

肝豆状核变性基因诊断技术的研究进展

杜益刚 程楠 胡纪源

【关键词】 肝豆状核变性;基因诊断;技术进展

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2009.04.063

肝豆状核变性又称 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,发病率为 1/30 000~1/100 000。WD 为目前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即被确诊并得到及时治疗,大多预后良好,反之,病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^[2],铜代谢检查又存在假阴性或假阳性结果^[3],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。长期以来,国内外众多学者一直探索采用各种基因诊断技术对 WD 患者进行症状前期及产前诊断^[4]。现将已应用于 WD 的各种基因诊断技术综述如下。

1 RFLP/STR/SNP-家系连锁分析

这些方法的共同原理是将 WD 家系成员与先证者的 DNA 遗传标记进行连锁分析,通过分析其基因型进行基因诊断。在 WD 基因被克隆之前,Figus 等^[5]于 1989 年即采用限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)-家系连锁分析方法对 WD 家系成员及先证者进行产前诊断和杂合子的检出。国内吴志英、王丽娟等^[6,7]则对位于 WD 基因内部及其侧翼区的 D13S301、D13S316、D13S133 和 D13S314 等短串联重复序列(short tandem repeat, STR)进行连锁分析,证实了该方法的可行性。但 these 方法所用的 DNA 遗传标记与 WD 基因距离较远,重组率高,且必须与同一家系的先证者进行比较,因此,不能对无 WD 家族史或家系中先证者已死亡的可疑 WD 患者进行诊断,在 WD 基因克隆后已较少应用。

2007 年,Gupta 等^[8]选择了 4 个 WD 基因的单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphism, SNP)位点对印度人 WD 家系进行检测,在 28 例家系成员中有 25 例患者与上述 4 个 SNP 位点的单倍体型有相关性,其阳性率接近 90%。这为 WD 的基因检测提供了一条新的思路:作为第 3 代分子遗传标记,SNP 具有遗传稳定、重组率低等优点,如果将其与 RFLP 及其他方法结合起来,可大大提高 WD 基因诊断效率^[9]。

2 PCR-SSCP 分析

聚合酶链反应-单链构象多态性(polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP)分析技术最早由 Orita 等^[10]报道,其原理是双链 DNA 经变性后其两条互补单链在非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳的迁移率随其构象改变而发生改变,从而呈现不同的带型。SSCP 的灵敏度较高,在合适条件下最小可以检出一个碱基的差异,故可用于单个碱基缺失、插入或置换的

检测。

1995 年,Thomas 等^[11]首先采用该技术并结合 DNA 测序方法对 58 例欧洲裔 WD 患者各外显子进行检测,共发现了 25 种突变,其中 20 种为新的突变。国内多家单位^[12-14]利用该方法对国人 WD 基因突变进行研究并积累了丰富资料。PCR-SSCP 虽然操作相对简单且费用较低,但由于不能明确突变部位和性质,且易出现假阳性或假阴性结果,目前多用于突变的筛选,其最终结果需经 DNA 测序来证实。

3 PCR-酶切和荧光 PCR 技术

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。Maier^[15]首先采用酶切法对 His1069 Gln 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。国内马少春^[16]、王柠^[17]及作者^[18]等采用该方法对 WD 患者分别进行点突变检测。虽然该方法简便快速且成本较低,但不能检测未知的突变位点,其临床应用受到了一定限制。随着荧光 PCR 技术的出现,已有学者^[19]利用此技术进行 WD 基因突变检测,但是其缺点依然是只能筛查已知突变位点且需要设计针对特异突变的探针。

4 变性高效液相色谱(DHPLC)分析

20 世纪 90 年代末出现的变性高效液相色谱(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)分析技术基于以下原理:部分变性后的变异型和野生型 PCR 产物分别形成同源双链和异源双链,由于二者之间双链溶解温度(Tm)的差异使其在固定相中停留的时间不同,形成不同的色谱峰,从而有效区分野生型与突变型基因^[20]。Vrabelova 等^[21]应用该技术结合 RFLP 和 DNA 测序等技术对 227 例东欧人 WD 患者进行检测,总共发现 40 种突变和 18 种多态,检出率达 80.3%。国内杨静芳等^[22]采用 DHPLC 对 74 例中国 WD 患者进行了检测,共发现 22 种突变和 11 种多态,经 DNA 测序证实其符合率为 100%。作为一种高通量筛选 DNA 序列变异的新技术,DHPLC 具有快速、敏感、准确且经济的特点,但该方法与 SSCP 一样不能明确突变部位和性质,故适用于大样本筛查已知或未知突变。

5 DNA 测序技术

随着分子生物学技术的不断创新,DNA 测序正朝着高速、高通量、自动化的方向发展。由于能明确突变的具体部位和性质,对 WD 基因进行 DNA 序列分析是目前最准确、可靠的方法,是 WD 基因诊断的“金标准”。在应用前述各种技术进行 WD 基因诊断时其结果亦需 DNA 测序来证实。Waldenstrom 等^[23]应用多管并行测

序(manifold sequencing)技术在24个瑞典人WD家系中共发现16种突变,其中10种为新的发现。吴志英等^[9]对65个家系的84例国人WD患者的所有21个外显子进行测序,共检测到18种突变和17种多态,其中包括7种新突变和5种新多态,并认为我国WD基因突变是以少数几个热点突变和广泛存在的罕见突变为特征。但本方法对人员技术水平、设备要求高,难于在一般医院中推广应用;且WD基因全长约80 kb,各外显子突变形式多种多样,对所有外显子逐一进行测序分析花费高、周期长,一般患者难以承受。

6 DNA微阵列技术

近年来,伴随基因组计划出现和发展起来的DNA微阵列技术以其固有的小型化、并行性和高通量等特点,在生物分子信息获取,特别是生物基因组的再测序、基因多态性的信息检测和基因表达监测等方面得到了快速的发展和广泛应用^[10]。由于DNA微阵列技术与WD基因高度遗传异质性的特点相契合,是一种极具潜力的WD基因检测工具。2003年,Baner等^[11]采用等位基因特异性封闭探针(allele-specific padlock probes)结合DNA微阵列技术对75例欧美裔WD患者13个基因突变及多态位点进行检测,经DNA测序结果证实其准确率达100%,首次证实了该技术用于WD基因诊断的可行性。Harmut等开发了一种可以检测60种WD基因突变的DNA微阵列芯片,但仍不能包含一些少见的和新发现的突变^[12]。因此,该技术目前尚处于研究探索阶段,加之建立DNA微阵列技术平台投入不菲,其面向临床应用尚需待以时日。

参考文献

- [1] Ala A, Walker AP, Ashkan K, et al. Wilson's disease. *Lancet*, 2007, 369: 397-408.
- [2] 胡纪源,吕达平,王共强,等.肝豆状核变性的临床误诊研究. *中华医学杂志*, 2001, 81(11): 642-644.
- [3] Roberts EA, Schilsky ML. A practice guideline on Wilson disease. *Hepatology*, 2003, 37(6): 1475-1492.
- [4] Ferenci P. Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing. *Hum Genet*, 2006, 120: 151-159.
- [5] Figus A, Lampis R, Devoto M, et al. Carrier detection and early diagnosis of Wilson disease by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Med Genet*, 1989, 26(2): 78-82.
- [6] 吴志英,王柠,慕容慎行,等.WD基因内部及其两侧翼的微卫星多态快速检出Wilson病基因携带者及症状前患者. *中国神经精神疾病杂志*, 1996, 22(1): 61-63.
- [7] 王丽娟,梁秀龄,刘焯霖,等.中国南方汉人D13S316位点多态性及Wilson病基因诊断的研究. *中国神经精神疾病杂志*, 2000, 26(2): 90-92.
- [8] Gupta A, Maulik M, Nasipuri P, et al. Molecular diagnosis of Wilson disease using prevalent mutations and informative single-nucleotide polymorphism markers. *Clin Chem*, 2007, 53(9): 1601-1608.
- [9] Harmut H, Schmidt J. Introducing single-nucleotide polymorphism markers in the diagnosis of Wilson disease. *Clin Chem*, 2007, 53(9): 1568-1569.
- [10] Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 1989, 5: 874.
- [11] Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, et al. The Wilson disease gene: spectrum of mutation and their consequences. *Nature Genet*, 1995, 9: 210-217.
- [12] 杨任民,范玉新,余龙,等.肝豆状核变性基因的一种新型错义突变. *中华医学杂志*, 1997, 77(5): 344-347.
- [13] 吴志英,慕容慎行,王柠,等.中国人肝豆状核变性基因第14、18和5号外显子突变及多态研究. *临床神经病学杂志*, 1997, 10(5): 259-261.
- [14] 马少春,徐评议,梁秀龄,等.肝豆状核变性8号14号外显子基因突变的检测. *中山医科大学学报*, 1998, 19(1): 14-17, 26.
- [15] Maier DT, Ferenci P, Polli C, et al. Detection of the His1069Glu mutation in Wilson disease by rapid polymerase chain reaction. *Ann Intern Med*, 1997, 127(1): 70-72.
- [16] 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.
- [17] 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. *中华神经科杂志*, 1999, 32(5): 281-283.
- [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. *中国优生与遗传杂志*, 2000, 8(3): 24-25.
- [19] 黄帆,梁秀龄,徐评议,等.用荧光定量PCR对中国人肝豆状核变性进行早期诊断及携带者检测. *中华医学遗传学杂志*, 2001, 18(1): 17-20.
- [20] Weirich G, Cabras AD, Serra S, et al. Rapid identification of Wilson's disease carriers by denaturing high-performance liquid chromatography. *Prev Med*, 2002, 35(3): 278-284.
- [21] Vrabelova S, Letocha O, Borsky M, et al. Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease. *Mol Gen Metab*, 2005, 86: 277-285.
- [22] 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. *中华神经科杂志*, 2006, 39(10): 673-677.
- [23] Waldenstrom E, Lagerkvist A, Dahlman T, et al. Efficient detection of mutations in Wilson disease by manifold sequencing. *Genomics*, 1996, 37: 303-309.
- [24] 吴志英,王柠,林珉婷,等.Wilson病基因全长外显子的突变检测和分析. *中华神经科杂志*, 2001, 34(3): 152-155.
- [25] Lipshutz R, Fodor S, Gingeras T, et al. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet Suppl*, 1999, 21: 20-24.
- [26] Baner J, Isaksson A, Waldenstrom E, et al. Parallel gene analysis with allele-specific padlock probes and tag microarrays. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(17): 103-109.

(2008-11-19收稿 2009-02-04修回)