

广东少数民族 Morquio 综合征 *StuI* 位点的 RFLP 分析

郭奕斌, 杜传书, 林群娣

(中山大学中山医学院医学遗传学教研室, 广州 510080)

摘要: 研究广东少数民族群体 *GALNS* 基因 *StuI* 位点的遗传多态性以及该位点等位基因片段传递的规律, 为今后的连锁分析打下基础。采用 PCR-RFLP 方法, 对 72 例无血缘关系的健康广东少数民族个体的 144 条染色体和 3 个家系 9 位成员的 18 条染色体进行检测, 然后用 χ^2 检验进行统计学处理。等位基因片段 D_1 的频率为 0.70, D_2 为 0.30, 杂合率为 29%, D_1 、 D_2 的传递规律与理论上预计的完全符合。广东少数民族群体中 *StuI* 位点具有多态性, 其基因频率(D_1 和 D_2)与国外高加索群体的有显著差别, 与日本群体及中国南方汉族群体的则无显著差别; 而杂合率与高加索群体及日本群体的均有显著差异, 但与中国南方汉族群体的则无显著差异。

关键词: Morquio 综合征; *GALNS* 基因; 多态性; 限制性片段长度

中图分类号: Q75; Q987

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2003)04-0388-03

RFLP of a *StuI* Site in the *GALNS* Gene in Morquio Syndrome of Guangdong National Minority Population

GUO Yi-Bin, DU Chuan-Shu, LIN Qun-Di

(Department of Medical Genetics, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: To investigate the genetic polymorphism of the *StuI* site in the *GALNS* gene from a national minority population in Guangdong and to study the mode of transmission of alleles, PCR-RFLP was used to analyze 144 chromosomes from 72 Guangdong unrelated healthy national minority individuals, and the genotypes of members in three families. To compare the frequencies and heterozygosity between Guangdong national minority people and Caucasians, Japanese and Chinese Han people by using χ^2 test. The frequency of allele D_1 (295bp) was 0.70, allele D_2 (138 plus 157 bp) 0.30, the heterozygosity was 29%. The genotypes of each member of all families detected were completely agreement with the theoretical assessment. The site of *StuI* in the *GALNS* gene from national minority population in Guangdong has polymorphism. There is significant difference between Guangdong national minority population and Caucasians in Western countries, but no significant difference was found between Guangdong national minority population and Japanese and Chinese Han population. In addition, there is significant difference between Guangdong national minority population and Caucasians and Japanese in the heterozygosity, but no significant difference between Guangdong national minority population and Chinese Han population. The transmission of alleles was completely in agreement with the Mendelian genetic law.

Key words: Morquio syndrome; *GALNS* gene; polymorphism; restriction fragment length

Morquio 综合征是由于 N 乙酰半乳糖胺 6 硫酸酯酶 (N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase,

GALNS) 缺乏而引起的一种致残、致死性的遗传性溶酶体病。编码此酶的 *GALNS* 基因外显子 13

和部分内含子 12、13 区域内含有 *StuI* 多态位点^[1]。由于本病具有广泛的遗传异质性,不同种族、不同民族或不同地域的人群均可能存在差异,因此对该位点进行 RFLP 研究,继而进行连锁分析,将有助于本病的基因诊断。为了弄清广东少数民族 GALNS 基因内 *StuI* 位点的多态性是否与国外报道的以及是否与中国南方汉族存在差别,以便进一步了解这些多态性与 Morquio 综合征发生的相关性,为今后的产前基因诊断等打下基础,作者对 72 例无血缘关系的广东健康瑶族、畲族的 *StuI* RFLP 进行了研究。

1 材 料 和 方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 本

取广东乳源瑶族自治县无血缘关系的 72 例健康少数民族个体的静脉血,用肝素抗凝。其中瑶族 60 人,男 32 人,女 28 人;畲族 12 人,男 6 人,女 6 人。

1.1.2 引物及试剂

按文献^[1]合成扩增 *StuI* 位点的一对引物:OMF142 (5' TAGAGCTCTGCAGCCTCAGCCTGTC 3') 和 OMF143 (5' CCCTGTGCTGGCCACG-GTTCATCCT 3')。所用试剂除 dNTP、*Taq* DNA 聚合酶 (GENDA, 加拿大), 100bp ladder、*StuI* (GIBCO/BRL), SDS、蛋白酶 K、琼脂糖 (Sigma) 外,其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪 器

PCR 热循环仪 GC 1 型 (PE 公司, 美国), 紫外分光光度仪 (Shimadzu UV 120 02, 日本), 高速台式离心机 (TGL 16, 上海), 中压电泳仪 (DY 600 型, 广东汕头)。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取及浓度测定

按我室常规方法进行^[2]。

1.2.2 PCR 扩增

PCR 反应体系为 30 μ L, 含 10mmol/L Tris-HCl (pH9.0), 50mmol/L KCl, 1.5mmol/L MgCl₂, 0.1% TritonX100, 0.2mmol/L dNTP, 上下游引物各 20pmol/L, 以及 0.2~0.5 μ g DNA 模板。94 $^{\circ}$ C 变性 7min 后, 加 1.4U *Taq* 酶 (2U/ μ L), 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 1min, 62 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 40 个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10min。扩增片段大小为 295bp。

1.2.3 *StuI* 酶切 GALNS 基因的特异扩增产物

对用小胶电泳检测有亮、纯扩增带的样品直接进行 *StuI* 酶切分析。酶切反应为: 10.7 μ L tH₂O + 2 μ L NEB₂ (10 $\times$) + 7 μ L PCR 粗产物 + 0.3 μ L *StuI* (10U/ μ L), 37 $^{\circ}$ C 消化 2~3h, 酶切产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染

按我室已建立的方法进行^[3]。

1.2.5 统计学处理

采用 χ^2 检验对实际结果与理论值的一致符合率进行统计学处理。

1.2.6 等位基因传递规律的家系分析

对收集到的 3 个家系 9 个成员进行基因组 DNA 的制备、GALNS 基因内 295bp 片段的 PCR 扩增以及该片段内 *StuI* 酶切位点的多态性分析, 方法均如前述。根据亲、子代的基因型分析 D_1 、 D_2 在世代中的传递规律。

2 结 果

用 *StuI* 分别对 72 例广东少数民族个体的 GALNS 基因的 295bp 片段进行酶切, 结果显示: 其 295bp 片段内的 *StuI* 位点具有多态性。其中等位基因片段 D_1 无切点, 酶切后仍为 295bp (图 1 lane 7), 等位基因片段 D_2 含有一切点, 酶切后可产生 138bp 和 157bp 两个片段 (图 1 lane 6), 而 D_1D_2 杂合子酶切后可见 295bp、157bp 和 138bp 3 条带 (图 1 lane 5)。此外, 酶切结果还显示: D_1D_1 的有 40 人, D_2D_2 11 人, D_1D_2 21 人。根据 $p = P + 1/2H$, $q = Q + 1/2H$, 求得 D_1 的频率为 0.70, D_2 频率为 0.30。这些结果与国外高加索人 (白种)、日本人 (黄种) 以及中国南方汉人 (同种) 的进行比较, 结果如表 1 所示。从表 1 可知, 广东少数民族群体 *StuI* 多态位点的基因频率与高加索人的有显著差异 ($P \ll 0.001$), 而与日本人和中国南方汉人的则无显著差异 (分别为 $0.05 < P < 0.1$ 和 $0.50 < P < 0.70$)。另外, 杂合率与高加索人、日本人的均有显著差异 (分别为 $P \ll 0.001$ 和 $0.001 < P < 0.01$) 而与中国南方汉人的无显著差异 ($0.80 < P < 0.90$)。对 3 个家系 9 位成员进行 GALNS 基因的扩增、酶切。结果如下: 家系 I, 父与母均为 D_1D_1 , 其小孩为 D_1D_1 ; 家系 II, 父与母均为 D_1D_2 , 其小孩为 D_1D_1 ; 家系 III, 父为 D_1D_1 , 母为 D_2D_2 , 其小孩为 D_1D_2 。这些结

果与预计的完全符合,表明 D_1 、 D_2 的传递完全符合孟德尔遗传规律且呈共显性遗传。另外,经 χ^2 检验证明,各基因型数的观察值和期望值相一致,表明基因频率和基因型频率符合 Hard-Weinberg 平衡定律($\chi^2=5.7,df=2,0.05<P<0.10$)。

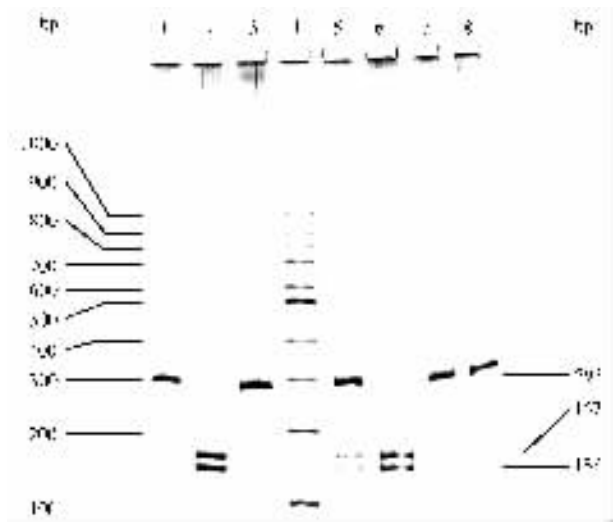


图1 295bp 片段内的 *StuI* 位点的遗传多态性

1. 家系Ⅲ儿子的基因型(为 D_1D_2 杂合子);2. 家系Ⅲ母亲的基因型(为 D_2D_2 纯合子);3. 家系Ⅲ父亲的基因型(为 D_1D_1 纯合子);4. 100bp ladder;5. 295bp 片段的 *StuI* 酶切产物 3(D_1D_2 杂合子);6. 295bp 片段的 *StuI* 酶切产物 2(D_2D_2 纯合子);7. 295bp 片段的 *StuI* 酶切产物 1(D_1D_1 纯合子);8. 295bp 片段的扩增片段。

Fig. 1 Genetic polymorphism of a *StuI* site within 295bp fragment

lane 1:genotype of son in family Ⅲ(D_1D_2);lane 2:genotype of mother in family Ⅲ(D_2D_2);lane 3:genotype of father in family Ⅲ(D_1D_1);lane 4:100 bp ladder;lane 5:*StuI* product 3 of 295 bp fragment (D_1D_2);lane 6:*StuI* product 2 of 295 bp fragment (D_2D_2);lane 7:*StuI* product 1 of 295 bp fragment (D_1D_1);lane 8:PCR product of 295bp.

3 讨 论

从本文的结果来看,GALNS 基因内 *StuI* 多态位点在不同种族、不同民族之间可能有相似的结构,都有 *StuI* RFLP 的存在。但等位基因的分布情况在不同种族中有明显差别,这可能是由于不同种族的人群,其遗传物质本身就存在较大差异,因此在 *StuI* 多态位点也表现出明显差别;而不同民族、不同地域但都是同一种族——黄种人的中国人和日本人以及广东少数民族与中国南方汉族之间都有相似的基因分布情况,表明他们在亲缘关系上要比不同种族的白种人近。另外,广东少数民族的杂合率与

表1 广东瑶、畲人与高加索人、日本人以及中国南方汉人 *StuI* RFLP 的比较

Table 1 Comparison of *StuI* RFLP between Guangdong Yao, She People and Caucasians,Japanese and Chinese Han People

群 体 Population	杂合率	等位基因频率		基因频率的	杂合率的
	Heter-	Alleles		χ^2 检验	χ^2 检验
	zygosity	D_1	D_2	χ^2 test of gene frequencies	χ^2 test of heterzygosity
广东瑶、畲人 Guangdong Yao,She	29%	0.70	0.30	—	—
高加索人 Caucasians	49%	0.45	0.55	$P<0.001$	$P<0.001$
日本人 Japanese	36%	0.76	0.24	$0.05<P<0.10$	$0.001<P<0.01$
中国南方汉人 Chinese Han	27%	0.72	0.28	$0.50<P<0.70$	$0.80<P<0.90$

高加索人、日本人的均存在显著差异,而与中国南方汉人的无太大差别,又表明等位基因的组合、分布不仅在不同种族之间不同,就是在同一种族但民族不同、地域不同的群体中也存在明显差别,说明长期地理隔离造成的生存环境的差异有可能导致遗传物质的改变。而同种族、同地域但民族不同的群体不仅基因结构相近,而且等位基因的组合、分布也很接近,表明他们可能起源于共同的祖先。这对于研究不同种族、不同民族、不同地域人群的亲缘关系,以及民族起源等问题都有重要的科学价值。同时,对于建立连锁分析法、开展临床诊断以及产前基因诊断等,也有重要的应用价值。

参 考 文 献 (References):

[1] Tomatsu S, Fukuda S, Uchiyama A, et al. Polymerase chain reaction detection of two novel human N-acetylglactosamine-6-sulfate sulfatase gene polymorphisms by single-strand conformation polymorphism analysis or by *Sty* I and *Stu* I cleavages [J]. Hum Genet, 1995, 95: 243~244.

[2] GUO Yi-Bin, DU Chan-Shu. *Hinf* I polymorphism within the 3' untranslated region of the WT33 cDNA in Guangdong Han population[J]. Acta J Sums, 1996, 17(1): 73~74.

郭奕斌, 杜传书. 广东汉族人 WT33 cDNA 3'端非翻译区内的 *Hinf* I 酶切点的遗传多态性[J]. 中山大学学报, 1996, 17(1): 73~74.

[3] GUO Yi-Bin, GUANG Wei, DU Chuan-Shu, LIN Qun-Di. RFLP of a *Kpn* I site in the α -L-iduronidase(*IDUA*) gene in mucopolysaccharidosis type I of chinese southern han population[J]. Hereditas(Beijing), 1999, 21(5): 17~19.

郭奕斌, 光 炜, 杜传书, 林群迪. 中国南方汉族群体 MPS I 型 *Kpn* I 位点的遗传多态性[J]. 遗传, 1999, 21(5): 17~19.