian Populations, Alcohol Research & Health (30)

^[4] Ye, et al. (2019), Relationship between Blood Acetaldehyde Concentration and Psychomotor Function of Individuals with Different ALDH2 Genotypes after Alcohol Consumption, Journal of Forensic Medicine(35)

^[5] Yamamoto, K., Ueno, Y., Mizoi, Y., et al. (1993), Genetic polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase and the effects on alcohol metabolism, Arukoro Kenkyuto Yakubutsu Izon(28)

^[6] Boonyaphiphat, P., et al. (2002), Life style habits and genetics susceptibility and the risk of esophagal cancer in the Thai population, Cancer Lett (2)

^[7] Borras, E., et al. (2000), Genetic Polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase in Europeans, Hepatology (31)

(二) TAS2R38 基因与苦味味觉敏感(Taster):

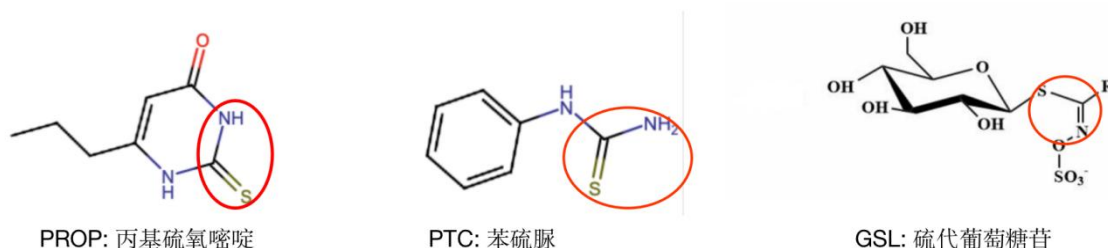
在人体中, TAS2R 家族由 25 个对苦味敏感的 GPCR 受体组成; 并且通常情况下不同种的 TAS2R 会同时在单个味觉感受细胞中表达, 因此可以认为这些受体共同作用构成一个广谱的“苦味感受器”(bitter sensor) (Wooding, 2021)^[1]。

TAS2R38 是 TAS2R 家族中的一员, 编码基因在人体中位于七号染色体上。TAS2R38 基因也具有多态性, 外显子序列中第 145、785、886 的突变(145 位: C 突变为 G, 785 位: C 突变为 T, 886 位: G 突变为 A) 可以是原本对特定苦味敏感性状(Taster)变为对该苦味不敏感(Non-Taster), 对应氨基酸分别为从 Pro、Ala、Val 突变为 Ala、Val、Ile (PAV 变为 AVI)^[2]。目前, 在世界范围广为分布的类别是苦味敏感的 PAV 和苦味不敏感的 AVI, 中间型(如 AAI, AAV 等)比例却较小。

从组图十二中的数据统计中可以看出, TAS2R38 外显子序列中第 785、886 号位点的突变有明显的连锁特性, 这可能是因为染色体上相应基因片段相近从而难以发生交叉互换。第 785 位 CC、CT、TT 基因型分别对应第 886 位 GG、AG、AA 基因型(频率分别是 48.33%, 41.67%, 10.00%), 由此推断应该是野生型的 C 与 G 连锁(C-G lock)和突变型的 T 与 A 连锁(T-A lock), 其中 C-G 频率应为 69.17%, T-A 频率位 30.83%。可见, 对于实验参与者这样小范围的样本数据而言, 就已经表现出趋向 PAV、AVI 而远离 AAI、AAV 等中间型的特征。

在上世纪五十年代左右就相继有学者指出, PTC 和 PTC 类似物(组图十三)中的 $N-C=S$ 的局部官能团可能在它们的苦味产生中有重要作用(Sun, 2001)^[3]。甘蓝、花椰菜等原产自欧洲地中海地区的蔬菜中含有 GSL 等 PTC 类似物, 并且许多蛋白质中也含有 $N-C=S$ 原子链的结构; 考虑到欧洲人群长期以来面对食物中“充满苦味”的 $N-C=S$ 基团, 很有可能欧洲人群会上调对这种特定的苦味(PTC - analog)的容忍度(tolerance)。事实上, 正如 Davide 等人(2016)所指出, 欧洲 AVI(对应 Non-Taster)的比例是几大洲中最高的。

此外, 组图十二中 C-G lock 频率 69.17%、T-A lock 频率 30.83%和组图十三中亚洲 PAV 频率 64.51%、AVI 频率 35.31%吻合的也比较好。



Population	PAV	AVI	AAV	AVV	PAI	PVI	AAI	PVV
All	50.76%	42.70%	2.48%	0.32%	0.18%	0.07%	3.39%	0.10%
Africans	50.76%	35.18%	0.61%	0.08%	0.00%	0.15%	13.22%	0.00%
Asians	64.51%	35.31%	0.00%	0.17%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Europeans	45.66%	49.22%	3.56%	0.49%	0.32%	0.03%	0.55%	0.17%
Americans	68.61%	26.69%	2.26%	0.00%	0.00%	0.19%	2.26%	0.00%

(组图十三: 上: PTC 与其类似物; 下: 世界范围内 TAS2R38 单倍型的分布^[4])

^[1] Wooding, S. P., Ramirez, V. A., & Behrens, M. (2021). Bitter taste receptors: Genes, evolution and health. *Evolution, Medicine, and Public Health* (9)

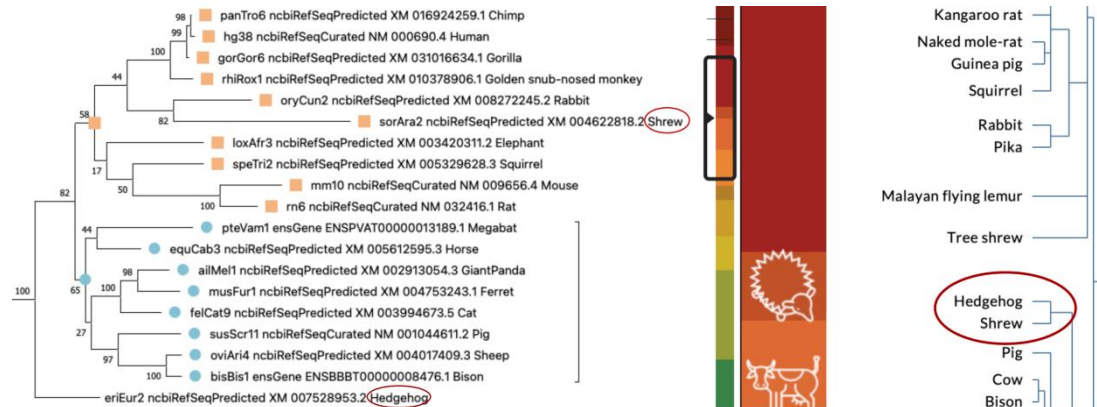
^[2] Kim, U., Jorgenson, E., et al. (2003). Positional Cloning of the Human Quantitative Trait Locus Underlying Taste Sensitivity to Phenylthiocarbamide, *Science*(299)

^[3] Sun-Wei Guo, Danielle R. Reed, (2001), The genetics of phenylthiocarbamide perception, *Annals of Human Biology*, 28(2): 111-142

^[4] Davide, S. R., et al. (2016), Global diversity in the TAS2R38 bitter taste receptor: revisiting a classic

(三) ALDH2、TAS2R38 系统发生树的讨论:

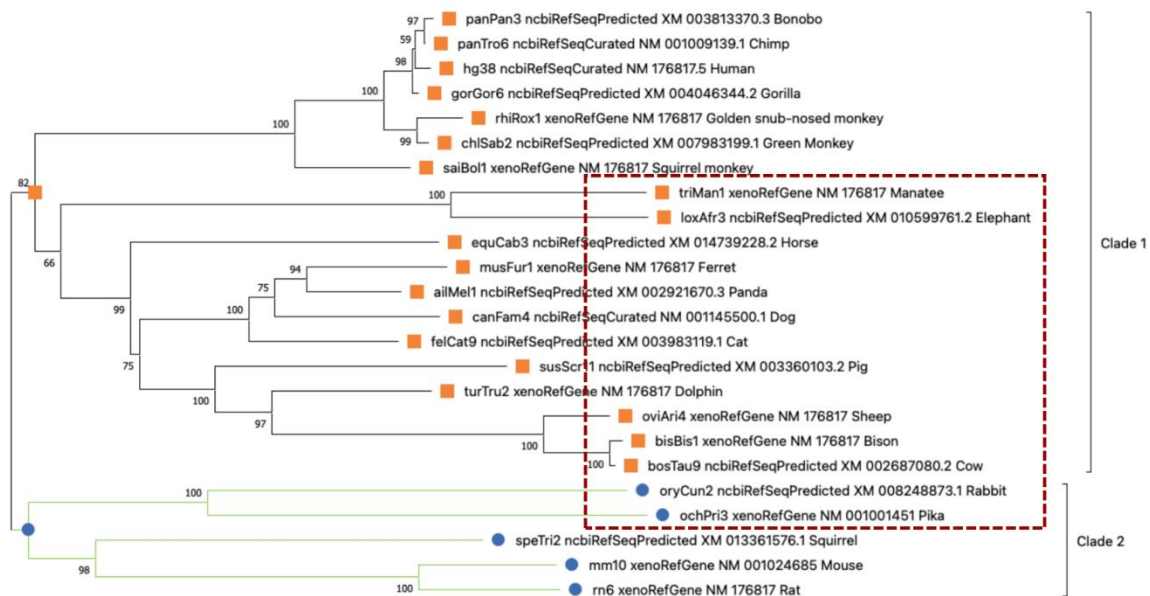
组图十四中展示了图十_1 中利用最大似然法建立的 ALDH2 系统发生树的一枝, 以及 UCSC 数据库给出的系统发生树的片段:



(组图十四: 左: Maximum Likelihood-ALDH2 系统发生树一枝, 右: UCSC 数据库系统发生树^[1])

可以很明显的看出, 在利用 ALDH2 所建立的系统发生树中, 刺猬(Hedgehog)子枝与鼯鼠(Shrew)子枝很早就相互分离了, 而在 UCSC 数据库中给出两者在系统发生树中的拓扑结构相靠近, 这说明两者在进化过程中 ALDH2 的基因出现了很大差异。个人猜测, 这可能和刺猬食谱中包含灌木或掉落在地面上的浆果有关, 因为成熟的浆果发酵后会产生酒精。

图十一, 在三种利用 TAS2R38 同源序列建立的系统发生树中, 可以发现植食性动物如象(Elephant)、海牛(Manatee)、兔(Rabbit)、绵羊(Sheep)等所在子枝在系统树上“突伸”出去(如图十五所示, 以 Maximum Likelihood-TAS2R38 树为例), 但是这种“突伸”在以 ALDH2 同源序列所建立的系统发生树中却不明显。



(图十五: 植食性动物在 TAS2R38 系统发生树上的明显“突伸”)

类似上图, 在 TAS2R38 系统发生树上有“突伸”但是在相应 ALDH2 系统发生树上却没有, 说明这些植食性动物在进化历程中 TAS2R38 基因和其邻近的非植食性动物之间差别较大(相比其它基因)。

个人猜测, 这可能是植物和相应植食性动物共同进化的结果。一开始, 植食性动物对苦

味敏感程度高，因此在进食过程中会避开味道苦涩的植株；同时，植物为了保护自己不被植食性动物捕食，也可能产生一些具有苦味的次级代谢产物。如此以来，植物中具有苦味的次级代谢产物浓度普遍上升，植食性动物为了适应这种“口感变化”也会下调自己对苦味的敏感程度，从而保证自己正常的进食过程不受影响。

许多动物(包括人类)有对食物中的苦味有拒绝行为(rejection)，通常人们认为这种拒绝行为是可以帮助动物避免误事对自身有毒的物质，是一种进化上的适应性行为^[1]。然而，对于植食性动物而言，很多可食用的植物都是具有苦味的，因此 Jacobs(1978)^[2]就提出对苦味的耐受力太低可能反而不利于植食性动物对环境适应性的提高；并且依据 Kristin 等人(2010)的实验，在豚鼠(guinea pig)等植食性动物中存在对苦味“感觉迟缓”的现象^[3]。

此外，个人认为如果植食性动物的苦味味觉(TAS2R 家族，或者其它未发现的苦味受体)下调有利于进化过程中适应性的增加，那么这种下调的过程将会是漫长的。在图十五中可以看到，属于食肉目但却主要以竹子为食的熊猫(Panda)在以 TAS2R38 同源序列构建的系统发生树中的位置较为正常(和 UCSC 数据库给出的系统发生树相比)。熊猫在至少七百万年前开始以竹子为食，在两百万年前左右完成主要饮食结构的转变^[4]；但是，至少在 TAS2R38 基因的层面，如此长时间的取食竹子似乎并没有使熊猫的苦味味觉相关基因在演化速率上产生类似其它植食性动物那样明显的区别。可见类似图十五中所标注的植食性动物在 TAS2R38 基因上产生如此明显的差别演化很可能是非常长期的过程。

Lei 等人(2018)利用系统发生学的方法，指出熊猫(Giant Panda, Red Panda)的 TAS2R 家族基因与其近邻的肉食性动物相比出现了不同程度的差异性^[5]，这也进一步说明苦味植物对以其为食的动物在“苦味敏感”这一性状演化上的影响是复杂的。

六. 致谢:

感谢北京大学罗述金课题组，是他们为我们设计安排了如此精巧有趣的实验课程；感谢北京大学罗述金老师，是她向我们教授了系统发生学的基础知识，让我们感受到系统发生学独特的学科魅力；感谢罗述金课题组的睢峥岩学长，是他一步步引导我们进行湿实验和干实验的探索，也是他平时不辞辛苦地为我们答疑解惑；感谢北京大学整合科学项目的老师，是他们为我们提供了这次零距离接触前沿科学课题组的宝贵机会。

^[1] Bachmanov, A. A., & Beauchamp, G. K. (2007). Taste Receptor Genes. *Annual Review of Nutrition*(27)

^[2] Jacobs, W. W. (1978). Taste responses in wild and domestic guinea pigs. *Physiology & Behavior* (20)

^[3] Kristin, L. F., et al. (2010), Bitter Avoidance in Guinea Pigs (*Cavia porcellus*) and Mice (*Mus musculus* and *Peromyscus leucopus*), *Journal of Comparative Psychology* (124)

^[4] Jin, C., Ciochon, R. L., et al.(2007), The first skull of the earliest giant panda. *Proc Natl Acad Sci* (104).

^[5] Lei, et al. (2018), Lineage-specific evolution of bitter taste receptor genes in the giant and red pandas implies dietary adaptation, *Integrative Zoology* (13)

参考文献:

- Bachmanov, A. A., & Beauchamp, G. K. (2007). Taste Receptor Genes. *Annual Review of Nutrition*(27)
- Boonyaphiphat, P., et al. (2002), Life style habits and genetics susceptibility and the risk of esophageal cancer in the Thai population, *Cancer Lett* (2)
- Borras, E., et al. (2000), Genetic Polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase in Europeans, *Hepatology* (31)
- Brooks, P. J., et al. (2009), The Alcohol Flushing Response: An Unrecognized Risk Factor for Esophageal Cancer from Alcohol Consumption, *PLOS Medicine* (6)
- Davide, S. R., et al. (2016), Global diversity in the TAS2R38 bitter taste receptor: revisiting a classic evolutionary PROPosal, *Science*, 225(6)
- Doolittle, F. W., (1998), You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes, *Trends in Genetics* (14)
- Goedde, H. W., et al. (1992), Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations, *Human Genetics* (88)
- Jacobs, W. W. (1978). Taste responses in wild and domestic guinea pigs. *Physiology & Behavior* (20)
- Jin, C., Ciochon, R. L., et al.(2007), The first skull of the earliest giant panda. *Proc Natl Acad Sci* (104)
- Kim, U., Jorgenson, E., et al. (2003). Positional Cloning of the Human Quantitative Trait Locus Underlying Taste Sensitivity to Phenylthiocarbamide, *Science*(299)
- Koetsier, G., Cantor, E., et al. (2020). A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. NEB
- Kristin, L. F., et al. (2010), Bitter Avoidance in Guinea Pigs (*Cavia porcellus*) and Mice (*Mus musculus* and *Peromyscus leucopus*), *Journal of Comparative Psychology*(124)
- Lei, et al. (2018), Lineage-specific evolution of bitter taste receptor genes in the giant and red pandas implies dietary adaptation, *Integrative Zoology* (13)
- Loughrey, S., Matlock, B. (2021). Detection of Protein in Nucleic Acid Samples Using the NanoDrop One Spectrophotometer. Thermo scientific
- Mimy, Y. E., Susan, E. L., & Tamara, L. W., (2007), Prevalence of ALDH2, ADH1B, and ADH1C Genotypes in Asian Populations, *Alcohol Research & Health* (30)
- Sun-Wei Guo, Danielle R. Reed, (2001), The genetics of phenylthiocarbamide perception, *Annals of Human Biology*, 28(2)
- Tucker, A. (1995), *Applied Combinatorics*. Wiley, New York: p.1

Ye, et al. (2019), Relationship between Blood Acetaldehyde Concentration and Psychomotor Function of Individuals with Different ALDH2 Genotypes after Alcohol Consumption, Journal of Forensic Medicine(35)

Yamamoto, K., Ueno, Y., Mizoi, Y., et al. (1993), Genetic polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase and the effects on alcohol metabolism, Arukoro Kenkyuto Yakubutsu Izon(28)

Wooding, S. P., Ramirez, V. A., & Behrens, M. (2021). Bitter taste receptors: Genes, evolution and health. Evolution, Medicine, and Public Health (9)