

在中国人PAH基因中发现一种新的中性突变以及它在苯丙酮尿症产前诊断中的作用

黄淑帧 周霞娣 任兆瑞 曾溢滔

(上海市儿童医院医学遗传研究室, 上海 200040)

胡 流 清

(美国贝勒医学院细胞生物学系)

摘 要

本文在对一例中国 PKU 患者的 PAH 基因进行碱基顺序分析时发现了一种新的中性突变或顺序多态位点: 11 外显子第 399 密码子 GTA (Val)→GTT(Val). 应用 PCR 体外扩增和寡核苷酸杂交技术对 100 个正常人和 39 个 PKU 患者进行分析, 发现此顺序多态性在正常和异常 PAH 基因中的分布频率分别为 0.005 和 0.090, 存在一定的差异性. 该顺序多态可作为一种“遗传标记”成功地对一例不能用 RFLP 连锁分析作完全诊断的 PKU 高危胎儿进行了产前诊断.

关键词: 苯丙酮尿症, 苯丙氨酸羟化酶, PAH 顺序多态性, 产前诊断

苯丙氨酸羟化酶 (PAH, EC 1.14, 16.1) 是人体肝脏中具有重要功能的酶蛋白. 它催化苯丙氨酸变为酪氨酸的代谢反应. PAH 的缺乏, 会导致一种严重的遗传性氨基酸代谢病——苯丙酮尿症 (phenylketonuria, PKU), 患儿出生后若不及早治疗便出现严重的智力发育障碍^[1]. 开展对 PAH 基因的研究, 不仅有助于在分子水平上阐明 PKU 发病的机理, 而且对该病的产前诊断具有重要的理论和实际意义.

PAH 基因存在于人类第 12 号染色体上 (12 q²²→12 q^{24.1})^[2], 它含有 13 个外显子编码苯丙氨酸羟化酶 451 个氨基酸的 DNA 序列. 在长达 90 kb PAH 基因顺序中, 除已鉴定出某些点突变会导致 PKU 外^[3,4], 还发现一些碱基替代为不引起基因功能改变的中性突变, 其中一些中性突变因改变了某种限制酶的识别顺序而成为限制酶多态性位点^[5], 而另一些属于不更改目前已知的任何限制酶的切点的顺序多态位点 (sequence polymorphism sites)^[6,7]. 我们在对中国人的 PAH 基因的研究中, 发现了一个新的顺序多态位点中性突变, 位于第 11 外显子的第 399 位密码子由 GTA (Val) 变为 GTT (Val). 本文报道这一研究结果并讨论这

一中性突变在 PKU 产前诊断中的作用。

一、材料和方法

1. 分析对象

正常人血标本采自上海市儿童医院的 100 名健康工作人员。PKU 血标本采自该院医学遗传研究室经临床和生物化学检查确诊的 39 名经典型 PKU 病人,从白细胞中提取基因组 DNA。

2. 实验方法

(1) PAH 基因的 RFLP 分析 5 μ g 基因组 DNA 分别用限制酶 Bgl II, EcoR I, EcoR V, Hind III Xmn I, Msp I 或 Pvu II 各 10 单位进行消化,经琼脂糖凝胶电泳, Southern 印迹转移后与 32 P 标记的人类 PAH cDNA 探针杂交和作放射性自显影,制作基因图谱^[8]。

(2) 基因组文库的构建和 PAH 基因顺序分析 从一例 PAH 的 RFLP 单体型为 IV 型纯合子的中国 PKU 患者的外周血白细胞中抽提基因组 DNA,用 EcoR I 消化,经蔗糖密度梯度分离,获得大小为 9—20 kb 的 DNA 片段,其中包含了 PAH 基因第 9—13 外显子的片段即 G 片段^[9],用 λ charon 35 作载体构建基因文库^[3,7],然后用人类 PAH 全长 cDNA 以及 5' cDNA 和 3' cDNA 探针筛选重组克隆,得到含有 PAH 基因外显子的阳性克隆,经 Hind III 消化后,得到 0.6 kb, 2.0 kb 和 5.4 kb 的 PAH 基因片段,取 5.4 kb 的 DNA 片段插入 M13mp18 按 Sanger 等^[9]介绍的双脱氧核苷酸链末端终止法测定 PAH 基因片段的碱基顺序。

(3) 正常中国人及 PKU 患者中性突变的鉴定 共分析 200 个正常 PAH 基因(分别来自 100 名正常人)和 78 个异常 PAH 基因(分别来自 39 名 PKU 患者),取 0.5 μ g 的 DNA 按文献[10—12]在 Taq 聚合酶催化下通过聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 进行 DNA 扩增, PCR 的一对寡核苷酸引物为 5'-CTGATCCTGATTAAACAGTG-3' 和 5'-AGTCCACTCTCCTGGAACCA-3' 用以引导合成 PAH 基因第 11 外显子 3' 端和第 11 内含子 5' 端共 266 bp 的 DNA 顺序,其中包括第 399 密码子, DNA 双链于 95℃ 变性 7 min, 然后进入 PCR 循环: 55℃ 复性 30 s, 65℃ 延伸 1min, 90℃ 变性 30 s, 共 30 个周期, DNA 扩增终止于 65℃。取 10 μ l 扩增产物作 2% 琼脂糖凝胶电泳 (40 mA 30 min), 溴化乙锭染色后在紫外灯下观察扩增的 DNA 片段。合成一对特异于第 399 密码子的寡核苷酸探针: 5'-GGAGAAAGT $\overset{\text{A}}{\underset{\text{T}}{\text{T}}}$ AGGTGAGGTG-3'。用 [γ - 32 P] ATP 作 5' 末端标记, 取 2.5 μ l DNA 扩增样品与 10 μ l 0.4 N NaOH/25 mmol/L EDTA 液混匀后,直接点加于 Zeta probe 尼龙膜上,在 5 $\times$ SSC/5 $\times$ Denhardt's/0.1% SDS 的缓冲液中于 42℃ 预杂交 30 min, 然后与已标记的寡核苷酸探针在相同的温度和缓冲液中杂交 2 h, 杂交后的尼龙膜在室温下用 6 $\times$ SSC 溶液洗涤 2 次,然后在 60℃ 下用 6 $\times$ SSC 溶液漂洗 20 min, 洗膜后, 杂交膜置 -20℃ 下行放射自显影 (4 h)。

二、结 果

含有该例 RFLP 单体型为 IV 型纯合子的中国 PKU 患者的 PAH 基因 G 片段 (包括

第9—13外显子)的阳性克隆,经 Hind III 消化生成的 5.4 kb 片段测序时,发现第11外显子中第399位密码子的第3个碱基存在顺序多态性(中性突变),由 CTA (Val)→GTT (Val) (图1)。

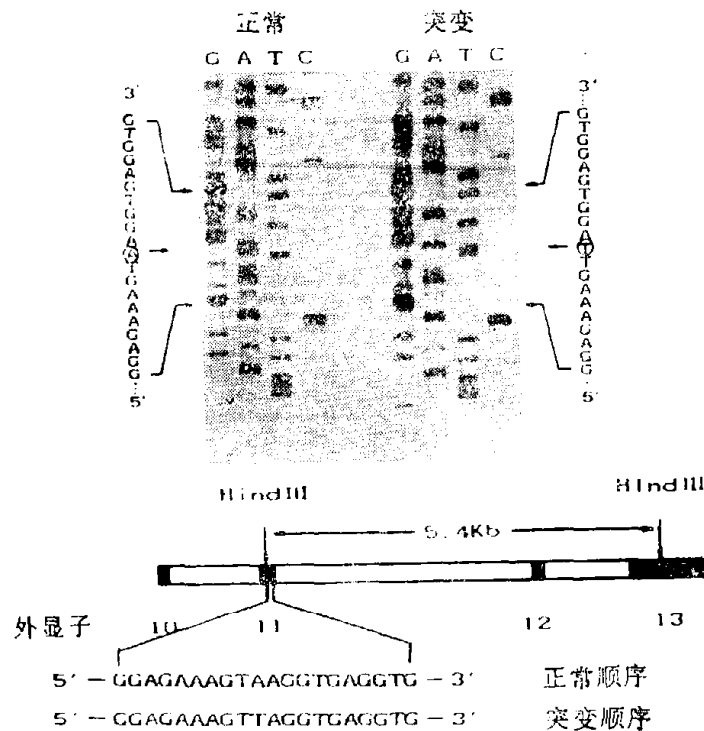


图1 双脱氧核苷酸链末端终止法测定 PAH 基因 5.4kb 的 Hind III 片段的碱基顺序
(正常顺序和突变顺序分别表示正常和具有中性突变位点的第11外显子的部分碱基顺序的测定结果。密码子399的第3个碱基由 A→T)

为了进一步探讨这一新的顺序多态性位点在中国人 PAH 基因的分布频率,应用 PCR/等位基因特异性寡核苷酸 (allele-specific oligonucleotide, ASO) 探针杂交法直接对正常人

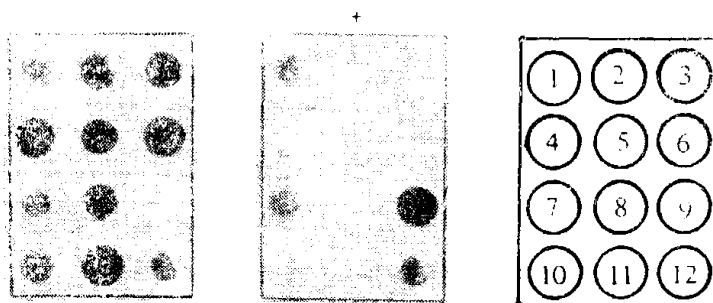


图2 用 ASO 探针检测 PAH 399 A→T 突变
(+示具有顺序多态性的 ASO 探针,
-示正常核苷酸序列的 ASO 探针,
1—6 为扩增的正常人 PAH DNA 标本,
7—12 为扩增的 PKU 患者的 PAH DNA 标本,
1,7,12 为 PAH 399 A→T 突变杂合子,
9 为 PAH 399 A→T 突变纯合子)

和 PKU 患者的 PAH 基因进行了检测(图 2), 在所分析的 200 个正常 PAH 基因中只有 1 个具有这一中性突变 (0.5%), 而在 78 个异常 PAH 基因中, 却有 7 个具有这一中性突变 (9.0%).

三、讨 论

本文报道的这一中性突变, 即 PAH 基因第 11 外显子第 399 密码子由 GTA (Val) → GTT (Val), 是在对 1 名 RFLP 单体型 IV

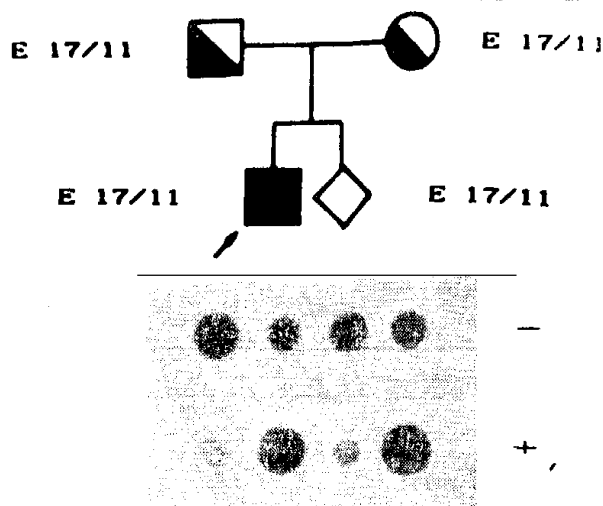


图 3 以 PAH 399 A→T 突变作为遗传标记, 应用 PCR/ASO 探针法对有 PKU 风险的胎儿进行产前诊断

(+, -号说明同图 2. E 示 EcoR I 酶切片段, / 示 PKU 患儿, ◇ 示产前诊断胎儿)

型纯合子的中国 PKU 病人作 PAH 基因顺序测定时首次被发现的, 这一中性突变并不更改任何限制酶的识别顺序, 属于一种顺序多态性。根据本文的分析资料, 在 200 个中国正常 PAH 基因中, 该顺序多态的频率为 0.005, 在 78 个中国 PKU 患者的 PAH 基因中, 它的频率为 0.090, 提示这一顺序多态在正常和异常的 PAH 基因之间具有一定的差异, 可能存在连锁不平衡现象。

这一新发现的中性突变对 PKU 的产前诊断也具有理论和实际应用价值。目前 PKU 的产前诊断一般可有两种方法: (1) 对于 PAH 基因分子突变类型已经清楚的家庭, 可用特异的寡核苷酸探针直接检测胎儿的基因; (2) 对于突变类型尚未清楚的产前诊断家庭, 若 PAH 基因存在 RFLP 多态信息的话, 则可通过 RFLP 分析或扩增 DNA 的限制酶谱分析对有 PKU 风险的胎儿进行产前诊断。

然而在白种人中已鉴定出来的两种导致 PKU 的 PAH 基因突变^[5,6]: 第 12 内含子 5' 端相应于 mRNA 剪切位点 GT→AT 和第 408 密码子 C→T, 在中国人 PKU 患者中迄今未被发现, 故应用特异于这两种分子突变的寡核苷酸探针在中国人中进行 PKU 产前诊断受到限制。在另一方面, 根据我们对中国人 PAH 基因的限制酶位点多态性分析资料, 虽然可通过 RFLP 连锁分析对 80% 左右的中国 PKU 家庭进行产前诊断^[8], 但仍有一部分 PKU 家庭由于缺乏多态位点的杂合性或者不具备 RFLP 信息, 而失去了产前诊断的机会。我们所发现的这一 399 密码子 A→T 中性突变(或顺序多态性)无疑为 PKU 产前诊断又增加了一个“遗传标记”, 通过聚合酶链反应扩增包括这一顺序多态位点在内的 DNA 顺序, 然后与特异于这一多态顺序的寡核苷酸探针作分子点杂交, 并在家庭中进行遗传的连锁分析, 可望对那些没有 RFLP 多态性, 但却具有这一顺序多态性的 PKU 家庭进行产前诊断。

最近, 作者应用这一方法成功地对一例有 PKU 风险的高危妊娠进行了产前诊断。该孕妇曾生育过一例 PKU 患者, 在第二胎妊娠 8 周时来上海市儿童医院要求对胎儿进行产前诊断。PAH 基因的 RFLP 分析结果表明, 该家庭除 EcoR I 位点外, 其他酶切点均不存在杂合性, 而丈夫、孕妇、患儿和胎儿又均为 EcoR I 11/17 kb 片段的杂合子, 因此, 胎儿存在着两种

可能性,或是正常,或是 PKU 患者,根据 RFLP 分析的结果无法对胎儿作出产前诊断。按本文介绍的方法用 PCR 技术扩增家庭成员的 PAH 基因片段,然后用相应于第 399 密码子中性突变顺序的一对等位基因特异的寡核苷酸 (ASO) 探针与扩增的 DNA 片段作点杂交 (图 3),结果表明孕妇和患儿的扩增 DNA 同时能与正常和中性突变型的 ASO 探针杂交,而父亲和胎儿的扩增 DNA 只能与正常的 ASO 探针杂交,这表明患儿的 1 个 PKU 基因与密码子 399 A→T 中性突变相偶(连锁),这个 PKU 基因来自母方。根据本例胎儿没有这一中性突变,可以排除胎儿为 PKU 患者,结合 EcoRI 位点 RFLP 的资料,可产前诊断胎儿完全正常。胎儿出生后的基因分析和随访证实了上述产前诊断的结果。这例产前诊断的成功为 PKU 和其他一些遗传病的产前诊断开辟了新的途径。

参 考 文 献

- [1] Sriver, C. R. et al., *Ann. Rev. Genet.*, 14(1980), 179.
- [2] Lidsky, A. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(1985), 6221.
- [3] DiLella, A. G. et al., *Nature*, 322(1986), 799.
- [4] DiLella, A. G. et al., *ibid.*, 327(1987), 333.
- [5] Lidsky, A. S. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 37(1985), 619.
- [6] Kwok, S. C. M. et al., *Biochemistry*, 24(1985), 556.
- [7] DiLella, A. G. et al., *ibid.*, 25(1986), 743.
- [8] 曾溢滔等,中国科学 B 辑,1988,3: 297.
- [9] Sanger, F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74(1977), 5463.
- [10] Saiki, R. K. et al., *Nature*, 324(1987), 163.
- [11] Kogan, S. C. et al., *N. Engl. J. Med.*, 317(1987), 985.
- [12] 黄淑贞等,上海医学,11(1988),559.