

文章编号: 1003-2754(2009)04-0414-04

中国人 Wilson 病患者基因高频突变位点的快速检测

程楠¹, 陆兵勋¹, 杜益刚², 王训², 胡纪源², 胡文彬²,
李凯², 韩咏竹², 潘速跃¹, 杨任民²

摘要: 目的 建立可用于临床的中国人 Wilson 病(WD)患者快速、高效的基因检测方法。方法 PCR 扩增 142 例非同源家系的 WD 患者 ATP7B 基因第 8、12、13 外显子(以 30 例健康人为正常对照), 分别以限制性内切酶 MspI 和 BstSI 消化扩增产物, 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 根据各外显子的限制性酶切图谱分析有无突变, 其结果经 DNA 测序验证。结果 48.59% (69/142) 的患者在第 8 外显子检出 A778Leu 突变, 其中纯合突变 13 例, 杂合突变 56 例, 染色体突变频率为 28.87% (82/284); 5.63% (8/142) 的患者在第 12 外显子检出 T935Met 杂合突变, 染色体突变频率为 2.82% (8/284); 24.65% (35/142) 的患者在第 13 外显子检出 P992Leu 突变, 其中纯合突变 3 例, 杂合突变 32 例, 染色体突变频率为 13.38% (38/284)。检出突变的患者中有 12 例为 A778Leu/P992Leu 复合杂合突变, 1 例 A778Leu/T935Met 复合杂合突变, 1 例 A778Leu 纯合突变合并 P992Leu 杂合突变, 总检出率为 69.01% (98/142)。以上结果均经 DNA 测序证实。结论 13 外显子 P992Leu 突变是中国人 WD 患者的基因突变热点之一。采用限制性酶谱分析法能快速、准确检出 WD 患者基因高频突变位点, 可用于对 WD 疑诊患者及其家系成员的基因诊断。

关键词: Wilson 病; 基因突变; 限制性内切酶图谱分析

中图分类号: R741 **文献标识码:** A

Rapid detection of high frequency mutational sites of Chinese Wilson's disease gene CHENG Nan, LU Bing-xun, DU Yi-gang, et al. (Department of Neurology, Southern Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To establish a fast and effective gene diagnosis method for Wilson's disease (WD) patients by PCR-based restriction mapping analysis. Methods We amplified exon 8, exon 12 and exon 13 of ATP7B gene by PCR from genomic DNA, then analyzed by digestion with restriction enzymes MspI and BstSI respectively and followed by 2% gel electrophoresis of the cleavage products. 142 unrelated WD patients and 30 unrelated normal controls were screened with this method and verified by direct sequencing. Results A778Leu of exon 8 was detected in 48.59% (69/142) patients. 13 patients were homozygous and another 56 patients were heterozygous for this mutation. The frequency of the A778Leu was 28.87% (82/284). T935Met of exon 12 was detected in 5.63% (8/142) patients and 8 cases were all heterozygous for this mutation. The frequency of the T935Met was 2.82% (8/284). P992Leu of exon 13 was detected in 24.65% (35/142) patients. 3 patients were homozygous and another 32 patients were heterozygous for this mutation. The frequency of P992Leu was 13.38% (38/284). Among them, 12 cases were compound heterozygous mutation with A778Leu/P992Leu, 1 case was compound heterozygous mutation with A778Leu/T935Met and 1 case was A778Leu homozygous mutation which combined with P992Leu heterozygous mutation. Mutations were detected in 69.01% (98/142) patients totally. The result of this method was the same as that of the DNA sequencing. Conclusion P992Leu of exon 13 is a hotspot of mutation in Chinese WD patients. The method of restriction mapping can identify high frequency mutational sites of WD gene accurately and rapidly and help to diagnose suspicious WD cases and their family members.

Key words: Wilson's disease; Gene mutation; Restriction mapping analysis

Wilson 病 (Wilson's disease, WD) 是一种常染色体隐性遗传铜代谢障碍性疾病, 不同人群的发病率约为 1/30 000 ~ 1/100 000, 其发病原因系 ATP7B 基因突变导致编码产物 ATP7B 蛋白功能缺陷, 引起铜离子跨膜转运障碍, 体内过量的铜在肝、脑、角膜等器官沉积, 临床可出现肝硬化、神经、精神症状、角

收稿日期: 2009-03-05 修订日期: 2009-07-11

基金项目: 安徽省临床医学重点学科科学技术进步项目 (No. 2004-208); 安徽省高校青年教师资助计划项目 (No. 2007-J1116)
作者单位: (1. 南方医科大学南方医院神经内科, 广东 广州 510515; 2. 安徽中医学院神经病学研究所附属医院, 安徽 合肥 230061; 程楠, 通讯作者)

膜 K-F环等表现,严重者可危及生命^[1]。

研究证实,WD基因存在高度的遗传异质性,各外显子的突变位点众多,目前已发现超过 300种形式的基因突变,且多为复合杂合突变,常见突变形式少见,多为罕见突变,在不同人种间突变形式亦存在明显差异^[2]。这虽然解释了 WD临床表现复杂多样的原因,但给基因诊断走向实用带来了困难。包括本单位在内的国内多家研究结果证实第 8外显子和第 12外显子是中国人 WD患者的突变热区^[3~5]。王柠^[6]等应用限制性酶谱分析法检测了 56例非同源家系的 WD患者的第 8、12号外显子,有 48.2%的患者检出突变。

近来,Gu YH等^[7]对 39例汉族和 1例回族 WD患者的外显子基因检测结果发现有 57.5%的突变位点位于第 8、12、13外显子上,ChloeMM等^[8]对 65例粤港地区 WD患者的基因检测结果则发现第 13外显子的 Pro92Leu突变率高达 13.4%。基于此,作者等采用限制性酶谱分析法对 142例非同源家系的 WD患者的第 8、12和 13号外显子进行检测,以期建立可用于临床的中国人 WD基因快速检测方法。

1 对象与方法

1.1 对象 142例来自不同家系的 WD患者均系 2008年 5月~12月间在安徽中医学院神经病学研究所附院住院治疗的确诊病例,其中男性患者 85例,女性患者 57例,发病年龄 4~44岁(14.66±6.61岁),病程 0.1~27年(4.31±4.73年)。所有患者均符合 WD的诊断标准^[9、10]。30例无血缘关系的健康对照者经铜生化及 K-F环等检查均正常。

1.2 方法

1.2.1 全血基因组 DNA提取 用含枸橼酸钠抗凝剂的真空采血管采集受检者 3~5ml外周静脉血,应用全血基因组 DNA提取试剂盒(凯基生物科技发展有限公司)提取 DNA。具体操作过程按说明书要求进行。DNA样本经测定 A260/A280比值定

量,分装后分别于 4℃和 -20℃的冰箱中保存。

1.2.2 PCR扩增 根据文献^[11]及各外显子 GENE BANK序列设计的引物序列(见表 1)。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR扩增反应条件:50μl反应体积含 500 ng基因组 DNA、dNTP 250μmol/L、引物各 0.25μmol/L、1.5U TaKaRa Taq DNA聚合酶(Hot Star Version)(大连宝生物工程有限公司)。扩增使用 PTC-150自动热循环仪(MJ Research USA),为保证 PCR产物符合酶切及测序要求,扩增条件采用 Touchdown方式:95℃ 10min(使 DNA充分变性的同时激活 Hot Star Taq酶),95℃变性 30s,63℃~56℃复性 45s(从 63℃开始,每个循环降低 0.5℃,一直降至 56℃),72℃延伸 45s,然后复性温度固定为 56℃,其他条件不变,行 20个循环,最后 72℃延伸 10min。PCR产物经 10g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.3 限制性内切酶图谱分析 各外显子的突变位点、酶切位点、限制性内切酶/反应温度、酶切产物片段大小(见表 1)。限制性内切酶 MspI和 TaqI购自 MBI公司(USA);BstDsr购自 BioBasic公司(CA)。酶切反应体系中含 6μl PCR产物、2μl 限制性内切酶和 2μl 10×缓冲液,以去离子双蒸水补至 20μl,覆盖 20μl 石蜡油后孵育 8~12h使样品完全酶切。取酶切产物 15μl 于 2.0%琼脂糖凝胶 100V 恒压电泳 2.5h EB染色,缓冲液为 0.5×TBE。以 PBR322 DNA/BsuRI(HaeIII)为分子量标记。电泳结束后,紫外灯上观察、拍照。以正常人为对照,根据酶切产物电泳分离得到的限制性内切酶图谱分析有无突变。

1.2.4 酶切异常的 PCR产物以纯化试剂盒(爱思进生物技术杭州有限公司)过柱纯化后送上海英骏生物技术有限公司行 DNA测序。将测序结果与 GeneBank中人类 ATP7B 基因序列(NC_000013)比较,用 Omgene软件分析比对结果。

表 1 各外显子突变位点、酶切位点、引物序列、限制性内切酶/反应温度、酶切产物片段大小

外显子	突变位点	酶切位点	引物序列	限制性内切酶/反应温度	酶切产物片段大小
8	Ato78Leu	CGG→CTG	F: 5'-AACCCTTCACITGTCCTTGTC-3' R: 5'-AGGCAGCTCTTTTCTGAAC-3'	MspI/37℃	237+59
12	Th935Met	ACG→ATG	F: 5'-CTIGTGGTGT'TTTTATTTC-3' R: 5'-ACCACCATATAGCCCAAG-3'	TaqI/65℃	140+89
13	Pro92Leu	CCC→CTC	F: 5'-CCCTGAAATGTCCTTATGTG-3' R: 5'-ACACTGCTGICTTIGAGTGGCT-3'	BstDsr/65℃	196+188

的 His1069G 突变进行检测,证明了其在 WD 患者特别是症状前期患者诊断中的价值。在此基础上,国内多家单位也采用该方法开展对 WD 患者的高频突变位点进行快速检测的研究^[6 17 18],结果发现检测中国人第 8 外显子 778 密码子和 12 号外显子 935 密码子可使约半数的 WD 患者得以确诊。如果在此基础上找到其它的高频突变位点,则能大大提高本病的检出率并可使其应用于临床。

上世纪末, NanjiMS^[19] 和 Tsai CH^[20] 分别发现日本和我国台湾地区的 WD 患者第 13 号外显子存在 Pro992Leu 突变。Gu YH^[7] 则发现了国人 WD 基因第 13 外显子的 Pro992Leu Ser975Trp 2885delC 和 G1063Stop codon 4 种突变类型。杨静芳等^[21] 除了检测到国人 WD 患者第 13 号外显子 Pro992Leu Ser975Trp 这两种突变类型外,还发现了 Thr977Met Cys980Tyr 错义突变及位于侧翼区第 12 内含子的 2866-13C>G 杂合多态。作者等采用 DNA 测序方法对我国华中和华东地区 139 例非同源家系的 WD 患者第 13 号外显子进行了检测,发现了 Ser975Tyr Thr977Met Pro992Leu G1088Val A1018Va 和 2866-13C>G 等 6 种突变和多态形式,其中 G1088Val 为首次报道(GENEBANK 注册号为 F105811),总的检出率为 29.49%, Pro992Leu 突变率为 23.02% (另文发表)。这些结果提示,国人 WD 患者第 13 号外显子突变类型多且突变率较高,有可能为突变热区之一。

经 DNA 测序结果证实,本组 142 例患者共有 98 例检出突变,检出率为 69.01%,其中第 8 号外显子 Arg78Leu 突变、第 12 号外显子 Thr935Met 突变和第 13 号外显子 Pro992Leu 突变的检出率分别为 48.59%、5.63% 和 24.65%, Pro992Leu 的突变率仅次于 Arg78Leu 突变而高于 Thr935Met 突变,与 Gu YH 和 ChloMM 等的结果是一致的,因此 Pro992Leu 是中国人 WD 患者的高频突变位点之一。由本研究可知,采用限制性酶谱分析法检测中国人 WD 患者的高频突变位点可明显提高检出率,且该方法快速简便、只需一台普通 PCR 仪和电泳仪即可开展,无需其它特殊的昂贵设备,在临床实践中可作为筛选 WD 疑诊患者及其家系成员的常规检测方法。

[参考文献]

- [1] Ala A Walker AP Ashkan K et al Wilson's disease J. Lancet 2007 369 397-408
- [2] Ferenci P Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing J. Hum Genet 2006 12Q 151-159
- [3] 许月芳,范玉新,余龙,等. PCR 直接测序在 Wilson 病基因第 8 外显子检出一个突变热点[J]. 中华医学遗传学杂志, 1998 15: 284-287.
- [4] 吴志英,王柠,慕容慎行,等. 肝豆状核变性基因第 12 号外显子突变特征的研究[J]. 中华医学杂志, 1999 79: 422-424
- [5] 徐评议,梁秀龄,马少春. Wilson 病 8 号外显子突变研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 1999 16: 88-89
- [6] 王柠,吴志英,林琅琳,等. 应用限制性酶谱分析法快速检出 Wilson 病基因突变热点[J]. 中华神经科杂志, 1999 32: 281-283.
- [7] Gu YH Kodama H Du SL et al Mutation spectrum and polymorphisms in ATP7B identified on direct sequencing of all exons in Chinese Han and Hui ethnic patients with Wilson's disease J. Clin Genet 2003 64 479-484.
- [8] ChloMM ChingWL Sidney T et al Mutational analysis of 65 Wilson disease patients in Hong Kong Chinese: Identification of 17 novel mutations and its genetic heterogeneity J. J Hum Genet 2008 53 55-63
- [9] 杨任民主编. 肝豆状核变性[M]. 合肥: 安徽科技出版社, 1995. 167-182
- [10] Roberts EA Schilsky ML A Practice guideline on Wilson disease [J]. Hepatology 2003 37: 1475-1492
- [11] Thomas GR Forbes JR Roberts EA et al The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences J. Nat Genet 1995 9 210-217
- [12] 胡纪源,吕达平,王共强,等. 肝豆状核变性的临床误诊研究[J]. 中华医学杂志, 2001 81: 642-644
- [13] Bull PC Thomas GR Rommens M et al The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene J. Nat Genet 1993 5 327-337
- [14] Petukhin K Fischer SG Pimasu M et al Mapping cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene J. Nat Genet 1993 5 338-342
- [15] Tanzi RE Petukhin K Chemov I et al The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene J. Nat Genet 1993 5 344-350
- [16] Majer DT Ferenci P Pollic et al Detection of the His1069G mutation in Wilson disease by rapid polymerase chain reaction J. Ann of Intern Med 1997 127 (1): 70-72
- [17] 马少春,徐评议,梁秀龄,等. 肝豆状核变性 8 号外显子 778 密码子基因突变的酶切检测[J]. 中国神经精神疾病杂志, 1998 24 (6): 333-335.
- [18] 程楠,胡纪源,杨任民,等. PCR 酶切法检测 Wilson 病 935 密码子基因突变[J]. 中国优生与遗传杂志, 2000 8 (3): 24-25
- [19] NanjiMS Nguyen VT Kawasoe H et al Haplotype and mutation analysis in Japanese patients with Wilson disease J. Am J Hum Genet 1997 6Q 1423-1429.
- [20] Tsai CH Tsai FJ Wu Y et al Mutation analysis of Wilson disease in Taiwan and description of six new mutations J. Hum mutat 1998 12 370-376
- [21] 杨静芳,梁秀龄,马守忠,等. 74 例肝豆状核变性患者中 ATP7B 基因七种新突变的发现[J]. 中华神经科杂志, 2006 39: 673-676