

肝豆状核变性基因连锁图谱的研究^①

徐评议^② 梁秀龄 刘焯霖

(中山医科大学附属第一医院神经内科, 广州, 510080)

提 要 为寻找适于中国人 Wilson 氏病(WD)基因连锁分析的遗传标记及制定 WD 基因所在区域的遗传图谱, 我们应用 $D_{13q}^{14\sim 21}$ 区域 4 个 DNA 标记对 75 名无亲缘关系个体及 9 个 WD 家系成员进行连锁分析。结果发现 4 个 DNA 标记中 3 个标记等位片段与白种人相同而杂合率相异, 其中 2 个 DNA 标记 $D_{13}S_{31}$, P123M1.8 与 WD 基因存在紧密连锁关系, 其遗传顺序为: 着丝点-Rb- $D_{13}S_{31}$ -WND。

主题词 肝豆状核变性/遗传学; 限制性片段长度多态性; 染色体图

中图分类号 R 742.4

肝豆状核变性, 又称 Wilson 氏病(WD), 是一种好发于青少年的常染色体隐性遗传病。它的生化特征是铜代谢障碍。因该病的临床诊断存在一定程度不确定性, 而分子生物学技术的发展为 WD 的早期诊断(包括症状前诊断)和杂合子检测提供了可能^[1~4]。

本研究应用 $D_{13q}^{14\sim 21}$ 区域 4 个 DNA 标记(Rb, $D_{13}S_{31}$, $D_{13}S_{39}$ 及 ESD)对 75 名无亲缘关系正常个体及 9 个 WD 家系进行 DNA 分析, 结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 DNA 探针

$D_{13}S_{31}$, $D_{13}S_{39}$, ESDcDNA 菌种探针由美国 ATCC 公司提供。Rb 基因位点 P123 M1.8 菌种探针由美国 Wiggs 博士赠送。

1.2 限制性片段长度多态性分析法

收集 75 例无亲缘关系正常个体及 9 个 WD 家系 54 名成员外周抗凝全血各 10ml, 提取白细胞 DNA, 用适当限制性内切酶酶切基因组 DNA, 再经 Southern 转移至硝酸纤维膜上进行杂交和放射性自显影。

1.3 统计分析

Lods 值及 θ 值计算根据 Lathrop 提供的计算软

件 LINKAGE 计算并假设 $\theta_m = \theta_f$ 。

2 结 果

2.1 4 个 DNA 标记的 DNA 多态性

首次应用 Rb 基因位点 P123M1.8/BamH I 多态性对 75 例无亲缘关系正常个体进行 DNA 多态性分析, 发现 4.4kb, 2.3kb, 2.1kb 3 条等位片段, 其中 2.3kb 与 2.1kb 片段同时出现。其基因频率为 4.4kb (0.473), 2.3kb+2.1kb (0.527), 杂合子 4.4kb/2.3kb+2.1kb 频率为 0.52。

应用 $D_{13}S_{31}$ 标记 PCR1324 探针对中国人基因组 DNA TaqI 切点进行检测, 发现 2 条等位片段 4.6kb 和 6.7kb 与白种人相同, 其等位片段频率 4.6kb 为 0.54, 6.7kb 为 0.46, 杂合子 4.6kb/6.7kb 频率为 0.53, 与白种人相近。

应用 $D_{13}S_{39}$ 位点 PR1~4 探针对中国人基因组 DNA Ban I 切点进行探测, 未获 DNA 多态信息。

应用 ESD 基因 cDNA 片段 P^{ESD14.11} 对中国人基因组 DNA 进行 Apa I 切点分析, 发现 3 条等位片段: 8.8kb (0.90), 7.2kb (0.10), 另外 3.0kb 为恒定片段。等位片段与白种人相同, 但杂合子仅为 0.15 (见表 1)。

① 国家教委博士点基金资助课题;

② 第一作者, 男, 1964 年出生, 博士, 讲师

表 1 D₁₃q^{14.2-3}区域 DNA 标记等位片段及频率分布

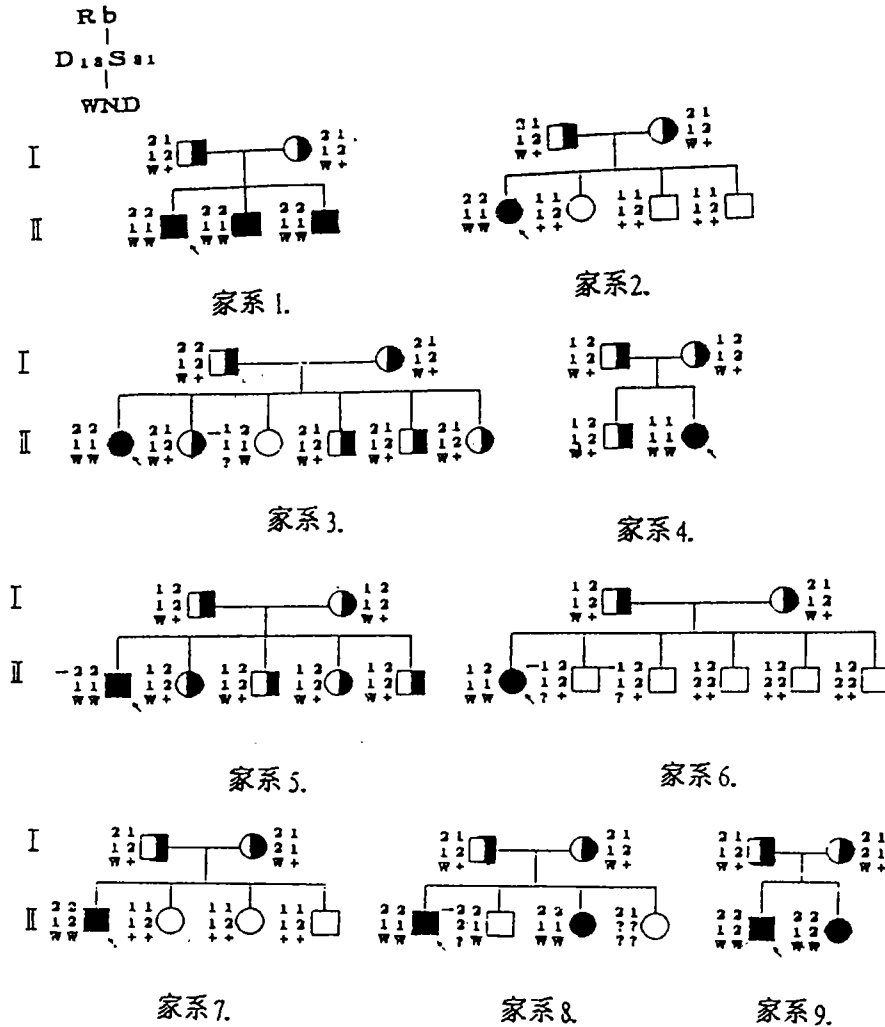
位点	探针/酶	等位片段(kb)	频率	杂合率	国外报道频率及杂合率
Rb	P123M1.8/BamH I	1.2.3+2.1	0.527	0.52	0.70 0.50 Wiggs ^[5]
		2.4.4	0.473		(1988)
D ₁₃ S ₃₁	PCR1324/Taq I	1.4.60	0.540	0.53	0.44 0.52 Bale ^[6]
		2.6.70	0.460		(1991)
ESD	pESD ^{14.11} /Apa I	1.8.8	0.9	0.15	0.8 0.32 Squire ^[8]
		2.7.2	0.1		(1986)

D₁₃S₃₁位点 PR1~4/Ban I 在中国人群中的多态片段分别为 8.6kb, 11.6kb, 15.4kb, 6.9kb, 4.3kb, 1.9kb, 而国外报道 2 条等位片段为 8.5kb(0.44), 4.90kb(0.56)^[7]

2.2 WD 基因定位及 D₁₃q^{14.2-3}遗传图谱的建立

应用 Rb 位点 P123M1.8/BamH I 对 9 个 WD 家系进行连锁分析, 发现等位片段在 WD 家系中相

分离。两位点配对连锁分析表明, Rb 基因 P123M1.8 标记与 WD 基因位点存在紧密连锁关系 ($\theta=0.05, Z=3.846$)。



附图 9 个 WD 家系 Rb₁-D₁₃S₃₁单倍体分析图谱

应用 D₁₃S₃₁ 位点 PCR1324/Taq I 对 9 个 WD 家系进行 RFLP 连锁分析,也发现此位点与 WD 基因位点存在紧密连锁关系,且这种关系比 Rb 位点更为密切($\theta=0.00, Z=5.376$)。

通过两位点连锁分析表明,Rb 位点与 D₁₃S₃₁ 位点存在紧密连锁关系($\theta=0.05, \text{lods 值 } Z=3.296$)。

3 位点连锁分析表明,其遗传顺序为:着丝点-Rb-D₁₃S₃₁-WND(见表 2)。

表 2 两位点配对连锁分析结果($\theta_m = \theta_t$)

位 点	θ					
	0.00	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
Rb-WND	$-\infty$	3.846	3.535	2.479	1.100	0.310
D ₁₃ S ₃₁ -WND	5.376	4.487	3.678	2.243	1.075	0.285
Rb-D ₁₃ S ₃₁	$-\infty$	3.296	2.997	2.066	1.066	0.297

3 讨 论

3.1 Rb、D₁₃S₃₁、ESD 位点的 DNA 多态性及种族差异

结果表明,在中国人群中,D₁₃S₃₁ 及 Rb 位点 P123M1.8 标记多态性信息含量较高,适于作 WD 遗传标记。而 ESD 位点在中国人群中 Apal 切点多态信息含量较低,不适于作 WD 基因的遗传标记。另外,D₁₃S₅₉/Ban I 切点的等位片段与白种人不同,此切点在中国人群中多态信息量较低,可能与种族差异或各遗传漂变有关。

3.2 WD 基因定位

根据连锁分析结果,Rb 位点与 WD 基因位点存在紧密连锁关系($\theta=0.05, Z=3.846$)。假设两基因位点的重组率无性别差异,可以认为两者之间遗传距离在 5.0cM 范围内,这一结论与 Bowcock^[7]一致,而与 Stewart^[9]报告有差异,可能与 lods 值计算时样本大小有关。

据 Farrer^[3]报告,D₁₃S₃₁ 位点位于 D₁₃q^{14.2~3},与 WD 基因位点存在高度紧密连锁关系,其遗传距离为 0.3cM。本文的结果与 Farrer 相一致($\theta=0.00, Z=5.376$)。而且 Rb 位点与 D₁₃S₃₁ 位点在 WD 家系中也存在紧密连锁关系($\theta=0.05, Z=3.296$)。综合以上结果,可以看出该区域的遗传顺序是 Rb-D₁₃S₃₁-WND 或 WND-D₁₃S₃₁-Rb,但由于 Rb 基因已定位于 13 号染色体着丝点近端,故可以认为 WD 基因在 D₁₃q^{14.2~3} 的遗传顺序为:着丝点-Rb-D₁₃S₃₁-WND。这一顺序与 Bowcock 等报告一致。

- 1 Frydman F, Bonner-Tamir B, Farrer LA. Assignment of the gene for Wilson's disease to chromosome 13, linkage to esterase D locus. *Proc Natl Sci USA*, 1985, 82: 1819
- 2 Bowcock AM, Farrer LA, Hebert JM. Eight closely linked loci place the Wilson's disease locus within D₁₃q¹⁴⁻²¹. *Am J Hum Gene*, 1988, 43: 64
- 3 Farrer LA, Bowcock Am, Hebert JM. Predictive testing for Wilson's disease using tightly linked and flanking DNA markers. *Neurology*, 1991, 41: 992
- 4 Yuzbasiyan-Gurkan V, Brewer GJ, Boewinkle E. Linkage of the Wilson's disease gene to chromosome 13 in North-American pedigrees. *Am J Hum Gene*, 1988, 42: 825
- 5 Wiggs J, Nordenskjold M, Yandell D. Prediction of the risk of hereditary retinoblastoma; using DNA polymorphisms within the retinoblastoma gene. *N Engl J Med*, 1988, 318: 151
- 6 Bale AE, Roux AF, McBride DW. Characterization and chromosomal localization of 7 polymorphic loci detected with probes from chromosome 13 library, LA15NSOR. *Cytogenet Cell Genet*, 1989, 46: 571
- 7 Bowcock AM, Hebert JM. The anonymous probe PR1-4 identifying the locus D₁₃S₅₉ detects a Ban I RFLP. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17: 8396

VASCULAR X—RAY ANATOMY OF INFRATEMPORAL SPACE

Shan Hong Li Yuan Ai Hong Xu Chuan

(Department of Radiology, 3rd Affiliated Hospital,
Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

Forty-nine external carotid arteriography were carried out in 28 patients without maxillofacial and nasal sinus diseases. The point of origin of internal maxillary artery, the segmental trends of different branches, the relationship between the maxillary artery and ethmo-maxillary plate/pterygopalatine fossa, and the vascular construction of infratemporal space were observed. The vascular x—ray signs of the space were described systematically 99.6% of the internal maxillary arteries took their origin from the external carotid artery 10mm by the bone mark of the first cervical vertebrae. The internal maxillary artery and its branches give main blood supply to the infratemporal space. The artery is wrapped by venous network. There is a close relation between the telangions sphenopalatina artery/infraorbital artery and ethmo-maxillary plate/pterygopalatine fossa.

Subject headings maxillary artery/anatomy & histology; radiography

(上接第 17 页)

1986, 83 : 6573

8 Squire J, Thaddeus PD, Dunn J. Cloning of the esterase D gene: A polymorphic gene probe closely linked to the retinoblastoma locus on chromosome 13. Proc Natl Acad Sci, USA,

9 Stewart EA, White A, Bowcock AM. Polymorphic microsatellites and Wilson's disease (WD). Am J Hum Genet, 1993, 53 : 864

(1995-04-27 收稿 1995-07-07 修回)

THE STUDY OF MAP OF WILSON'S DISEASE GENE BY LINKAGE ANALYSIS

Xu Pingyi Liang Xiuling Liu Zhuolin

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

In this paper, to obtain DNA markers more closely linked to Wilson's disease gene (WD) in Chinese and constructed a genetic map of DNA markers within $D_{13}q^{14\sim 21}$ which will refine the location of WD, the authors analyzed the segregation of 4 DNA markers within $D_{13}q^{14\sim 21}$ in 75 unrelated normal Chinese individuals and members of 9 Chinese families with WD. The DNA analysis revealed the polymorphic alleles of 3 markers were the same in Chinese as in Caucasians but the allele frequencies were quite different, we confirmed a tight linkage between WD gene and 2 markers $D_{13}S_{31}$, Rb. The genetic order was as follows: centromere—Rb— $D_{13}S_{31}$ —WND.

Subject headings hepatolenticular degeneration/genetics; restriction fragment length polymorphism; chromosome mapping