

肝豆状核变性病基因突变分析^①

徐评议 梁秀龄 马少春

(中山医科大学附属第一医院神经内科; 广州, 510080)

摘要 目的: 寻找中国人肝豆状核变性病(WD)基因突变的形式及频率。方法: 应用 PCR-SSCP 法对 45 名 WD 患者进行基因 exon 5、8、14、18 筛选, 对确定异常者进行 DNA 序列分析。结果: 在 45 名患者 DNA 样本的 PCR 扩增产物中未发现 exon 18 泳动异常, 而 3 名患者显示 exon 14 多态性泳动异常, 但这种泳动也可见于正常标本中。4 例患者显示 exon 5 单链构象多态性, 序列分析表明为 T 插入突变, 其突变频率为 8.89%; 2 例存在 exon 8 泳动异常, 序列分析表明该外显子同时存在 770codon C₂₂₅₀→G 同义突变和 G₂₂₇₃→T Arg778→Leu 错义突变, 其突变频率为 4.44%。结论: 不同功能区域的 exon 5 及 exon 8 外显子突变可能是中国人 WD 发病的原因。

关键词 肝豆状核变性/遗传学; DNA 突变分析

中图分类号 R 742.4

Analysis of Gene Mutation of Wilson Disease

Xu Pingyi Liang Xiuling Ma Shaochun

(Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Abstract Objective: To investigate the style and frequency of gene mutation in Chinese patients suffering from Wilson disease(WD). **Method:** PCR-SSCP was used to screen in exon 5, 8, 14, 18 of WD gene for 45 Wilson disease patients and DNA sequence was analyzed to abnormal gene bands identified by polyacrylamid gel electrophoresis. **Results:** In 45 PCR products of WD DNA samples, no mobility change with exon 18 was found in single strand conformation polymorphism analysis, but 3 mobility change with exon 14 was detected, but this mobility change was also detected in PCR-SSCP analysis of normal DNA samples and also 4 mobility shift was detected in exon 5. There is a new T insertion in exon 5 by DNA sequence analysis. The mutation frequency is 8.89%, and we also detected 2 mobility shift in exon 8, and affirmed that there is a same sense mutation C₂₂₅₀→G on 770 codon with a missense mutation G₂₂₇₃→T on Arg778→Leu together in the exon, the mutation frequency is 4.44%. **Conclusion:** These findings indicated that the mutation of exon 5 and exon 8 in different functional areas of Wilson disease gene may be the cause of the disease in Chinese people.

Subject headings hepatolenticular degeneration/genetics; DNA mutational analysis

近年来国内外学者相继开展肝豆状核变性病(Wilson disease, WD)的分子生物学研究。WD 基因已定位和克隆^[1-5], 其基因表达产物为一种与铜离子转运有关的 ATP 酶(ATP7B)。迄今为止, 国外学者已报道 WD 基因至少存在 95 种突变^[6], 形式多为单碱基置换、插入或几个碱基丢失, 其中欧洲人基因突变的特点为 exon 14 和 exon 18, 发生错义突

变的频率分别高达 28% 和 10%, 而国内关于中国人 WD 基因突变的正式文献尚未见报道。本文报告采用聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)、聚合酶链反应-DNA(PCR-DNA)直接测序法对 45 个 WD 患者基因进行 exon 5、8、14、18 突变分析的结果。

1 材料与方 法

1.1 DNA 标本收集

收集 15 例无亲缘关系正常个体和 45 例来自全国各地已确诊的 WD 患者外周抗凝全血 5 mL, 经酚-氯仿抽提法提取白细胞 DNA。正常个体标本由中山医科大学附属第一医院血库提供。WD 患者经本科确诊, 具有典型锥体外系症状和体征, 角膜 K-F 环阳性以及血清铜蓝蛋白水平低下, 24 h 尿铜含量升高等生化特征。

1.2 基因突变筛查的 PCR-SSCP 法

WD 基因 exon5、8、14、18 扩增产物及条件如表 1。25 μ L PCR 反应体系中, 含 1 μ L DNA 样品, 20 pmol 引物, 1 \times PCR 缓冲液, 0.2 mmol dNTP, 1U *Taq* 酶(PE 公司); 97 $^{\circ}$ C 变性 10 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 循环 35 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 扩增产物经 10 g/L 普通琼脂糖电泳鉴定后, 按文献^[7]方法稍作改良进行 SSCP 分析。PCR 产物 8 μ L 加 8 μ L 甲酰胺变性剂(950 g/L 去离子甲酰胺, 3 g/L 溴酚蓝, 3 g/L 二甲氰醇), 97 $^{\circ}$ C 变性 5 min, -20 $^{\circ}$ C 立即冷却, 上样 60 g/L 或 80 g/L 的聚丙烯酰胺凝胶中, 以 0.5 \times TBE(Tris-硼酸)为电泳缓冲液, 4 $^{\circ}$ C, 200 V 电泳 4~5 h, 取胶后用银染法^[8]观察结果。

表 1 WD 基因 exon 5、8、14、18 扩增产物及条件

Table 1 Primers and conditions for PCR-SSCP analysis in exon 5, 8, 14, 18 of WD gene

Exon	No. primer	Primer sequence (5'-3')	Size of product (n/bp)	Anneal deg-ree (t/ $^{\circ}$ C)
E5	5A	ctgggctgtggattct	233	60
E8	5B	aaaggtgactacaattttaatga	296	58
	8B	aggcagctcttttctgaa c		
E14	14A	tcatctgatttggtcag	301	58
	14B	cagctagagag aagg acat		
E18	18A	acctttgccc aacactagcat	275	59
	18B	tcccagcaccc acagc c		

1.3 PCR 双链模板的直接测序

按参考文献^[9]进行, 25~50 μ L PCR 产物经透析袋法纯化后, 用超纯水溶解后测浓度。将此双链模板与测序引物以 1:20 混合, 按美国 USB 公司的 Sequenase Ver. 2 测序盒说明和北京亚辉生物医学工程公司的 α -³²P dATP (370 GBq/L) 进行标记和延伸反应。以每孔 3.5 μ L 上样于 7 mol/L 尿素的 60 g/L 聚丙烯酰胺变

性凝胶中 1 200 V 电泳 4 h, 放射性自显影 12~24 h。为了清楚显示 DNA 片段的每一个碱基, 序列分析有时重复从两个方向独立进行。所测序列与 GENE BANK 中的 ATP7B 基因序列进行对照分析。

2 结 果

2.1 WD 基因突变的 PCR-SSCP 分析

应用 PCR-SSCP 法分别对各标本的 WD 基因的 exon 5、8、14、18 进行突变筛选, 结果发现 exon 18 出现正常标本的 3 条带, 未显示单链构象多态性, 而 exon 14 在 3 个标本中显示泳动异常, 但也可见于正常对照中, 故考虑为多态性。exon 5 在 4 个标本中出现明显的单链构象多态性, exon 8 则有 2 例出现泳动异常, 这种异常未见于正常对照标本中。

2.2 WD 基因突变的直接测序结果

进一步对筛查出的 SSCP 异常样本(exon 5 和 exon 8)进行测序鉴定。2 次独立进行的实验证实 exon 5 泳动异常样本出现 WD 基因突变为 cDNA 第 1 176 位 T 插入, 导致密码子顺序发生变化, 突变频率为 8.89%, 为一种新的突变(图 1)。而 exon 8 泳动异常样本则出现 770 codon C₂₂₅₀→G 同义突变及 G₂₂₇₃→T 即 Arg₇₇₈→Leu 错义突变, 上述两个突变同时存在, 且突变频率为 4.44%, 其突变形式与台湾学者^[10]及国内学者报道的两种形式相同, 但两种突变在同一标本中同时存在, 且频率较低。



图 1 Exon 5 SSCP 阳性标本 DNA 测序

Fig. 1 Sequence analysis of abnormal band of migration by SSCP in exon 5

A: normal prostate B: abnormal band by SSCP; Arrow: T insertion

3 讨论

迄今为止,国外学者已报道 WD 基因在白种人的突变的热点为 exon 14(28%)和 exon 18(10%),其它外显子突变频率低,其中 exon 5 和 exon 8 突变频率小于 2%^[9]。台湾学者(1996 年)报道台湾地区 WD 患者 exon 8 存在 G₂₂₇₃→T 即 Arg₇₇₈→Leu 突变,频率为 27%。近来国内学者的会议资料也有 exon 8 突变报道,且频率高达 37%(华东 6 省第 10 届神经病学会议资料),其突变形式与国外报道相同。据报道,exon 8 编码 ATP7B 的跨膜功能区,该位点如发生突变,则使细胞膜铜离子转运异常,对 WD 发病具有重要意义。我们的结果显示,exon 14、18 未见明显单链构象多态性,基因突变率小,不是中国人 WD 基因突变热点,而 exon 8 在研究中仅 2 例 SSCP 泳动异常,虽然基因突变形式与国内外报道一致,但值得注意的是,2 例 WD 患者 exon 8 同时出现 C₂₂₅₀→G 同义突变和 G₂₂₇₃→T 错义突变,是其新的特点,需进一步对更多的病例进行筛查并探讨这种突变发生的机制。我们的结果显示 exon 8 突变频率低,仅 4.44%,与国外报道相接近,而与国内及台湾学者结果有较大差异,需要进一步筛查。本研究中,我们在 45 个 WD 患者中,发现 4 例标本存在 exon 5 SSCP 泳动异常,序列分析显示为 1176 位 T 插入引起移码突变,频率为 8.89%,与国外报道的 exon 5 仅 2 例发生 1711-1 G→C 置换突变形式明显不同^[9],是一种新的突变形式,提示中国人 WD 基因的突变形式及热点可能与白种人存在差异。exon 5 主要编码 WD 基因第 6 铜离子(Cu₆)结合区氨基酸序列,而 Cu₆ 对铜离子结合起重要作用,故 exon 5 突变影响 Cu₆ 功能,可能是 WD 发病的一种原因。总之,结合国内外和本研究关于中国人 WD 基因突变研究热点的结果,仍不能完全解释中国人

WD 的分子发病机制,有关中国人 WD 基因热区的筛选工作,仍需作进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Frydman F, Bonne-Famir B, Farer L A. Assignment of the gene for Wilson disease to chromosome 13: linkage to esterase D locus. *Proc Natl Sci USA*, 1985, 82(2): 181
- 2 Bowcock A M, Farer L A, Hebert J M. Eight closely linked loci place the Wilson's diseases locus with 13q 14. 21. *Am J Hum Genet*, 1988, 43(2): 64
- 3 Bull P C, Gordon R, Cox D W. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genet*, 1993, 64(3): 13
- 4 Stewart E A, White A, Bowcock A M, *et al*. Polymorphic microsatellites and Wilson disease(WD). *Am J Hum Genet*, 1993, 53(1): 864
- 5 Tanzi R E, Pertukhin K, Chemov L, *et al*. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nature Genet*, 1993, 5(4): 344
- 6 Gordon R T, John R F, Cox D W, *et al*. The Wilson disease gene: Spectrum of mutations and their consequences. *Nature Genet*, 1995, 9(2): 210
- 7 Kenshi H, Saiki R, Gelfand D H. PCR-SSCP: A method for detection of mutations. *GATA*, 1992, 9(3): 73
- 8 Shireley E B, Michael D, Ulickie K, *et al*. Detecting high-resolution polymorphism in human coding loci by combining PCR and single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. *Am J Hum Genet*, 1991, 48(1): 106
- 9 Reische U. A rapid protocol for DNA extraction and primer annealing for PCR sequencing. *Biotech*, 1994, 17(5): 842
- 10 Chuang L M, Wu H P, Jang M H. High frequency of two mutation in codon 778 in exon 8 of the ATP7B gene in Taiwanese families with Wilson disease. *J Med Genet*, 1996, 33(4): 521

(1998-04-15 收稿 1998-12-23 修回)

· 简 讯 ·

黎家灿教授主编《中国恙螨》荣获中国图书奖

由中山医科大学寄生虫学教研室黎家灿教授主编的《中国恙螨》荣获第十届中国图书奖,这是国家图书最高奖。

《中国恙螨》是中国科学工作者对恙虫病媒介和病原体研究积累的材料编成的中国第一本介绍恙螨的专著,该书是由广东省优秀科技专著出版基金资助出版的。书中详细介绍恙螨区系、形态分类、生活史、生态、培养与传代、流行、传病、防灭研究;恙螨和宿主体内恙虫病立克次体分离和检测新技术和分子生物学技术的应用。每种有附图,每属有检索表可供恙螨分类鉴定用。

(冯世容)