

中国人 $D_{13}S_{31}$ 位点多态性及与肝豆状核变性的连锁关系^①

徐评议^② 梁秀龄 刘焯霖 潘锡榜

(中山医科大学神经病学教研室; 广州, 510080)

提 要 $D_{13}S_{31}$ 标记位于 $D_{13}q^{14.3}$, 其 $TaqI$ 内切酶切点的等位片段在中国人群中与白种人相同, 且等位片段频率差异不明显。通过对 75 名中国人正常个体分析, 该标记的多态性等位片段频率结果如下: 4.6kb 片段的频率为 54%、6.7kb 片段的频率为 46%、4.6kb/6.7kb 杂合子频率为 53%。通过对 12 个肝豆状核变性家系连锁分析, 我们证实 $D_{13}S_{31}$ 标记位点与肝豆状核变性基因位点存在紧密连锁关系 ($\theta=0.00$, $Lod\ Score=5.19$)。在 12 个肝豆状核变性家系 44 名同胞中, 检出 4 名症状前患者, 14 名杂合子及 3 名正常纯合子。其结果表明, $D_{13}S_{31}/TaqI$ 可用于肝豆状核变性的症状前诊断和杂合子检测。

主题词 肝豆状核变性; 基因; 连锁(遗传学)

中图分类号 R742.4

Wilson 氏病(WD)也称肝豆状核变性(Hepatolenticular Degeneration, HLD), 是一种常染色体隐性遗传病。据估计, 该病的世界发病率为 0.5/10 万~1/10 万, 基因频率为 0.56%。该病在我国神经遗传病中比较常见(李洵华, 全国第四届神经遗传病会议资料报道)。该病以铜代谢障碍为特征, 金属铜沉积于肝、大脑基底节、肾及角膜, 从而引起相应的临床症状。其诊断主要依据临床症状、体征及铜生化检测, 如血清铜蓝蛋白、血清铜水平及 24 小时尿铜含量。但目前利用铜生化检测, 其结果在正常人、杂合子及患病纯合子之间有重叠, 无法准确地检出杂合子, 其症状前诊断或早期诊断也存在困难。故近年来国内外学者利用分子生物学技术, 对 WD 基因进行连锁分析, 以建立有效的早期诊断及杂合子检测方法, 并取得较大成果。目前该病致病基因精确定位于 $D_{13}q^{14.3}$, 在此区域已分离获得 20 余种与 WD 基因紧密连锁的 DNA 标记探针, 且认为 $D_{13}S_{31}$ 位点与 WD 基因位点的遗传距离最近, 故本文选用 $D_{13}S_{31}$ 标记分析中国人此位点的等位片段频率及与 WD

基因在 12 个 WD 家系中的连锁关系, 并讨论其意义和作用。

1 材料和方法

1.1 群体 DNA 标本

抽取无亲缘关系正常个体 75 例外周抗凝全血 40ml, 加双蒸水 30ml 摇匀 5min, 3 500r/min 离心 10min, 弃上清, 加生理盐水 40ml 摇匀 3 500r/min 离心 10min 2 次, 弃上清液后于 5ml STE (15mmol/L)、80 μ l 蛋白酶 K(10mg/ml)和 0.5ml 10% SDS 反应体系中 42 $^{\circ}$ C 消化过夜。经酚、氯仿抽提, 无水酒精沉淀后 TE 溶解基因组 DNA, $TaqI$ 酶切 5~10 μ g 基因组 DNA 并经 Southern blot 转移至硝酸纤维膜上。

1.2 WD 家系 DNA 标本

WD 患者经中山医科大学附属第一医院神经科确诊, 具有典型的症状和体征, 角膜 K-F 环阳性以及血清铜蓝蛋白和血清铜水平低下, 24 小时尿铜含量增高等生化特征。家系组包括患者父母及同胞兄妹。DNA 抽提方法同上。

① 本课题由国家教委博士点基金资助

② 第一作者, 1964 年出生, 男, 博士, 讲师

1.3 限制性片段长度多态性(RFLP)连锁分析

$D_{13}S_{31}$ 位点探针菌种 PCR1324 (质粒 puc8) 由美国 ATCC 公司提供。所需生物试剂 Taq_{1} 、 $EcoR_{1}$ 、随机引物标记盒由美国 Promega 公司提供。通过随机引物标记法以 $50\mu\text{Ci}$ (微居里) $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-CTP}$ 标记 25ng DNA 探针。放射比活度为 $6.12 \times 10^8 \text{cpm/ng}$ ，经 Sephadex-50 过柱后与基因组 DNA 膜 42°C 杂交 12~16h, $2 \times \text{SSC} - 0.5\% \text{SDS}$ 洗膜压 X 线底片经放射性自显影阅读带型。

1.4 统计学处理

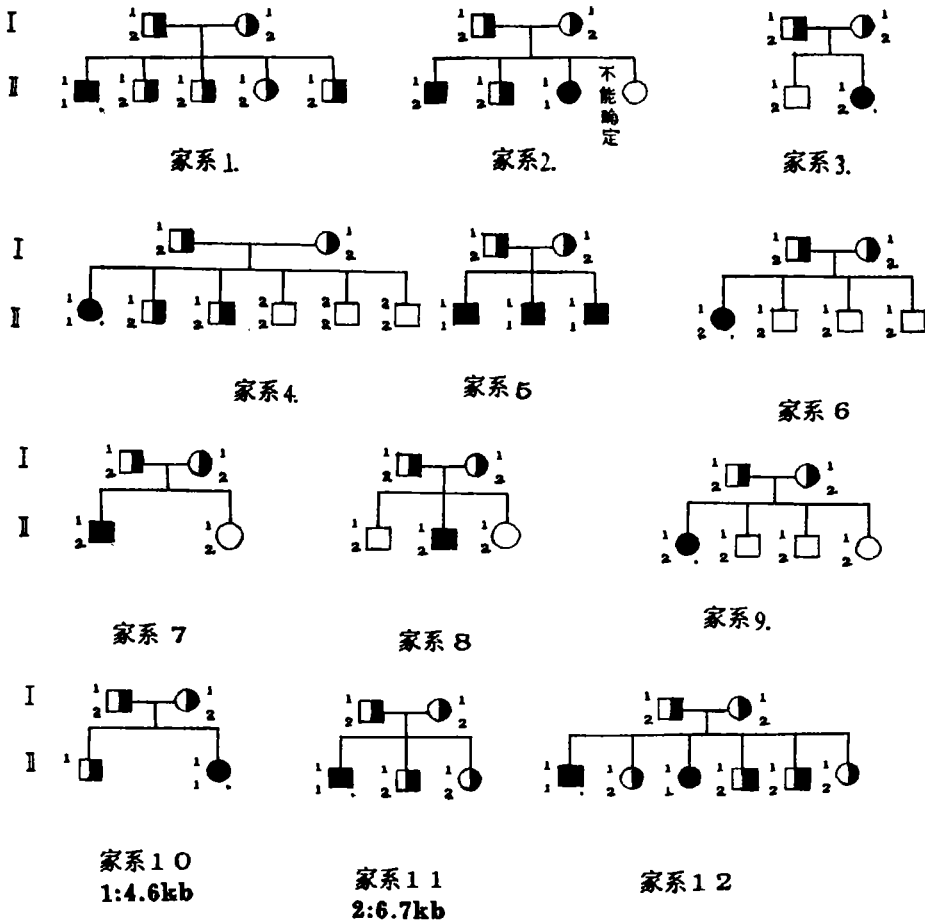
Lods 值计算。Lod Scores 值(Z)和 θ 值

计算根据 Emerg. EA 提供的方法计算并假设 $\theta_m = \theta_f$ 。

2 结果

2.1 $D_{13}S_{31}/Taq_{1}$ 在中国人群中的多态性

用 Taq_{1} 酶切人类基因组 DNA, $D_{13}S_{31}$ 位点 PCR1324 探针杂交后出现 2 条等位片段。片段长度分别为 6.7kb 和 4.6kb。我们检测了 150 条无亲缘关系个体的染色体, 结果显示: 6.7kb 等位片段的频率为 46%, 4.6kb 片段的频率为 54%, 杂合子频率为 53%, 信息含量值较高, 提示此位点可作为有用的连锁分析标记(见表 1)。



附图 12 个肝豆状核变性家系结构图

表1 D₁₃S₃₁等位片段及频率

探 针	位 点	内切酶	基因片段	基因频率	染色体数目	杂合率
PCR1324	D ₁₃ S ₃₁	TaqI	1:4.6kb	54%	81	53%
			2:6.7kb	46%	69	

2.2 WD 家系 RFLP 连锁分析

分析 12 个 WD 家系(见附图)D₁₃S₃₁ 位点的多态性及与 WD 基因位点的传递规律,发现 D₁₃S₃₁ 等位片段 6.7kb 和 4.6kb 片段相

分离,其传递规律符合孟德尔规则,经配对连锁分析,二位点之间的 θ 为 0.00, Lods 值(Z) 为 5.19,提示存在紧密连锁关系。Lods 值计算见表 2。

表2 D₁₃S₃₁位点 Lods 值计算结果($\theta_t = \theta_m$)

家系	abcd	子代基因型					
		0.00	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
I 4:1		0.500	0.409	0.324	0.179	0.077	0.018
		0.183	0.139	0.104	0.05	0.023	0.006
II 1:2		0.727	0.625	0.523	0.327	0.158	0.042
		-0.062	-0.047	-0.035	-0.017	-0.007	-0.002
III 1:1		0.016	0.012	0.009	0.005	0.002	0.000
		-0.058	-0.045	-0.034	-0.017	-0.007	-0.002
IV 4:1		0.500	0.409	0.324	0.179	0.077	0.018
		0.183	0.139	0.104	0.055	0.023	0.006
V 0:3		1.204	1.074	0.931	0.636	0.341	0.098
		-0.040	-0.029	0.021	0.010	0.004	0.001
VI 4:0		0.100	0.076	0.057	0.028	0.011	0.003
		0.136	0.103	0.076	0.038	0.016	0.004
VII 2:0		0.016	0.012	0.009	0.005	0.002	0.000
		-0.058	-0.045	-0.034	-0.017	-0.007	-0.002
VIII 3:0		0.049	0.037	0.028	0.014	0.005	0.001
		0.063	0.044	0.030	0.013	0.005	0.001
IX 4:0		0.100	0.076	0.057	0.028	0.011	0.003
		0.136	0.103	0.076	0.078	0.016	0.004
X 1:1		0.125	0.098	0.075	0.039	0.016	0.004
		-0.058	-0.045	-0.034	-0.017	-0.007	-0.005
XI 2:1		0.250	0.199	0.154	0.082	0.075	0.008
		0.063	0.044	0.030	0.013	0.005	0.001
XII 3:2		0.977	0.846	0.713	0.452	0.221	0.058
		0.058	0.045	0.38	0.016	0.006	0.001
合计 Lods 值(Z)		5.19	4.334	3.741	2.186	1.021	0.269

注:a、b、c、d 为家系子代基因型

在 12 个 WD 家系 68 名成员中,通过连锁分析,在 44 名同胞兄妹中,获得连锁分析信息者共 21 名,占 47.73%。其中肯定为 WD 杂合子者为 14 名,占 31.8%,正常纯合子 3 名(家系 4 的 I₄、I₅、I₆)。获得症状前诊断者 4 名,其基因型皆为 4.6kb 纯合子,与其先证者基因型相同(家系 5 的 I₂、I₃,家系 2 的 I₃及家系 12 的 I₃)。通过临床体检及铜生化检测,均显示轻度锥体外系症状及血清铜低下(正常值为 13.07~19.61 μ mol/L),血清铜蓝蛋白水平低下(正常值为 21.1~4.5 μ g/dL)及 24 小时尿铜含量升高(正常值 9.8~37.6 μ g/24h),另外,无法获得连锁分析信息而不能确定者 15 名,因技术原因不能确定者 1 名,占 36.3%。

3 讨论

3.1 中国人 D₁₃S₃₁位点 DNA 多态性

75 例无亲缘关系个体基因组 DNA 经 D₁₃S₃₁/TaqI 分析表明,TaqI 酶切位点多态性在所检中国人群中存在,等位片段大小与白种人相同,频率相近。提示这些 RFLP 可能来自共同的祖先。其杂合率大于 50%,有助于对肝豆状核变性病进行遗传咨询。

3.2 肝豆状核变性家系连锁分析

自 1985 年 Frydman^[1]报告 WD 基因与红细胞酯酶 D (ESD)基因连锁并将其定位于 D₁₃q^{14~21}以来,有关 WD 分子生物学的文献日趋增多。Farrer(1988 年)^[2]、Yuebasziyan-Gurkan(1991 年)^[3]、Figus(1989 年)^[4]、Bowcock(1987 年,1988 年)^[5-6]等相继发表文献支持这一发现并证实 D₁₃S₂₆、D₁₃S₁₀、D₁₃S₅₉、D₁₃S₃₁、RB₁ 等位点与 WD 基因存在紧密连锁关系。Farrer^[7]推测 D₁₃S₃₁位点位于 D₁₃q^{14.3},与 WD 基因位点的遗传距离为 0.4cM(Centi morgans),适于作 WD 的连锁标记。Stewart^[8]等构建了 D₁₃q^{14.3}区域精细遗传图谱,从图谱中可以发现 D₁₃S₃₁位点与 WD 基因位点的遗传距离仅为 0.3cM。我们的结果显示 D₁₃S₃₁位点与 WD 基因位点存在

紧密连锁关系($\theta=0.00, Z=5.19$),与 Stewart 报告相一致,且比 RB₁ 基因位点与中国人 WD 基因的遗传距离为 5.0cM(资料待发表)更接近 WD 基因,提示应用 D₁₃S₃₁位点对 WD 家系进行连锁分析,可以获得更多的遗传诊断信息,也为进一步在中国人群中克隆 WD 基因提供了依据。根据连锁分析的结果,家系 5 的同胞 I₂、I₃同为 WD 症状前患者的可能性为 94.1%。但由于 D₁₃S₃₁位点仍与 WD 基因位点存在 3%的重组率,故在家系 3、6、7、8、9 等 5 个 WD 家系中无法获得遗传诊断信息。当然,不能排除这 5 个 WD 家系中患者系自然突变或受酶切位点的影响。据报道,WD 基因大小约 80kb,由 19 个外显子或内含子组成且以点突变为主^[9]。故应用 RFLP 连锁分析不适为 WD 基因诊断的有效手段。选择两种或两种以上 WD 基因位点附近的侧翼标记对其进行单倍体分析,可以获得更多的遗传诊断信息(资料待发表)。

利用铜生化检测正常人、WD 患者及杂合子,其结果在三者之间重叠,不能准确地区分 WD 症状前患者及杂合子。肝穿刺活检禁忌症较多且病人痛苦不易接受,不宜推广。因此,运用 RFLP 连锁分析对 WD 家系进行基因诊断为之开辟了新的途径。我们的结果表明,应用 D₁₃S₃₁位点对 WD 家系进行症状前诊断及杂合子检出是有效的。

参 考 文 献

- 1 Frydman F, Bonne-Tamir B, Farrer LA. Assignment of the gene for Wilson's disease to Chromosome 13; Linkage to esterase D locus. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 1819
- 2 Farrer LA, Bonne-Tamir B, Frydman F. Predicting genotypes at loci for autosomal recessive disorders using linked genetic markers: application on Wilson's disease. Hum Genet, 1988, 79: 109
- 3 Yuzbasyan-Gurkan V, Brewer GJ, Boewinkle E. Linkage of the Wilson's disease gene to chromosome 13 in North-American pedigrees. Am J

- Hum Genet, 1988, 42 : 825
- 4 Figus A, Lampis R, Devoto M. Carrier detection and early diagnosis of Wilson's disease by restriction fragment length polymorphism analysis. J Med Genet, 1989, 26 : 78
 - 5 Bowcock AM, Farrer LA, Cavalli-Sfoza IL. Mapping the Wilson's disease locus to a cluster of linked polymorphic markers on chromosome 13. Am J Hum Genet, 1987a, 41 : 27
 - 6 Bowcock AM, Farrer LA, Hebert JM. Eight closely linked loci place the Wilson's disease locus within $13q^{14-21}$. Am J Hum Genet, 1988, 43 : 64
 - 7 Farrer LA, Bowcock AM, Hebert JM. Predictive testing for Wilson's disease using tightly linked and flanking DNA markers. Neurology, 1991, 41 : 992
 - 8 Stewart EA, White A, Bowcock AM. Polymorphic microsatellites and Wilson's disease (WD). Am J Hum Genet, 1993, 53 : 864
 - 9 Bull PC, Gordon R, Cox DW. The Wilson's disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. Nature Genet, 1993, 64 : 13
- (1994-03-30 收稿 1994-11-16 修回)

POLYMORPHISMS OF THE $D_{13}S_{31}$ LOCUS IN CHINESE AND ITS APPLICATION TO LINKAGE ANALYSIS OF WILSON'S DISEASE

Xu Pinyi Liang Xiulin Liu Zhuolin Pan Xibang

(Department of Neurology First Affiliated Hospital of Sun

Yat-Sen University of Medical Sciences; Guangzhou, 510080)

The $D_{13}S_{31}$ locus has been mapped to $13q^{14-3}$. The polymorphic alleles detected by Taq1 are the same in Chinese as in Caucasians and its allele frequencies are slightly different. As calculated from 75 unrelated Chinese individuals, the allele frequencies were as follows: 4.6kb (54%), 6.7kb (46%), 4.6kb/6.7kb (53%). Analyzing the segregation of $D_{13}S_{31}$ locus and Wilson's disease locus in 12 families with the disease, we confirmed a tight linkage between $D_{13}S_{31}$ and Wilson's disease locus with a lod score of 5.19, $\theta=0.00$ by two-point linkage analysis. The results of RFLP analysis at this two loci allowed us to define four presymptomatic patients with this disease and fourteen heterozygotes and three normal homozygotes in 44 siblings. We can conclude that the $D_{13}S_{31}$ locus is useful for detection the presymptomatic patients as well as carrier at informative pedigrees of Wilson's disease.

Subject headings hepatolenticular degeneration; gene; linkage(genetics)

纤维连接蛋白和层粘连蛋白对瘤细胞移动性的影响
(正文见第 22 页)

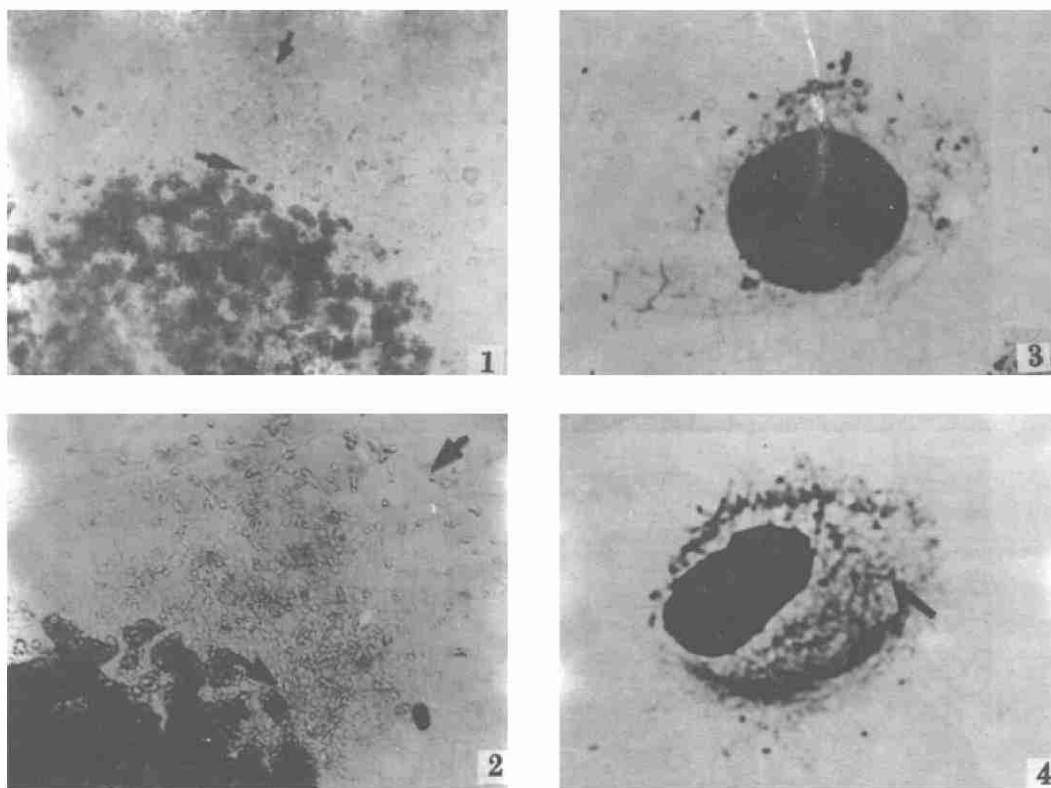


图 1 未加 LN, 肺巨细胞癌的移动距离

培养 72 h $\times 100$

图 2 加入 LN 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 细胞移动距离增加

培养 72 h $\times 100$

图 3 肺巨细胞癌细胞内微丝

Pena 染色法 $\times 400$

图 4 加入 LN 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 细胞内微丝增多明显

Pena 染色法 $\times 400$