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 ATP7 B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 MsPJ Tail和 BsDsi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 Ars778 Leu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 Th935Met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 Prop92 Leu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 Ars778 Leu火Prop92 Leu复合杂合突变,1例 Ars778 Leu/Th935Met复合杂合突变,1例 Ars778 Leu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 Prop92 Leu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: W i son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 (HENG Nan, III) Bing_xun, DU Yigang et al (Department of Neurology Southern Hospital Affiliated to Southern Medical University Guangzhou 510515 China)

Abstract Objective To establish a fast and effective gene diagnosism ethod for Wilson's disease (WD) patients by PCR-based restriction mapping analysis Methods We amplificated exong exon₁₂ and exon₁₃ of ATP₇B gene by PCR from genomic DNA, then analyzed by digestion with restriction enzymes Msp.I Tail and Bs.DsI respectively and followed by 2 % gel electrophores is of the cleavage products 142 unrelated WD patients and 30 unrelated normal controls were screened with this method and verified by direct sequencing Results Ang778Leu of exon 8 was detected in 48 59% (69/142) Pa tients 13 Patients were homozygous and another 56 Patients were heterozygous for this mutation. The frequency of the A \$7.78 Leu was 28 87% (82/284). This 35 Met of exon 12 was detected in 5 63% (8/142) Patients and 8 cases were all heterozygous for this mutation. The frequency of the This 35Met was 2 82% (8/284). Prog 2Leu of exon 3 was detected in 24 65% (35/142) Patients 3 Patients were homozygous and another 32 Patients were heterozygous for this mutation. The frequency of Prop92 Leu was 13 38% (38/284). Among them, 12 cases were compound heteroxygous mutation with A 18778 Leu/Progo 2 Leu 1 case was compound heteroxy sous mutation with A 18778 Leu/Th 1935 Met and 1 case was A 18778 Leu homozygous mutation which combined with 1878 Leu 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 Prog 92 Leu of exon 3 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

Keywords Wilsons disease Genemutation 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 ATP7 B基因突变导致编码产物 ATP7 B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 月116)作者单位:(1. 南方医科大学南方医院神经内科,广东广州 5105152 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¹²。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¹⁶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, Chloe MM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 Pro92 Leu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 $4\sim44$ 岁(14.66±6.61岁),病程 $0.1\sim27$ 年(4.31±4.73年)。所有患者均符合 WD的诊断标准 $[^{9.10}]$ 。30例无亲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 3~5^m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° C和 -20° C的冰箱中保存。
- 1.2.2 PCR扩增 根据文献 ¹¹ 及各外显子 GENEBANK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: 50μ 版应体积含 500 ng基因组 DNA, dNTP 250μ mol/L 引物各 0.25μ mol/L 1.5U TaKaRa Taq DNA聚合酶 (Hot Sar 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℃ 10 min(使 DNA充分变性的同时激活 Hot Sar Tac酶) 95℃变性 30 s 63℃ ~56℃复性 45 s从 63℃开始,每个循环降低 0.5℃,一直降至 56℃)、72℃延伸 45 s 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 10 min PCR产物经 10 s/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 Msp和 Tail 购自 MBI公司 (USA), BsDsI购自 BioBasic公司 (CA)。 酶切反应体系中含 64 1 PCR产物、24 限制性内切酶和 24 110×缓冲液,以去离子双蒸水补至 204,覆盖 204 石蜡油后孵育 8~12 b使样品完全酶切。 取酶切产物 154 牙 2 0% 琼脂糖凝胶 100 V恒压电泳 2 5 h EB染色,缓冲液为 0 5× TBE 以PBR3 22 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 ATP7 B基因序列(NC-000013)比较,用 Omiga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	Ar\$778Leu	CGG→ CTG	F, 5 -AACCCTICACIGTCCTTGIC-3	M₽I/37°C	237+59
			R. 5-'AGGCAGCTCTTTTCTGAAC-3'		
12	Th 935Met	ACG→ ATG	F ₅ -CTIGTGGIGTTTIATTIC-3	Ta iI∕65°C	140 ± 89
			Ŗ 5-ACCACCATATAGCCCAAG-3 ′		
13	Pro992 Leu	CCC→ CTC	F, 5 -CCCCTGAAATGTCCTTATGTG-3 '	BsDsI∕65°C	196 ± 188
			Ŗ 5-ACACIGCIGICTIGAGIGGCT-3 ′		

2 结 果

- 2.1 PCR产物酶切结果分析 各外显子未发生突变时仅有 1个相应的限制性内切酶位点,完全酶切后电泳可产生两条片段,发生纯合突变的患者两条染色体上的酶切位点消失而未能被酶切,电泳呈单一片段。发生杂合突变的患者只有一条染色体上的酶切位点消失,其未被酶切的单一片段和另一条染色体完全酶切的两条片段同时存在,酶切后电泳可得相应的 3条片段(见表 1)。
- 2 1. 1 第 8 外显子酶切结果 本组 142 例 WD患者中,73 例酶切结果与正常对照相同,呈现 237 bP片段 (59 bP已跑出胶) 为未发生突变的患者;13例仅有 296 bP片段,判断为 A均78 Leu纯合突变患者;56 例同时具有 296 bP 237 bP两种片段,判断为 A均78 Leu杂合突变患者。本组患者第 8 外显子的突变检出率为 48 59% (69/142) 染色体突变频率为 28 87% (82/284)。
- 2.1.2 第 12外显子酶切结果 本组中 8例同时具有 229 bp 140 bp和 89 bp 3 条 片段,判断为 Th 935 Me 杂合突变患者。本组患者第 12 外显子的突变检出率为 5.63% (8/142),染色体突变频率为 2.82% (8/284)。
- 2 1. 3 第 13外显子酶切结果 本组中 3例仅有 384 bP片段,判断为 PT992 Leu纯合突变患者; 32 例同时具有 384 bP 196 bP和 188 bP3条片段(196 bP和 188 bP这两条片段在琼脂糖中未能分开而重叠,呈现比 384 bP片段更宽的条带),判断为 PT992 Leu杂合突变。本组患者第 13外显子的突变检出率为 24 65%(35 /142),染色体突变频率为 13 38%(38/284)。本组检出突变的 WD患者中有 12例同时存在 A均78 Leu和 PT992 Leu的杂合突变,1例同时存在 A均78 Leu和 Th935Me的杂合突变,即复合杂合突变;另有 1例存在 A对78 Leu和合实变合并 PT992 Leu杂合突变。因此,本组 142例患者共有 98例检出突变,总检出率为 69.01%(98/142)。
- 2.2 PCR产物 DNA测序结果 酶切异常的 PCR产物测序结果,其与限制性酶谱分析结果完全相符。测序结果显示 A型78 Leu纯合突变的患者合并 Leu770 Leu纯合多态, A型78 Leu杂合突变的患者合并 Leu770 Leu杂合多态 (见图 1~图 5)。

3 讨 论

WD是少数可以治疗的神经遗传病之一,患者如果能在发病早期或症状前期得到及时诊治,多数可以获得与正常人相仿的生活质量和寿命,反之病

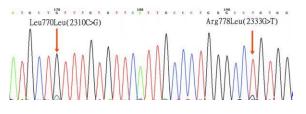


图 1 Ar均78 Leu纯合突变 (CGG+ CTG)合并 Leu770 Leu 纯合多态 (CTG+ CTG)

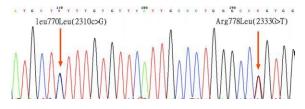


图 2 Ar均78 Leu杂合突变 (CGG > CG/TG)合并 Leu770 Leu 杂合多态 (CTG > CTC/G)

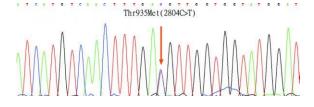


图 3 Th935Me杂合突变(ACG→AC/TG)

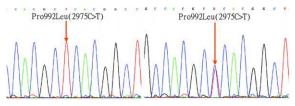


图 4 Pro992Leu纯合突变 (CCC→ CTC)

图 5 Prog92Leu杂合突变 (CCC→ CC/TC)

情逐渐加重甚至危及生命^[1]。虽然典型的 WD患者根据特征性临床表现及实验室铜代谢检查等不难诊断,但许多患者早期症状复杂多样,极易被误诊为其他疾病^[12],铜代谢检查又常存在假阴性或假阳性结果^[10],因此本病的早期诊断特别是症状前期和产前诊断较为困难。自 1993年 WD基因被克隆以来^[13~15],国内外众多学者探索采用基因诊断技术对 WD患者进行症状前期及产前诊断。

目前已用于 WD基因诊断的方法有 RFLP/SIR/SNP家系连锁分析、PCR-SSCP PCR-DHPLC DNA测序等,但这些方法或不能定性,或操作烦琐、需要专门设备,难以在临床中推广。已有的资料显示,WD基因突变以点突变形式为主,由于点突变能使原有的酶切点消失或出现新的酶切位点,故可针对已知突变位点选用合适的限制性内切酶进行酶切分析。 Maje¹⁶¹首先采用酶切法对欧美裔 WD患者

的 Hino69Gl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等[19]和 Tsai CH等[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 Progg2 Let突变。 Gu YH等[7]则发现了国人 WD基因第 13 外显子的 Prog92 Leu Seg75 Tty 2885 delC和 Glig63 Stop codon4 种突变类型。杨静 芳等^[2]除了检测到国人 WD患者第 13号外显子 Progg Let Seg 75 Tr这两种突变类型外, 还发现了 Th 977Met Cysy80 Ty错义突变及位于侧翼区第 12 内含子的 2866-13 C> 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 7 Sep75 Tyr Thp77Met Pro992 Leu G 1988 Val A № 18 Va 和 2866-13 C> G等 6 种 突变和多态形 式,其中 G1988 Val为首次报道 (GENEBANK注册 号为 F505811) 总的检出率为 29. 49%, Pro992 Leu 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 Ar\$78 Lee突变、第 12号外显子 Th\$35Me 突变和第 13号外显子 Pr\$992 Lee以突变的检出率分别为 48 59%、5. 63%和 24 65%,Pr\$992 Lee的突变率仅次于 Ar\$78 Lee突变而高于 Th\$35Me突变,与 Gu YH和 ChleeMM等的结果是一致的, 因此 Pr\$992 Lee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 diseasq J. Lancet 2007, 369, 397-408

- Gene,t 2006 120 151-159
- [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[1]. 中华医学杂志, 1999 79, 422-424
- [5] 徐评议, 梁秀龄, 马少春. Wilsons病 8号外显子突变研究[J.中华医学遗传学杂志, 1993 16, 88-89
- [6] 王 柠, 吴志英 林珉婷 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 S. L. et al. Mutation spectrum and polymor.

 Phisms in ATP7B identified on direct sequencing of all exons in Chinese Han and Hui ethnic patients with Wilson's disease. J. ClinGen.

 et 2003 64, 479-484.
- [8] Chloe M. Ching W.L. Sidney T et al Mutational and Jissis of 65 Wilson disease Patients in Hong Kong Chinese Hentification of 17 novel mutations and its genetic heterogeneity J. 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 Fothes R Roberts EA et al TheW ilson 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 [1]. 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] Petrukhin K Fischer SG PirastuM 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 J, et al. The W ilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene J. Nat Genet 1993 5 344-350
- [16] MajerDT FerenciP PolliC et al Detection of the His1069G lumutation in Wilson disease by rapid polymerase chain reaction J.

 Ann of InterMed 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 []. 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[1]. 中国优生与遗传杂志, 2000 8(3): 24-25
- [19] NanjiMS, Nguyen VT, Kawa soe JH, et al. Haplot the and mutation analysis in Japanese patients with Wilson disease J. Am. J. Hum. Genet 1997, 60, 1423-1429.
- [20] Tsai CH, Tsai FJ W u JY 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[1]. 中华神经科杂志, 2006 39. 673-676