

肾上腺脑白质营养不良分子诊断中假基因干扰的排除

黄梁许 郑德柱 曾 健 辛 娜 兰风华*

(南京军区福州总医院全军医学检验中心, 福州 350025)

摘要 在基因组 DNA 水平, 应用基因突变分析的方法对肾上腺脑白质营养不良进行分子诊断十分重要。由于人体内存在多个肾上腺脑白质营养不良假基因的拷贝, 应用 PCR-RFLP 和 PCR 产物直接测序等常规方法难以检测一部分的基因突变。为了排除基因组 DNA 中假基因的干扰, 利用扩增阻滞突变系统, 成功地分析了一个肾上腺脑白质营养不良 (R617G 突变) 家系成员的基因型。结果表明, 扩增阻滞突变系统是排除假基因干扰的有效方法之一。

关键词 肾上腺脑白质营养不良, 分子诊断, *ABCD1* 基因, 假基因, 扩增阻滞突变系统

学科分类号 R596.2

肾上腺脑白质营养不良 (adrenoleukodystrophy, ALD) 是一种主要侵犯脑白质、肾上腺等器官的 X-连锁隐性遗传病, 呈进行性发展, 预后不良, 尤以儿童大脑型为甚——发病后的平均生存时间仅为 3 年左右。该病的致病基因定位于 Xq28, 由 *ABCD1* 基因突变引起。分子诊断作为 ALD 诊断的重要组成部分, 通过 RT-PCR 途径, 能准确查出 ALD 患者的基因突变, 并进一步确定 ALD 家系其他未发病成员的基因型, 消除健康成员的心理负担。但由于人体基因组 DNA 中存在多个拷贝的 *ABCD1* 假基因, 使得难以在基因组 DNA 水平, 通过 PCR-RFLP 和 PCR 产物直接测序进行突变检测^[1]。自 1989 年扩增阻滞突变系统 (amplification refractory mutation system, ARMS) 问世以来, 已被用来检测多种基因的突变, 获得良好效果^[2]。我们应用此法, 成功排除了 ALD 分子诊断中假基因的干扰, 提供了一种简单、快速、准确检测 *ABCD1* 基因突变的新方法。

1 材料和方法

1.1 研究对象和标本制备

ALD 家系的患者经临床诊断为儿童大脑型, 由于患者已死亡, 只能采集患者父母的血样间接诊断。对患者母亲的外周血总 RNA 进行 RT-PCR 和 PCR 产物直接测序, 发现其中一个 *ABCD1* 等位基因上存在 R617G 突变 (C→G 改变), 所有家系成

员和无关对照均采取外周血 2 ml, 按试剂盒的说明, 提取基因组 DNA。

1.2 引物设计

为了进一步证实 R617G 突变, 先在基因组 DNA 水平进行限制性内切酶分析和 PCR 产物直接测序, 但效果不理想, 因此采用 ARMS 的 C、D 两个系统对患者父母和无关对照的基因组 DNA 进行分析。为了提高 ARMS 引物的特异性, 将紧邻 3' 端的碱基故意错配 (划线的碱基), C 系统的上游引物 (E8-40F) 的序列为 5' GTGCTGGTG-GAACTGAGCCAAGA 3', 为公用引物; 下游引物 (E8C-W3、E8C-M3) 序列分别为 5' TGCTCA-CCTGTGGTAGAACATGAG 3'、5' TGCTCACCTG-TGGTAGAACATGAC 3', 分别为正常引物和突变引物, 预期扩增长度为 132 bp。D 系统的上游引物 (E8D-W3、E8D-M3) 序列分别为 5' GAAGCA-GAGAATCGGCATGGCAG 3'、5' GAAGCAGAGAAT-CGGCATGGCAG 3', 分别为正常引物和突变引物; 其下游引物 (IV8146R) 的序列为 5' GGGG-TCCGGGCGGAGAGGAGAGTC 3', 为公用引物, 预期扩增长度为 185 bp。同时扩增 *ABCD1* 基因外显子 1 的部分序列作为对照, 引物 (EI501F、EI813R) 序列分别为 5' GGCCACGCGTACCGCC-

* 通讯联系人。

Tel: 0591-2859617, 3785575, E-mail: hlhtiger@163.com

收稿日期: 2003-12-31, 接受日期: 2004-02-28

TCTACTT 3′、5′ CTCTGCCACCAGCTCCCCGAAC-TT 3′, 预期扩增长度为 313 bp.

1.3 PCR 反应

所有反应均是在 PE 2400 型 PCR 扩增仪上进行. 在总反应体积 25 μl 中, 含基因组 DNA 50 ng, 引物各 15 pmol、4 种 dNTP 各 0.2 mmol/L、Mg²⁺ 为 1.5 mmol/L、Taq 酶 2.5U (Promega 公司). 94℃ 预变性 4 min 后, 按下列参数: 94℃ 30 s, 66℃ 30 s (C 系统退火温度为 60℃), 72℃ 30 s, 共 35 个循环, 最后一个循环 72℃ 延伸 5 min. PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶上电泳后, 在 Flour-S 成像系统上成像.

2 结 果

2.1 ABCD1 基因突变的检出

对患者母亲和无关对照 cDNA 的 PCR 产物分别进行正反向测序 (共测序 3 次). 结果显示, 患者母亲 ABCD1 基因上一个等位基因第 617 位密码子发生了 CGC→GGC 改变, 使原来编码的精氨酸被甘氨酸取代 (R617G); 另一个等位基因未发生突变. 无关对照的 ABCD1 基因编码序列与 GenBank 登录的参考序列完全一致.

2.2 基因组 DNA 的 PCR-RFLP

对患者父母和对照的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 其片段大小为 271 bp, 并进行限制性内切酶 (*Aci* I) 分析, 结果见图 1 所示, 患者父母和对照的酶切图谱完全一致, 出现 75 bp 和 162 bp 两个片段 (34 bp 因片段太小无法见到), 患者母亲并未出现突变的等位基因应有的 237 bp 片段. 将他们的 PCR 产物纯化后, 直接进行 DNA 测序, 结果未发现 R617G 突变 (结果未显示).

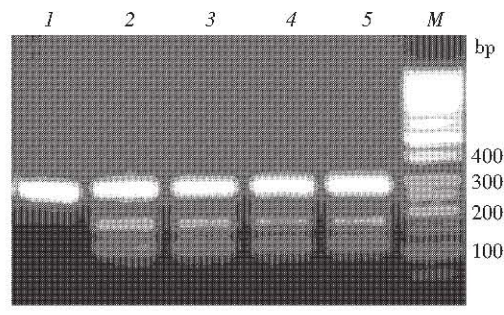


Fig. 1 *Aci* I digestion of genomic DNA PCR product
1: The genomic DNA PCR product before digestion; 2~5: genomic DNA PCR product from control 1, control 2, mother of the patient and father of the patient after digestion; M: DNA marker.

2.3 基因组 DNA 的 ARMS 分析

应用 ARMS 的两个系统对 R617G 突变家系成员和无关对照的基因组 DNA 进行分析, 在 C 系统中, 患者母亲、父亲和 2 个对照的正常引物均扩增出 132 bp 条带, 同时上述 4 者的突变引物亦均扩增出 132 bp 条带, 只是患者母亲的条带亮度高于其余 3 者, 除 M 外其他均扩增出 313 bp 的对照 (图 2). D 系统中, 可见无关对照、患者父亲和母亲的正常引物均扩增出 185 bp 条带, 同时患者母亲还扩增出特异性条带 (图 3-6), 除 M 外其他均扩增出 313 bp 的对照 (图 3). 重复 3 次电泳结果完全相同, 10 个无关对照的结果亦完全一致.

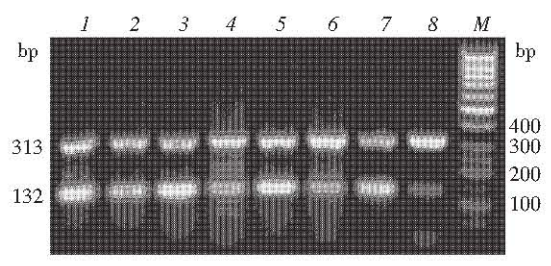


Fig. 2 Electrophoretic pattern of ARMS (C system)
The odd numbers indicate PCR with wild-type primer; the even numbers indicate PCR with mutant primer. 1, 2: Mother of the patient; 3, 4: Father of the patient; 5, 6, 7, 8: Controls; M: DNA marker.

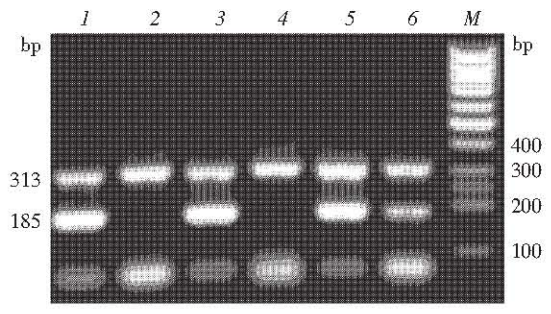


Fig. 3 Electrophoretic pattern of ARMS (D system)
The odd numbers indicate PCR with wild-type primer; the even numbers indicate PCR with mutant primer. 1, 2: Control; 3, 4: Father of the patient; 5, 6: Mother of the patient; M: DNA marker.

3 讨 论

ALD 是一种遗传性代谢疾病, 在男性人群中的发病率为 1:20 000. ABCD1 基因全长约 21 kb, 编码 745 个氨基酸残基组成的蛋白质 (ALD protein, ALDP), ALDP 属于 ATP-结合盒 (ATP-binding cassette, ABC) 超家族中 D 亚家族, 故又

称为 *ABCD1* 蛋白^[3]. 自 1993 年应用基因突变分析检测 *ABCD1* 基因突变以来, 大量的突变被检测出来^[4]. 本文中, 由于患者 *ABCD1* 基因上第 617 位密码子发生 CGC→GGC 改变, 使得原来的精氨酸被甘氨酸取代 (R617G 突变). 从基因结构上看, 该突变定位于 *ABCD1* 基因的外显子 8; 从 *ABCD1* 蛋白的结构来说, 该突变位于 ATP 结合区功能结构域.

应用基因突变分析检测 *ABCD1* 基因突变位点, 不仅可确定 ALD 患者的基因型, 且可确定 ALD 家系其他成员的基因型, 消除正常成员的心理负担. 但 Kok 等^[5]检测 *ABCD1* 突变时发现, 由于体内存在和 *ABCD1* 基因 3'端相似的序列, 使用 PCR 技术分析在这些区域的突变时, 往往会被干扰, 因此提出了 *ABCD1* 假基因这个问题. Braun 等^[6]研究认为, 在基因组 DNA 水平, 应用 PCR 技术、DNA 印迹方法检测突变, 往往出现让人无法解释的结果, 其原因是存在假基因 (和 *ABCD1* 基因有 93% 核苷酸序列相似性), 其跨度从 *ABCD1* 基因外显子 7 到外显子 10. Eichler 等^[7]进一步研究发现, 人类 *ABCD1* 基因的外显子 7 到外显子 10, 其基因组序列和人类常染色体的 2p11、10p11、16p11、22q11 区域相比, 存在 92% ~ 96% 的核苷酸序列相似性, 并且认为常染色体上的假基因来源于 X 染色体, 这种现象是在人类进化过程中产生的. 因此, Lachtermacher 等^[1]认为, 应用基因组 DNA 进行突变分析时, 应选择适当的检测方法, 防止假基因干扰 *ABCD1* 基因 3'端上的突变检测.

ARMS 又称为等位基因特异性扩增 (allele specific amplification, ASA) 或特异性等位基因 PCR 扩增 (PCR amplification of specific allele, PASA). 它的基本原理是, PCR 扩增时引物是否能延伸, 主要取决于引物 3'端的 1 ~ 2 个碱基是否与模板配对, 若不配对则引物不能延伸, 故只要能设计适当的引物, 则可以区别正常和突变的 DNA 序列. Newton 等^[2]认为 C/T、A/A、T/T (引物/模板) 的错配较 G/T、T/G、C/A 或 A/C 更能有效阻止延伸. 同时还指出, 离 3'端 3 个碱基处增加一个错配碱基能更加有效阻断引物的延伸. 而向光大

等^[8]认为, 在紧邻 3'端引入一个故意错配的碱基, 可增加 ARMS 引物的特异性. 本研究共设计 2 个系统 (C、D 系统), 分别设计不加故意错配碱基、离 3'端 3 个碱基处增加一个错配碱基、在紧邻 3'端引入一个故意错配的碱基等 12 对引物分别检测正常和突变基因, 但只有 D 系统的紧邻 3'端引入一个故意错配碱基的引物 (E8D-W3/M3) 取得令人满意的结果, 其他的引物均无法区别正常和突变基因.

应用 ARMS 法检测 *ABCD1* 基因突变的意义在于: 快速和简便, 还可以排除假基因对 *ABCD1* 基因突变检测的干扰. 只要引物设计适当, 就可迅速证实 *ABCD1* 基因上的突变位点. 因此, ARMS 不失为检测 *ABCD1* 基因突变 (点突变) 的快速而准确的方法之一.

参 考 文 献

- 1 Lachtermacher M B, Seunanez H N, Moser A B, *et al.* Determination of 30 X-linked adrenoleukodystrophy mutations, including 15 not previously described. *Hum Mutat*, 2000, **15** (4): 348 ~ 353
- 2 Newton C R, Graham A, Heptinstall L E, *et al.* Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucl Acid Res*, 1989, **17** (7): 2503 ~ 2516
- 3 Mosser J, Douar A M, Sarde C O, *et al.* Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature*, 1993, **361** (6414): 726 ~ 730
- 4 Krasemann E W, Meier V, Korenke G C, *et al.* Identification of mutations in the ALD-gene of 20 families with adrenoleukodystrophy/adrenomyeloneuropathy. *Hum Genet*, 1996, **97** (3): 194 ~ 197
- 5 Kok F, Neumann S, Sarde C O, *et al.* Mutational analysis of patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mutat*, 1995, **6** (2): 104 ~ 115
- 6 Braun A, Kammerer S, Ambach H, *et al.* Characterization of a partial pseudogene homologous to the adrenoleukodystrophy gene and application to mutation detection. *Hum Mutat*, 1996, **7** (2): 105 ~ 108
- 7 Eichler E E, Budarf M L, Rocchi M, *et al.* Interchromosomal duplications of the adrenoleukodystrophy locus: a phenomenon of pericentromeric plasticity. *Hum Molec Genet*, 1997, **6** (7): 991 ~ 1002
- 8 向光大, 夏邦顺, 何艳忠, 等. 采用 ARMS 分析口腔脱落细胞 ApoE 基因型. *上海医学检验杂志*, 1999, **14** (1): 7 ~ 9
Xiang G D, Xia B S, He Y Z, *et al.* *Shanghai J Med Lab Sci*, 1999, **14** (1): 7 ~ 9

Avoiding The Interference of *ABCD1* Pseudogenes in The Molecular Diagnosis of X-linked Adrenoleukodystrophy

HUANG Liang-Hu, ZHENG De-Zhu, ZENG Jian, XIN Na, LAN Feng-Hua *

(PLA Center for Laboratory Medicine, Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350025, China)

Abstract The molecular diagnosis for X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) using mutational analysis at genomic DNA level is important. However, some *ABCD1* gene mutations were difficult to detect by conventional methods, such as PCR-RFLP and the direct DNA sequencing of PCR product, because of the interference of the pseudogenes. To avoid the interference, genomic DNA from the family members with an adrenoleukodystrophy gene mutation (R617G mutation) was analyzed by amplification refractory mutation system. The results indicated that amplification refractory mutation system is one of the effective methods for avoiding the interference of the pseudogenes in detecting *ABCD1* gene mutations.

Key words adrenoleukodystrophy, molecular diagnosis, *ABCD1* gene, pseudogene, amplification refractory mutation system

* Corresponding author.

Tel: 86-591-2859617, 3785575, E-mail: hlhtiger@163.com

Received: December 31, 2003 Accepted: February 28, 2004