

· 论 著 ·

与 ATP7B 基因紧密连锁的微卫星 DNA 单体型 在汉族 Wilson 病的多态性分析

刘晓青¹, 张雅芬¹, 顾学范¹, 王蕾², 鲍克容¹

(1. 上海第二医科大学新华医院, 上海市儿科医学研究所, 上海 200092; 2. 上海基康生物技术有限公司, 上海 200233)

【摘要】 目的 了解与 ATP7B 基因紧密连锁的微卫星 DNA (D13S314, D13S301 和 D13S316) 单体型在正常人、Wilson 病 (WD) 患者及其杂合子的分布特点及意义。方法 采用荧光标记 3 个短串联重复标记 (D13S314, D13S301 和 D13S316), 测序定位和 Genotype™ 软件技术分析 71 例 WD 患者和 123 位父母的单体型。结果 在 D13S314, D13S301 和 D13S316 位点分析中得到 71 例 WD 患者和 123 位携带者及 54 例正常个体等位基因片段; 片段大小分别为 134~157 bp, 128~156 bp 和 136~154 bp; 获得等位基因数分别为 19, 20 和 15 个; 3 个位点的杂合率分别是 0.79, 0.82 和 0.23。D13S314, D13S301 和 D13S316 位点的等位基因分布在 WD 患者和正常人群之间明显不同, 其中 D13S314 和 D13S301 位点显示各有 9 个等位基因片段存在明显差异 ($P < 0.05$), D13S316 位点显示有 4 个等位基因片段存在明显差异 ($P < 0.01$); 显示的 81 种单体型中以 12-6-5, 15-10-5, 6-10-5 和 6-14-5 最多见, 分别占 5.2%, 4.5%, 4.5% 和 3.7%, 其次为 12-8-5, 12-9-5 和 6-16-5, 各占 3.0%, 13-10-8, 6-13-5, 6-14-13 和 6-9-5 各占 2.2%。**结论** 单体型的类型较多可能和基因突变的类型多样化相关, D13S314-D13S301-D13S316 的单体型分析对 WD 的诊断, 尤其是症状前或产前诊断都有重要的意义, 是有效及可行的方法之一。

【关键词】 Wilson 病; 单体型; 微卫星 DNA

【中图分类号】 R596.1; R742.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2002)06-0448-05

Polymorphism of ATP7B Related Microsatellite DNA Haplotypes in the Ethnic Han Chinese with Wilson Disease

LIU Xiao-Qing, ZHANG Ya-Fen, GU Xue-Fan, et al.

Shanghai Institute for Pediatric Research, Xinhua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092, China

Abstract: Objective To explore the distribution and significance of haplotypes of microsatellite DNA (D13S314, D13S301 and D13S316) closely related to ATP7B in normal population, Wilson disease (WD) patients and heterozygotes. **Methods** Using three well characterized short tandem repeat markers of fluorescence labelling (D13S301, D13S314 and D13S316), localization and sequence were studied with Genotype™ software in 71 WD patients and 123 WD parents. **Results** Based on the analysis of haplotypes of D13S314, D13S301 and D13S316, 19, 20 and 15 alleles were obtained in the 71 patients with WD, 123 carriers and 54 normal persons, respectively. The size of segments was 134-157 bp, 128-156 bp, and 136-154 bp, respectively. Heterozygosity was 0.79, 0.82 and 0.23, respectively. There was significant difference in the distribution of alleles of D13S314, D13S301 and D13S316 makers between the WD patients and normal persons (9 alleles were noted in D13S314 maker, 9 alleles in D13S301 maker and 4 alleles in D13S316 maker) ($P < 0.05$ or 0.01). There were 81 haplotypes. Of them, 12-6-5, 15-10-5, 6-10-5 and 6-14-5, the commonest haplotypes, accounted for 5.2%, 4.5%, 4.5% and 3.7% respectively; 12-8-5, 12-9-5 and 6-16-5 separately accounted for 3.0%; 13-10-8, 6-13-5, 6-14-13 and 6-9-5 separately accounted for 2.2%. **Conclusions** The complexity of haplotypes may be related to the complexity of mutation spectrum of ATP7B. The haplotype analysis of D13S314-D13S301-D13S316 is very valuable in

[收稿日期] 2002-01-26; [修回日期] 2002-07-30
[基金项目] 教育部《高等学校骨干教师资助计划》资助(2000)
[作者简介] 刘晓青(1954-), 女, 博士, 副主任医师。

making a diagnosis of WD, especially in presymptomatic patients. It is also useful for prenatal diagnosis of WD.

Key words: Wilson disease; Haplotype; Microsatellite DNA

肝豆状核变性又称为 Wilson 病 (Wilson disease, WD) 是少数几种可治的遗传性疾病之一,因此早期诊断对早期治疗有极其重要的意义。人类基因组中存在的微卫星重复序列具有高度多态性,近年来越来越多地被用于人类遗传研究,称为新一代基因连锁分析的遗传标志。为了解 WD 患者的染色体单体型 (Haplotype) 的多态性,我们用 D13S314, D13S301 和 D13S316 微卫星位点对 WD 家系进行单体型分析,以评估这 3 种微卫星 DNA 单体型在本组 WD 患者基因诊断中的特异性。

1 材料和方法

1.1 DNA 标本来源

由分别来自 69 个家庭(无亲缘关系)的 71 例 WD 患者(为新华医院和上海儿童医学中心小儿及神经内科住院或门诊确诊的病例)和 54 名无亲缘正常人自愿提供外周静脉血 3 ml,用本研究室常规的酚-氯仿、乙醇法提取基因组 DNA,TE(三羟甲基氨基甲烷/乙二胺四乙酸)溶解,4℃ 冰箱保存。

1.2 PCR 扩增引物

每对引物中 1 条的 5' 端标记 Fam 荧光(上海基康生物技术有限公司合成),D13S314 序列为 5'-GAGTGGAGGAGGAGAAA GA-3' 和 5'-GTGTGACTGGATGGA TGTGA-3',D13S301 序列为 5'-ATCATACCTGGTTGTGCAACG-3' 和 5'-CCAGATGCTTCTTT CTAAACACACA-3',D13S316 序列为 5'-GCA GCAATGCTTTGTTGCATAA-3' 和 5'-TGTTTC CCACCAATCTTACCG-3'。

1.3 PCR 扩增条件

PCR 反应体积 5 μl (10 × PCR Buffer 0.5 μl, 25 mmol MgCl₂ 0.5 μl, 2.5 mmol dNTPs 0.5 μl, 5 U/μl Ampli Taq Gold™ 0.04 μl, 5 μmol 扩增引物, DNA 50 ~ 100 ng)。反应条件:95℃ 12 min;变性 94℃ 25 sec,退火 55℃ 25 sec,延伸 72℃ 50 sec 10 个循环;变性 89℃ 25 sec,退火 55℃ 25 sec,延伸 72℃ 50 sec 25 个循环;72℃ 10 min。PCR 仪:GeneAmp PCR System 9600。

1.4 电泳

取 3 μl 终止液(去离子甲酰胺 2.5 μl, 0.09% (w/v) 溴酚蓝 0.5 μl, 0.09% (w/v) 二甲苯青 FF 0.5 μl) + 1.3 μl PCR 扩增产物 95℃ 4 min 后即置于冰上,取 1.5 μl 于 ABI PRISM™ 377 DNA 测序仪上样电泳检测。

1.5 DNA 片段大小的估计

获得的等位基因的峰值,经 Genotype™ (Ver. 2.5) 软件分析确定各片段大小。

1.6 统计学分析

计算各位点的杂合率及各单体型的频率。SPSS 10.0 统计软件进行 R × C 多个率的卡方检验。

2 结果

2.1 片段大小及杂合率

在 D13S314, D13S301 和 D13S316 位点分析中得到 71 例 WD 患者和 123 例 WD 患者父母及 54 例正常个体等位基因片段,等位基因片段依次是 134 bp ~ 157 bp, 128 bp ~ 156 bp 和 136 bp ~ 15 bp,各组间杂合率差异无统计学意义 (P > 0.05),3 个位点的多态信息量 (PIC) 分别为 0.70, 0.78 和 0.58。见表 1。

表 1 D13S314, D13S301 和 D13S316 的等位基因片段大小、杂合率、多态信息量

Table 1 Size, heterozygosity and PIC of D13S314, D13S301 and D13S316

微卫星标记	片段大小	杂合率 (%)			(PIC)
		正常	WD 患者	WD 父母	
D13S314	134 ~ 157	39/54 (0.72)	56/71 (0.79)	106/123 (0.86)	0.70
D13S301	128 ~ 156	45/54 (0.83)	58/71 (0.82)	89/123 (0.72)	0.78
D13S316	136 ~ 154	12/54 (0.22)	16/71 (0.23)	27/123 (0.22)	0.58

2.2 等位基因片段

采用 Genotype™ (Ver. 2.5) 软件的人类基因组识别程序,整个峰值在 100.00 ~ 200.00 bp 确定。

得到 D13S314, D13S301 和 D13S316 位点的等位基因分别为 19, 20 和 15 个。

2.3 D13S314, D13S301 和 D13S316 位点在 WD 患

者及其父母与正常人的分布频率比较

这3个位点的等位基因在WD患者及父母(杂合子)和正常人群中显示多态现象,其等位基因类型分布构成亦有所不同。D13S314等位基因2,6,

7,11,12,13,14,15,16型,D13S301等位基因2,6,7,9,10,11,12,15,16型和D13S316的6,7,8,10型在3组间的分布频率差异有显著性($P < 0.05$ 或0.01)。见表2,3。

表2 D13S314,D13S301在WD患者及其父母与正常人中的分布频率

Table 2 Distribution frequency of D13S314 and D13S301 in WD patients, their parents, and normal persons 例(%)

等位基因	D13S314 分布			χ^2 值	P	D13S301 分布			χ^2 值	P
	对照	WD	父母			对照	WD	父母		
1	0	5(3.5)	3(1.2)	5.269		0	0	3(1.2)	3.067	
2	0	0	6(2.4)	6.172	<0.05	4(3.7)	1(0.7)	1(0.4)	7.253	<0.05
3	0	1(0.7)	2(0.8)	0.858		0	2(1.4)	0	5.006	
4	1(0.9)	1(0.7)	4(1.6)	0.740		0	1(0.7)	1(0.4)	0.758	
5	0	1(0.7)	2(0.8)	0.858		1(0.9)	4(2.8)	4(1.6)	1.322	
6	46(43.0)	40(28.2)	72(29.3)	7.383	<0.05	3(2.9)	26(18.3)	25(10.2)	15.518	<0.01
7	6(5.6)	1(0.7)	3(1.2)	8.876	<0.05	10(9.3)	2(1.4)	7(2.9)	11.549	<0.05
8	0	3(2.1)	8(3.3)	3.670		2(1.9)	12(8.5)	21(8.5)	5.703	
9	0	0	1(0.4)	1.018		41(38.0)	19(13.4)	35(14.2)	31.587	<0.01
10	2(1.9)	2(1.4)	3(1.2)	0.216		2(1.9)	26(18.3)	57(23.2)	24.213	<0.01
11	3(2.8)	10(7.0)	5(2.0)	6.747	<0.05	7(6.5)	1(0.7)	2(0.8)	13.941	<0.05
12	10(9.3)	33(30.6)	51(20.7)	8.812	<0.05	0	8(5.6)	16(6.5)	7.168	<0.05
13	1(0.9)	20(14.1)	29(11.8)	13.289	<0.05	10(9.3)	12(8.5)	12(4.9)	3.050	
14	29(26.0)	8(5.6)	17(6.9)	36.421	<0.01	2(1.9)	8(5.6)	21(8.5)	5.853	
15	1(0.9)	11(7.7)	27(11.0)	10.466	<0.05	19(17.6)	5(3.5)	6(2.4)	32.564	<0.01
16	9(8.3)	0	1(0.4)	27.969	<0.01	2(1.9)	11(7.7)	23(9.4)	6.338	<0.05
17	0	6(4.2)	10(4.1)	4.609		3(2.8)	0	4(1.6)	3.564	
18	0	0	1(0.4)	1.018		1(0.9)	4(2.8)	4(1.6)	1.329	
19	0	0	1(0.4)	1.018			0	2(0.8)	2.041	
20						1(0.9)	0	2(0.8)	1.227	

表3 D13S316在WD患者及其父母与正常人中的分布频率

Table 3 Distribution frequently of D13S316 in WD patients their parents, and normal persons 例(%)

等位基因	D13S316 分布			χ^2 值	P
	对照	WD	父母		
1	1(0.9)	4(2.8)	9(3.7)	2.043	
2	0	1(0.7)	0	2.498	
3	3(2.8)	0	3(1.2)	3.961	
4	1(0.9)	0	2(0.8)	1.227	
5	64(59.3)	72(50.7)	124(50.4)	2.593	
6	0	6(4.2)	21(8.5)	11.199	<0.05
7	2(1.9)	0	0	7.214	<0.05
8	4(3.7)	18(12.7)	18(7.3)	7.029	<0.05
9	1(0.9)	5(3.5)	9(3.7)	2.078	

续上表

等位基因	D13S316 分布			χ^2 值	P
	对照	WD	父母		
10	2(1.9)	0	0	7.214	<0.05
11	0	2(1.4)	1(0.4)	0.257	
12	12(11.1)	15(10.6)	26(10.6)	0.040	
13	17(15.7)	19(13.4)	29(11.8)	1.043	
14	1(0.9)	0	2(0.8)	1.227	
15	0	0	2(0.8)	1.227	

2.4 WD患者的单体型分析

71例WD患者中通过家系图谱得到单体型分析的为67例,按D13S314-D13S301-D13S316排列得到81种不同类型的单体型,21种类型存在2条

以上染色体,以 12-6-5,6-10-5,6-14-5 等较多见。见表 4。

表 4 WD 患者的单体型及发生频率

Table 4 Frequency of haplotypes in WD patients

单体型	染色体数目	频率(%)	单体型	染色体数目	频率(%)	单体型	染色体数目	频率(%)
1-9-5	1	0.8	13-10-5	2	1.5	3-16-5	1	
1-13-5	1	0.8	13-10-6	1		4-16-12	1	
1-16-5	1	0.8	13-10-8	3	2.2	5-13-6	1	
10-10-12	1	0.8	13-10-9	1		5-14-13	1	
10-6-5	1	0.8	13-12-5	1		6-10-12	1	
10-6-6	1		13-15-1	1		6-10-5	6	4.5
11-6-13	2	1.5	13-16-5	1		6-12-13	1	
11-6-5	1		13-6-13	1		6-12-5	2	1.5
11-9-13	2	1.5	13-6-5	1		6-13-5	3	2.2
11-9-5	1		13-8-5	2	1.5	6-14-13	3	2.2
11-9-8	1		13-8-8	1		6-14-5	5	3.7
11-9-9	1		13-8-9	1		6-15-5	2	1.5
12-10-1	1		13-9-1	1		6-16-5	4	3.0
12-10-5	1		14-10-5	1		6-18-5	2	1.5
12-13-12	1		14-13-11	2	1.5	6-4-5	1	
12-13-9	1		14-13-5	2	1.5	6-6-5	2	1.5
12-5-1	2	1.5	14-9-13	2	1.5	6-7-5	2	1.5
12-5-5	1		14-9-5	1		6-8-5	1	
12-6-13	1		15-10-12	1		6-8-8	1	
12-6-5	7	5.2	15-10-5	6	4.5	6-9-13	1	
12-6-8	2	1.5	15-11-5	1		6-9-5	3	2.2
12-6-9	1		15-12-12	1		7-6-5	1	
12-8-5	4	3.0	15-13-13	1		8-10-5	1	
12-9-5	4	3.0	17-10-5	2	1.5	8-10-8	1	
12-9-8	1		17-13-5	1		8-12-5	1	
12-9-9	2	1.5	7-16-5	1		8-14-12	1	
13-1-5	1		17-6-12	1		8-14-5	1	

3 讨论

Wilson 病是一种常染色体隐性遗传性铜代谢障碍性疾病,发病率约占活产婴儿的 1/30 000,基因携带率约为人群的九十分之一^[1]。致病基因位于染色体 13q14.3,基因产物为 P 型铜转运 ATP7B 酶^[2]。此基因缺陷可导致铜经胆汁排泄障碍及肝细胞内合成的铜蓝蛋白释放入血障碍。过量铜可抑制蛋白质的功能和具有氧化毒性作用,引起铜中毒的组织病理改变。其临床上可表现为以肝或神经系

统症状为主的多脏器病损,病程大多为慢性,但也有急性或暴发性。微卫星 DNA 广泛分布于基因组中,具有高度多态性、遗传稳定性高等优点^[3],标记微卫星的基因分型(genotyping)技术以聚合酶链反应技术为基础、快速简便、信息量大、易于确定基因型,并遵循孟德尔显性遗传方式,已被越来越多的研究单位用于基因诊断,家系连锁分析和个体识别等方面的研究,也是 WD 间接基因诊断的有效方法之一。我们在原来的基础上,由原来的聚丙烯凝胶电泳银染显色法改为荧光标记引物 5'端,应用 377 测序仪、GenotypeTM(Ver. 2.5)软件,得到 DNA 样品,

PCR 扩增容易、图谱结果清楚且易于分析。我们所选择的 D13S314, D13S301 和 D13S316 微卫星位点是与 WD 基因(ATP7B 基因)紧密连锁的 3 个位点,其多态信息量(PIC)分别为 0.70, 0.78 和 0.58。这 3 个位点也是国内外研究者应用最多的标记^[4]。本研究通过对分别来自 69 个家庭的 71 例 WD 患者和 54 名正常人的检测,得到 D13S314, D13S301 和 D13S316 片段大小分别为 134 ~ 157 bp, 128 ~ 156 bp 和 136 ~ 154 bp, 杂合率在 WD 患者中为 0.79, 0.82 和 0.23。获得等位基因数分别为 19, 20 和 15 个, Lee 等获得的等位基因数分别为 11, 14 和 10^[5], 说明在不同种族、不同地区的个体位点的基因型不同。在我们的检测中 D13S314, D13S301 和 D13S316 位点的等位基因分布在 WD 患者和正常人群之间明显不同, 其中 D13S314 和 D13S301 位点显示有 9 个等位基因片段在 3 组人群中存在明显差异($P < 0.05$), D13S316 位点显示有 4 个等位基因片段存在明显差异($P < 0.05$), 提示这些分布在 WD 患者中具有特异性。

本研究通过对 69 个 WD 家庭检测, 在 67 个 WD 家庭二代人的单体型(Haplotype)分析中获得 81 种单体型, 其中以 12-6-5, 15-10-5, 6-10-5 和 6-14-5 最多见, 分别占 5.22%, 4.5%, 4.5% 和 3.7%, 其次为 12-8-5, 12-9-5 和 6-16-5, 各占 3.0%, 13-10-8, 6-13-5, 6-14-13 和 6-9-5 各占 2.2%, 从中可反映 WD 单体型的多态性。近来的研究表明, 单体型和 WD 基因突变类型相关^[6,7], 因此可以推断, 本组之所以显示单体型的类型较多可能和基因突变的类型多样化相关, 我们亦正在分析二者之间的相

关性。微卫星位点多态性本质来源于变数串联重复, 扩增片段长度等位基因传递符合蒙德尔遗传规律, D13S314-D13S301-D13S316 的分析可以清楚的显示 67 例 WD 患者的染色体分别为父源性和母源性(5 例不能分析者可能为其他原因所致), 对 WD 的诊断, 尤其是早期诊断或产前诊断都有重要的意义, 是有效及可行的方法之一。

[参 考 文 献]

- [1] John L, Gollan, Timothy J. Wilson disease in 1998: genetic, diagnostic and therapeutic aspects [J]. *J Hepatol*, 1998, 28(1): 28 - 36.
- [2] Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, et al. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene [J]. *Nat Genet*, 1993, 5(4): 327 - 337.
- [3] 况少青, 付钢, 陈竺. 微卫星标记分析在人类基因组多样性研究中的应用 [J]. *国外医学遗传学分册*, 1997, 20(1): 5 - 9.
- [4] Manoj SN, Van TTN, Jean HK, et al. Haplotype and mutation analysis in Japanese patients with Wilson disease [J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 60(6): 1423 - 1429.
- [5] Lee CC, Wu J Y, Tsai FJ, et al. Molecular analysis of Wilson disease in Taiwan: identification of one novel mutation and evidence of haplotype-mutation association [J]. *J Hum Genet*, 2000, 45(5): 275 - 279.
- [6] Karunas AS, Mersianova IV, Poliakov AV, et al. Analysis of mutations and haplotypes of polymorphic markers in patients with Wilson-Konovalov disease from Bashkir [J]. *Genetika*, 2000, 36(7): 972 - 979.
- [7] Butler P, McIntyre N, Mistry PK. Molecular Diagnosis of Wilson Disease [J]. *Mol Genetics and Metabolism*, 2001, 72(3): 223 - 230.

(本文编辑:俞燕)