

应用双重 PCR - SSCP 检测 Wilson 病患者的基因突变

程楠 洪铭范 胡纪源 王训 韩咏竹 杨任民

摘要 目的 探讨应用双重 PCR - SSCP 技术检测 Wilson 病(WD)患者基因突变的可行性,以期建立一种快速、高效的 WD 基因诊断方法。方法 应用双重 PCR 技术扩增 140 例无血缘关系的 WD 确诊患者和 30 例正常对照组的 *ATP7B* 基因第 8、12 外显子并行 SSCP 筛查,对出现异常泳动带型的外显子进行 DNA 测序确定突变位点和形式。结果 正常对照组呈一种泳动带型,66 例患者呈 7 种异常泳动带型,测序结果证实异常泳动带型均发生了突变,突变率占 47.14% (66/140),其中 Arg778Leu/Gln 突变率为 37.14% (52/140),Thr935Met 突变率为 12.86% (18/140)。结论 应用双重 PCR - SSCP 技术检测 WD 基因第 8、12 等外显子是行之有效的办法,且可明显提高检测效率。

关键词 Wilson 病 *ATP7B* 基因 基因突变 双重 PCR - SSCP 基因诊断

Study on the Diagnosis Technology of Wilson's Disease Gene Mutation with Double PCR - SSCP. Cheng Nan, Hong Mingfan, Hu Jiuyan, Wang Xun, Han Yongzhu, Yang Renmin. Institute of Neurology, Anhui College of TCM, Anhui 230031, China

Abstract Objective To establish a fast and effective gene diagnosis method for Wilson's disease(WD) patients by double PCR - SSCP technology. **Methods** We amplified exon8 and exon12 of *ATP7B* gene by double PCR from genomic DNA of 140 unrelated WD patients and 30 normal controls, then used SSCP technology to screen them. At last we identified these patients' mutation features by direct sequencing. **Results** No abnormality shift was found in 30 controls. In 140 patients, we found 7 types of abnormal mobility shifts in 66 cases(47.14%). In subsequent direct sequencing, mutation rate of Arg778Leu/Gln was 37.14% (52/140), and Thr935Met was 12.86% (18/140). **Conclusion** Double PCR - SSCP diagnosis technology is a effective method which can improve diagnosis rate for Wilson disease.

Key words Wilson disease; *ATP7B* gene; Gene mutation; Double PCR - SSCP; Gene diagnosis

Wilson 病(Wilson disease, WD)是一种常染色体隐性遗传铜代谢障碍性疾病,多于青少年期发病,临床以肝硬化、神经/精神症状、角膜 K - F 环等为主要表现,严重者可危及生命^[1]。研究证实,WD 基因定位于 13q14.3,含 22 个外显子,cDNA 全长编码一种 P 型铜转运 ATP 酶(ATP7B),故又称 *ATP7B* 基因^[2,3,4]。到目前为止已发现超过 250 种以上不同形式的突变类型^[5]。国内多家研究单位发现中国人 WD 患者 *ATP7B* 基因第 8、12 外显子的突变率较高,分别为第 1、第 2 突变热区^[6,7]。但目前研究均为单个扩增各外显子进行检测,制约了研究效率,本研究尝试采用双重 PCR - SSCP 技术同时扩增第 8、12 外显子行 SSCP 检测,并经 DNA 序列测定来证实其突变形式和位点,以期建立一种快速、高效的 WD 基因诊

断方法。

对象与方法

1. 研究对象:(1)正常对照组:30 例正常对照者均为无血缘关系的健康志愿者,其中男性 18 例,女性 12 例,平均年龄(20.5 ± 6.8)岁,血清铜蓝蛋白及铜氧化酶等铜代谢检查均正常。(2)研究组:140 例来自不同家系的 WD 患者均为本所 WD 专科病房 2002 年 10 月~2005 年 12 月间的住院患者,其中男性 72 例,女性 68 例,平均年龄(19.7 ± 8.96)岁,平均发病年龄(16.1 ± 8.1)岁。全部病例均符合 WD 的诊断标准。

2. 研究方法:(1)DNA 制备:取外周静脉血 10ml,加 3mlACD 抗凝,常规分离白细胞,然后用盐析法提基因组 DNA,具体操作按文献进行。(2)PCR 扩增:8 外显子(E8)和第 12 外显子(E12)引物按照 Thomas 等报道的引物序列由上海基康公司合成。目的片段 E8 为 296bp, E12 为 229bp。在 50μl 反应体系中,基因组 300ng,引物各 0.5μmol/L, dNTP200μmol/L, TaqDNA 聚合酶 1.0U (Promega 公司),反应在 MJ research PCR(PE 公司)自动热循环仪中进行。扩增条件为:97℃ 预变性 5min,93℃ 变性 45s,58℃ 退火 45s,72℃ 延伸 90s,共 30 个循环后,72℃ 延伸 10min 结束反应,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。(3)SSCP 和银染:PCR 扩增产物 8μl 与等体积加样缓冲液混合,98℃ 变性 6min,立即冰浴骤冷,8% 非

基金项目:安徽省教育厅自然科学研究项目(2000j1143);安徽省临床医学重点学科科学技术进步项目(2004z208)

作者单位:230031 合肥,安徽中医学院神经病学研究所(程楠、胡纪源、王训、韩咏竹、杨任民);广东药学院附属医院(洪铭范)

变性聚丙烯酰胺凝胶 25℃,500V 电泳 4~5h,电泳结束后用常规方法固定、银染、显色和拍照分析结果。(4)DNA 测序:PCR 产物用 Qiaquick spin column(Qiagen 公司)纯化,测序工作委托上海生工公司进行。

结 果

1. PCR 结果:见图 1。

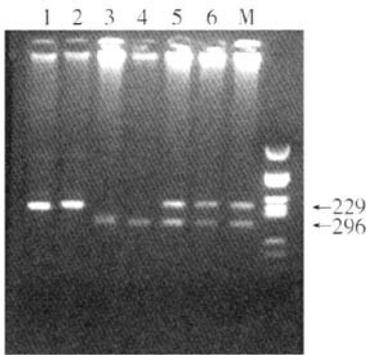


图 1 PCR 产物 1%琼脂糖电泳结果
1,2. E8; 3,4. E12; 5,6,7. E8,12;
M. PGEM 7ZF(+)DNA/Hae III 标记

2. PCR - SSCP 银染结果:正常组 SSCP 分析显示 E8 和 E12 的 PCR 产物各呈现两条相同的迁移带型, E8,12 的双重 PCR 产物呈 4 条相同的迁移带型(图 2)。140 例 WD 患者行 SSCP 筛选时,发现有 7 种异常带型(图 3),共 66 例(66/140),占 47.14%,分别命名为 A、B、C、D、E、F、G 型,其中 A 型 36 例,B 型 7 例,C 型 12 例,E 型 3 例,F 型 6 例,G 型 2 例,各带型与正常组对照提示 E8 有 52 例异常,E12 有 18 例异常,其中 E8,12 均有异常者 4 例。

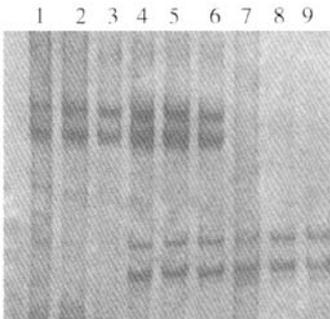


图 2 正常组 E8、E12、E8,12 SSCP 银染结果
1,2,3. E8;7,8,9. E12;4,5,6. E8,12

3. 测序结果:对正常对照者及异常泳动带型的 WD 患者 PCR 产物进行 DNA 序列测定,并与 GENE-

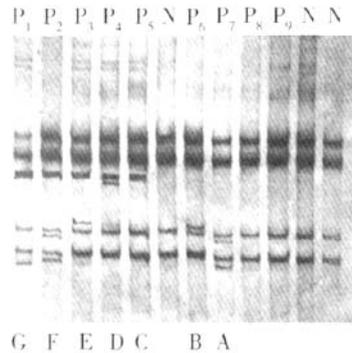


图 3 正常组与 WD 患者 E8,12 SSCP 银染结果
(N. 正常对照;P1~P9. WD 患者;A~G. 异常迁移带型)

BANK 序列进行对照,结果发现正常对照者的 DNA 序列与 GENE BANK 序列一致,异常泳动带型的患者 DNA 序列分别出现 Arg778Leu/Gln 和 Thr935Met 错义突变,其中 Arg778Leu/Gln 突变率为 37.14%(52/140),Thr935Met 突变率为 12.86%(18/140)。E8 测序结果如封三彩图 2 所示,E12 测序结果已于另文发表。

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。因此,早期诊断尤其是对有先证者的家系成员进行症状前期诊断对本病患者的预后至关重要。

虽然典型的 WD 患者根据家族史、肝脏和(或)脑症状、角膜 K-F 环及铜生化等检查不难诊断,但角膜 K-F 环在肝型患者中其阳性率仅为 50%~60%,即使脑型患者仍有 5%为阴性,而在部分慢性胆汁郁积性肝炎和原发性硬化性胆管炎的患者中却可见到 K-F 环;国外报道的一组 55 例确诊的 WD 患者中有 12 例血清铜蓝蛋白(CP)水平正常且无 K-F 环;在有先证者的家系成员中,杂合子与先证者之间存在部分重叠现象,约有 20%的杂合子可以出现血清 CP 水平减低。因此,临床常规检查对 WD 患者及其家系成员进行早期诊断特别是症状前期和产前诊断较为困难,而基因诊断方法可以对本病进行产前或症状前期诊断。

早期曾采用限制性片段长度多态性(RFLP)、扩增片段长度多态性(AFLP)及 PCR 扩增 WD 基因内部及其毗邻的微卫星短串联重复序列等连锁分析方法(STR),对有先证者的 WD 家系成员进行产前和症状前期的基因诊断。但这些方法均需与同一家系中

的先证者做比较分析,因此不能对无WD家族史或家系中先证者已死亡的可疑WD患者进行检测。

在明确WD基因各个外显子的突变规律后可以针对其高频基因突变位点进行酶切检测。Maier首先采用酶切法对His1070Gln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、王柠及作者等采用该方法对WD患者分别进行点突变检测。但该方法仅能检测单个酶切位点的突变,由于ATP7B基因突变形式较多,该法检测效率较低,临床应用受到了一定限制。

自20世纪90年代以来,国内外学者广泛应用PCR-SSCP和DNA测序技术检测WD的基因突变,并取得了丰硕成果。目前国内外学者对WD基因的研究均采用单个扩增各外显子的方法进行检测,由于WD基因有22个外显子,其研究效率受到了明显制约,故很难在临床中推广应用。基于此,有学者提出采用多重PCR技术扩增不同人种的突变热区进行基因突变的检测。本研究前瞻性地采用双重PCR-SSCP技术对WD基因的突变进行筛选,测序表明异常泳动带型均发生了突变,突变率占47.14%(66/140),其中Arg778Leu/Gln突变率为37.14%(52/140),Thr935Met突变率为12.86%(18/140),采用本方法检测的结果与国内外学者采用其他方法检测的结果基本一致,但以往的方法检测效率较低,而本检

测方法可在一天内完成,且检出率超过半数,因此为进一步建立快速、高效的WD基因诊断检测方法提供了依据。我们将在此基础上进一步改进应用多重PCR-SSCP技术检测WD基因突变的研究,以期对WD症状前期患者的早期诊断和该病的产前诊断提供快速的成熟的基因诊断方法。

参考文献

- 1 Ala A, Walker AP, Ashkan K, et al. Wilson's disease. The Lancet, 2007, 369: 397-408
- 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. Nature Genet, 1993, 5: 327-337
- 3 Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. Nature Genet, 1993, 5: 344-350
- 4 Petrukhin K, Fischer SG, Pirastu M, et al. Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. Nature Genet, 1993, 5: 338-343
- 5 Walshe JM. History of Wilson's Disease: 1912 to 2000. Movement Disorders, 2006; 21(2): 142-147
- 6 许月芳, 范玉新, 余龙, 等. PCR直接测序在Wilson病基因第8号外显子检出一个突变热点. 中华医学遗传学杂志, 1998, 15: 284-287
- 7 WU Zhiying, WANG Ning, MURONG Shenxing, et al. Identification and analysis of mutations of the Wilson disease gene in Chinese population. Chinese Medical Journal, 2000, 113(1): 40-43

(收稿:2008-06-02)

耐受性树突状细胞过继转移诱导大鼠移植肾耐受的研究

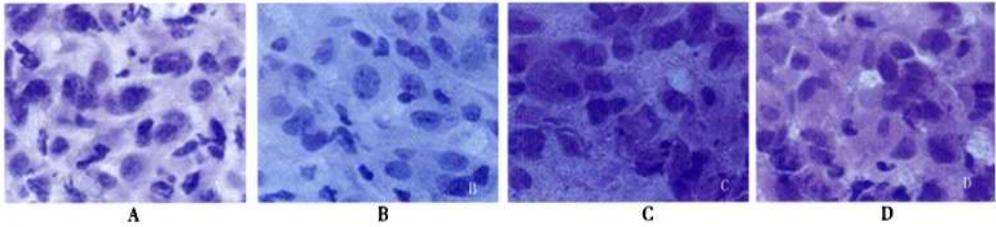
寇乐乐 王禾 于磊 武国军 刘飞 张更 武斌 麦海星

摘要 目的 建立耐受性树突状细胞(DC)过继转移诱导肾移植免疫耐受的动物模型,以探讨肾移植后的免疫耐受情况。方法 体外分离和纯化供体SD大鼠耐受性树突状细胞,经过处理后注入受体Wistar大鼠的门静脉内,同时进行肾移植,于3、5、7、9、11、和13天进行肾组织学病理检查,MTT法测定大鼠脾淋巴细胞增生反应。结果 肾移植后单纯移植组急性排斥反应发生时间为(4.69±1.26)天;IL-10 DC组(实验组)(10.69±1.63)天,实验组平均成活时间与对照组平均成活时间差异显著(P<0.01)。结论 门静脉内注射供体耐受性树突状细胞可诱导肾移植免疫耐受,并且这种耐受具有特异性。

关键词 肾移植 免疫耐受 动物模型

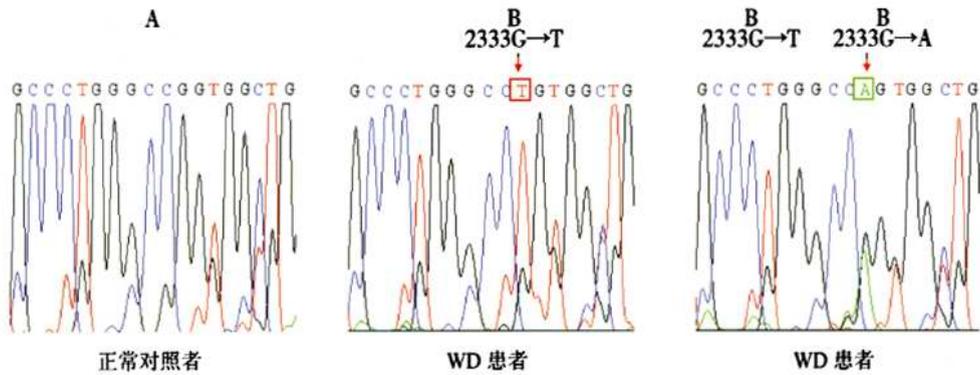
Study on Immunotolerance of Kidney Graft Induced by Tolerant Dendritic Cells. Kou Lele, Wang He, Wu Guojun, Zhang Geng, Wu Bin, Mai Haixing. Xijing Hospital, Fourth Military Medical University Urology, Shanxi 710033, China

Abstract Objective To study the immune tolerance effect after renal transplantation, an animal model of tolerant dendritic cell adaptive transfer renal transplantation was constructed. **Methods** Tolerant Dendritic cells from SD rats were separated and purification in vitro, after a series of procedures, the Dendritic cells were administrated in the portal vein of Wistar rats, then conduct the operation of re-



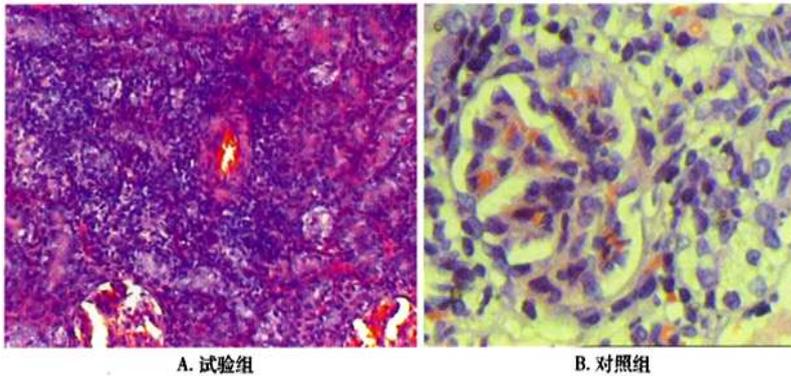
彩图1 肿瘤组织切片 H. E 染色结果 (40 ×)

A 为 PBS 阴性对照 (PBS) 组肿瘤组织染色结果, B 为 300 μg/kg 实验组肿瘤组织染色结果, C 为 1000 μg/kg 实验组肿瘤组织染色结果, D 为阳性对照组 (紫杉醇) 肿瘤组织染色结果 (见正文第 35 页)



彩图2 *ATP7B* 基因第 8 外显子的序列分析结果

A. 正常对照者 DNA 测序结果; B. 第 778 密码子由 CGG→CTG, 导致发生 Arg778Leu 错义突变;
C. 第 778 密码子由 CGG→CAG, 导致发生 Arg778Gln 杂合错义突变 (见正文第 41 页)



彩图3 试验组及对照组术后病理检查结果

(见正文第 44 页)