

强直性肌营养不良症 *DMPK* 基因 CTG 重复序列与 $Alu \pm 1kb$ 单倍型研究

肖翠英, 武 辉, 潘阿根, 张思仲

(华西医科大学附属第一医院医学遗传研究室, 成都 610041)

摘要: 强直性肌营养不良(myotonic dystrophy, DM)是由于 *DMPK* 基因 3'非翻译区 CTG 重复序列异常扩展所致的、主要累及神经肌肉系统的常染色体显性遗传病。在该基因的第 8 内含子中还存在一个 Alu 重复序列的 1kb 插入/缺失多态性,即 $Alu \pm 1kb$ 多态性。为了帮助阐明汉族人群中 DM 突变的起源,并为解释 DM 在不同群体中发病率的差异提供更多依据,本文从 300 例已知 CTG 拷贝数的正常汉族群体中随机挑选 60 例,首先通过 PCR 扩增确定其 $Alu \pm 1kb$ 多态性,然后对 $Alu \pm 1kb$ 和 CTG 双杂合的标本,采用长 PCR 方法先行扩增含 $Alu \pm 1kb$ 和 CTG 重复序列的 DNA 片段,再分别对含 $Alu(+)$ 和 $Alu(-)$ 的 DNA 片段中的 CTG 拷贝数进行常规 PCR 分析,以确定二位点的单倍型。结果表明 60 例正常人中二位点间呈连锁不平衡。其单倍型为:(CTG)₅ 均与 $Alu(+)$ 连锁;多数 (CTG)₁₁₋₁₄ 与 $Alu(-)$ 连锁;在两个 (CTG) ≥ 19 的等位基因中一个与 $Alu(+)$ 连锁,另一个与 $Alu(-)$ 连锁。各民族相关资料的比较提示,汉族人群中 (CTG)₁₁₋₁₄ 与非洲黑人的起源可能不同;(CTG)₁₉₋₃₀/ $Alu - 1kb$ 在汉族人群中的频率远比欧洲人群的高;(CTG)₁₉₋₃₀/ $Alu - 1kb$ 与 (CTG)₁₉₋₃₀/ $Alu + 1kb$ 在汉族人群中是以一定比例共存的;(CTG)₁₉₋₃₀ 在不同民族间的起源不尽相同;如果从 (CTG)₅ 到 (CTG)₁₉₋₃₀ 的假设成立的话,则很可能是一个较为复杂的过程。

关键词: 强直性肌营养不良症;单倍型分析;长 PCR;三核苷酸重复序列; Alu 重复序列

中图分类号:Q987;R394

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2000)02-0081-04

Studies of the Haplotypes of CTG Triplet Repeat and $Alu \pm 1kb$ in *DMPK* Gene of Myotonic Dystrophy

XIAO Cui-ying, WU Hui, PAN A-gen, ZHANG Si-zhong

(Department of Medical Genetics, The First Affiliated Hospital, West China University of Medical Sciences, Chengd 610041, China)

Abstract: Myotonic dystrophy(DM), an autosomal dominant disease of the neuromuscular system, is caused by expansion of the CTG repeats in the 3' untranslated region of the *DMPK* gene. In the eighth intron of this gene, there is another polymorphism - the insertion/deletion of 1kb Alu repeat ($Alu \pm 1kb$). In order to help elucidate the origin of DM mutation in Chinese Han patients, and explain the difference of incidence of DM in different populations, 60 normal Han individuals were randomly chosen from 300 Chinese, whose CTG copy number had been previously ascertained. The polymorphism of $Alu \pm 1kb$ of the 60 cases were firstly analyzed by *in vitro* amplification; then the 22 cases in which both sites were heterozygous were analyzed as following: the fragments containing both $Alu \pm 1kb$ and CTG repeat sequence were first amplified by long PCR method; and then the CTG copy numbers were analyzed in the $Alu(+)$ and $Alu(-)$ alleles. In the 60 cases studied, a remarkable linkage disequilibrium between CTG triplet repeats and $Alu \pm 1kb$ were observed. All the (CTG)₅ alleles were linked with $Alu(+)$, and most of the (CTG)₁₁₋₁₄ alleles were linked with $Alu(-)$; one of the two alleles of (CTG) _{≥ 19} was linked with $Alu(+)$, the other was linked with $Alu(-)$. This suggests that the origin of (CTG)₁₁₋₁₄ in Chinese Han may be different from that of African Blacks, the frequency of (CTG)₁₉₋₃₀/ $Alu - 1kb$ in Chinese Han might be much higher than that in Europeans/Caucasians. The (CTG)₁₉₋₃₀/ $Alu - 1kb$ and (CTG)₁₉₋₃₀/ $Alu + 1kb$ coexist in Chinese Han in some proportion, the origin of (CTG)₁₉₋₃₀ in different population may be different, if the hypothesis of (CTG)₅ to

收稿日期: 1999-03-29; 修回日期: 1999-06-01

基金项目: 国家自然科学基金(39570388)资助

作者简介: 肖翠英(1963-), 女, 硕士学位, 副研究员, 专业方向: 医学遗传学。

(CTG)₁₉₋₃₀ is true, then the progress should have been a relatively complicated process.

Key words : myotonic dystrophy; haplotype analysis; long PCR; triplet repeats; alu repeats

强直性肌营养不良 (myotonic dystrophy, DM) 是一种常染色体显性遗传病。其临床症状主要为肌强直、肌无力和肌萎缩, 表现为四肢不灵活, 手、前臂及面部等肌肉萎缩, 一些病人还有语言及吞咽困难、白内障、性功能障碍、早秃等。此外, 本病还存在基因组印记 (genomic imprinting) 和遗传早现 (anticipation) 现象^[1]。已经发现, 该病是由于 *DMPK* 基因的 3' 非翻译区中 CTG 重复序列过度扩展所致^[2-6]。

正常群体的 CTG 拷贝数在 5~35 之间, 而绝大多数患者的 CTG 拷贝数大于 50, 一些先天性患者中甚至超过 2000^[6]。CTG 拷贝数与 DM 患者临床症状轻重成正相关, 而与发病年龄成负相关^[2-6]。不同民族 CTG 拷贝数的分布有一定差异, 这可能与各民族发病率有关。

近来对 *DMPK* 基因的结构研究还发现, *DMPK* 基因的第 8 内含子中有一个 1kb 的 Alu 重复序列的插入/缺失多态性, 称为 Alu ± 1kb 多态性, 它距 CTG 重复序列约 5.3 kb^[7]。Lavendan 等在欧洲白人 DM 患者中发现, CTG 扩展总是与 1kb 插入同时出现, 即两者有关联; 而 Imbert 等发现在正常群体中, 1kb 插入与 CTG 拷贝数为 5 和 19~30 的等位基因相关联, 而大多数 1kb 缺失与 CTG 拷贝数为 11~14 的等位基因关联, 并由此提出了 DM 位点突变的“三段模式”, 即 5→19~30→DM 突变^[8,9]。对我国人群中 Alu 重复序列的 1kb 插入/缺失多态性与 CTG 重复拷贝数的单倍型研究将有助于阐明国人 DM 突变的起源, 并可能有助于解释 DM 在不同群体中发病率的差异。

有鉴于此, 我们在先前对 DM 研究的基础上, 应用长 PCR 方法结合改进的常规 PCR 技术对正常汉族人群的 Alu ± 1kb 多态性进行了分析, 获得了 Alu 重复序列的 1kb 插入/缺失多态性与 CTG 重复序列两位点单倍型的资料。现将结果报告如下:

1 材料与方 法

1.1 DNA 标本

从 300 例 20~45 岁的正常汉族群体中随机抽取 60 例, 该群体由华西医科大学医学检验系九一级学生和本室门诊的非肌病患者及其家属构成, 其成员的 CTG 拷贝数均已经检测确定。

1.2 *DMPK* 基因第八内含子中 Alu 重复序列的 1kb 插入/缺失多态性分析

从 300 例已确定 CTG 拷贝数的 DNA 样品中随

机抽出 60 份 DNA 样品进行 PCR 扩增^[10]。

1.2.1 扩增 Alu 重复序列的 1kb 插入/缺失多态区的寡核苷酸引物

参照 Mahadevan 等合成^[7], 其序列为:

正向引物 (405) 5'-CTGTATACTCAGCTACTAGGGT-3'

反向引物 (486) 5'-CTCAGGGTTATCTAAAGTGGC-3'

1.2.2 PCR 扩增及电泳分析

PCR 扩增参照常规 PCR 方法并加以改进。反应总体积为 25 μ l, 内含 10mmol/L Tris-Cl (pH8.8), 25mmol/L KCl, 5mmol/L (NH₄)₂SO₄, 1.5mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTP, 300nmol/L 引物, 5% 的 DMSO, 50ng 基因组 DNA 和 Taq + Pwo 混和酶 (7:1) 1.0 U。在 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 分钟后进入循环。循环条件为: 95 $^{\circ}$ C 10 秒, 55 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 90 秒, 共 30 个周期。最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 分钟。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 确定扩增片段中 1kb Alu 序列的存在状况。

1.3 基于长 PCR 的单倍型分析

1.3.1 DNA 样品

22 例 Alu 重复序列的 1kb 插入/缺失多态性和 CTG 重复序列区为双杂合状态的 DNA 标本 (注: 通过 1.2.2 的分析结果已能确定这 60 例正常人中两位点之一为纯合子的个体的单倍型。如某一个体为 Alu (+)/Alu (+), (CTG)₅/(CTG)₂, 则单倍型分别为 (CTG)₅/Alu (+) 和 (CTG)₂/Alu (+)。反之, 若某一个体两位点分析结果为 (CTG)₅/(CTG)₅ 和 Alu (+)/Alu (-), 则单倍型应为 (CTG)₅/Alu (+) 和 (CTG)₅/Alu (-)。

1.3.2 用于扩增含 Alu 重复序列的 1kb 插入/缺失多态性和 CTG 重复序列多态区的寡核苷酸引物

正向引物 1 5'-CTGTATACTCAGCTACTAGGGT-3'

正向引物 2 5'-GGGCTCGAAGGGTCCTGTAGC-3'

反向引物 5'-GTGGAGGATGGAACACGGACGG-3'

正向引物 1 为上述 1.2.1 中扩增 Alu 重复序列的 1kb 插入/缺失多态性区的正向引物 405。正向引物 2 与反向引物为自行设计的一对引物。正向引物 1 与反向引物用于扩增 *DMPK* 基因第 8 内含子中 Alu 重复序列的 1kb 插入/缺失多态区的 5' 端至外显子 15 的 3' 非翻译区中 CTG 重复序列 3' 端的 DNA 靶序列, 预期结果为 6.5 kb 和 5.5 kb 的两个共扩增的等位基因片段。正向引物 2 与反向引物位于 CTG 重复序列的两侧。引物位置如图 1 所示。

1.3.3 PCR 扩增及检测

采用正向引物 1 与反向引物的条件按引文^[12]进行。扩增结果如图 2 所示。

1.3.4 6.5 kb 和 5.5 kb DNA 片段的回收及纯化

从琼脂糖中分别切下 6.5 kb 和 5.5 kb DNA 片段后,参照 QIAGEN 公司的 QIAquick Gel Extraction 试剂盒推荐方法分别回收及纯化,最后将 DNA 样品溶于 40 μl TE 缓冲液中 4℃ 备用。

1.3.5 CTG 重复序列与 Alu 重复序列的 1kb 插入/缺失多态性单倍型的确定

取 1.3.4 制备的 DNA 样品 2 μl 用于 PCR 反应,采用正向引物 2 与反向引物进行扩增,扩增条件参照引文^[10,11],以确定两位点的单倍型。

2 结果与讨论

采用长 PCR 并结合常规 PCR 的方法对 Alu 重复序列的 1 kb 插入/缺失多态区和 CTG 重复序列多态区为双杂合状态的 22 份标本 DNA 进行单倍型分析,综合 CTG 重复序列和 Alu 重复序列的 1 kb 插入/缺失多态性的数据,获得了 60 例正常汉族个体这两个位点的单倍型资料 结果见表 1。

与在欧洲人群和非洲黑人群所观察到的现象相似^[7,8,13],在汉族人群中,Alu 重复序列的 1 kb 插入/缺失等位基因和 CTG 拷贝数间也存在连锁不平衡现象。在这三个群体中 (CTG)₅ 均与 Alu(+) 等位基因连锁。在中国人群中,多数 (CTG)₁₁₋₁₄ 与 Alu(-) 等

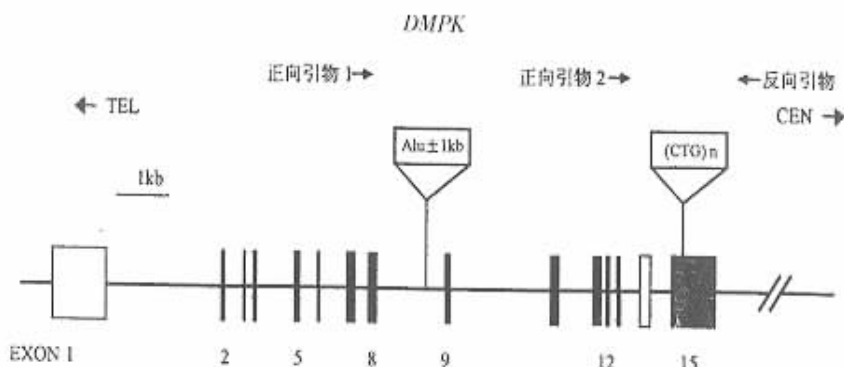


图 1 所用正向引物 1、2 和反向引物在 DMPK 基因中的相对位置。

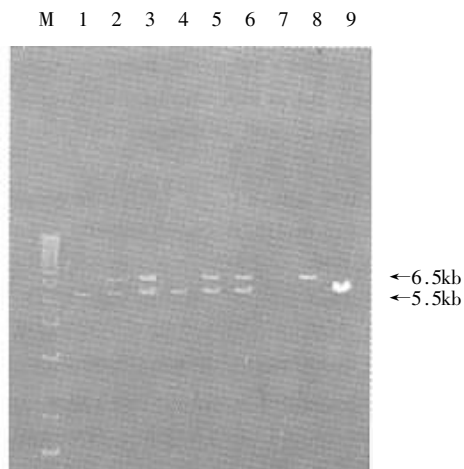


图 2 采用正向引物 1 与反向引物扩增 DMPK 基因第 8 内含子中 Alu ± 1kb 的 5'端至第 15 外显子 3'非翻译区中的 CTG 重复序列的 3'端的结果。1~7 道为含有 Alu (+) 和 Alu (-) 的杂合子,扩增片段大小分别为 6.5 kb 和 5.5 kb; 8、9 道分别为 6.5 kb 和 5.5 kb 的纯合子片段。M 为 1kb Ladder。

位基因连锁 ($\chi^2 = 83.6057, P < 0.0001$), 且与欧洲人群 (CTG)₁₁₋₁₄/Alu(-) 单倍型频率没有显著差别 ($\chi^2 = 3.613, P = 0.052$); 而在非洲黑人,多数 (CTG)₁₁₋₁₄ 等位基因则与 Alu(+) 连锁,且这一单倍型频率与我国汉族人群和欧洲人群的相比有显著差别 ($\chi^2 = 61.83, P < 0.0001$)。在欧洲人群中 (CTG)₁₉ 与等位基因 Alu(+) 连锁^[7],但本文作者对仅有的两个 (CTG)_{>19} 的等位基因(分别来自两个汉族个体)与 Alu 重复序列的 1kb 插入/缺失的单倍型分析中却发现,其中仅一个与 Alu(+) 连锁,即 (CTG)₂₅/Alu(+),而另一个与 Alu(-) 连锁。

Alu 重复序列的 1 kb 插入/缺失多态性的发现增加了对 DMPK 基因多态性的认识。Imbert 等在对法国正常人群 DMPK 基因中的 CTG 重复序列和 Alu 重复序列的 1 kb 插入/缺失多态性的单倍型分析中发现:两者之间呈连锁不平衡,即 (CTG)₅、(CTG)₁₉₋₃₀ 与 Alu + 1 kb、多数 (CTG)₁₁₋₁₄ 与 Alu - 1 kb 关联。本文在汉族人群的调查结果与之基本一致,但在非洲人群中

表 1 中国汉族人 CTG 三核苷酸拷贝数和 Alu ± 1kb 的单倍型分布及其与非洲黑人^[13]和欧洲高加索人^[9]的资料比较

CTG 拷贝数	中国人(60例)		非洲黑人(122例)		欧洲人(148例)*	
	Alu(+)	Alu(-)	Alu(+)	Alu(-)	Alu(+)	Alu(-)
5	41	...	60	...	104	...
6	2	...	1
7	8	1	1	...
8	5
10	1	...	27	2	4	...
11	2	16	20	5	...	45
12	4	25	19	13	...	42
13	2	19	19	12	1	43
14	...	6	19	1	11	7
15	2	0	1	2
16	7	1	1	...
17	2	...	1	...
19	1	...
> 19	1	1	31	...
合计	53	67	187	37	155	140

* 单倍型数合计应为双数,但原始参考文献[13]中为单数,可能系笔误。

却发现多数(CTG)₁₁₋₁₄与 Alu + 1 kb 在同一个染色体上^[14]。鉴于 Alu 重复序列的 1 kb 插入/缺失多态区与 CTG 重复序列的距离只有 5.3 kb,因而这些不同的单倍型极少可能是染色体重组的结果,因此我们认为,汉族人群中的(CTG)₁₁₋₁₄与非洲黑人的起源可能不同。

与在欧洲高加索人群中所有的(CTG)₁₉₋₃₀都与 Alu + 1kb 关联的情况有所不同,本文在对汉族人群的有限调查中发现了一个(CTG)₂₉/Alu - 1kb 单倍型。这提示:①(CTG)₁₉₋₃₀/Alu - 1kb 在汉族人群中的频率远比欧洲人群的高,而且它与(CTG)₁₉₋₃₀/Alu + 1kb 是以一定比例共存的;②(CTG)₁₉₋₃₀在不同民族间的起源不尽相同;③如果(CTG)₅→(CTG)₁₉₋₃₀的假设成立的话^[13],这个过程很可能是相当复杂的。

参考文献:

- [1] Harper P S. Myotonic Dystrophy[M]. (2nd ed). Saunders WB, London and Philadelphia, 1989.
- [2] Buxton J, Shelbourne P, Davies J, et al. Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy[J]. Nature, 1992, 355: 547 ~ 548.
- [3] Harley H G, Brook J D, Rundle S A, et al. Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy[J]. Nature, 1992, 355(6360): 545 ~ 546.
- [4] Brook J D, McCurrach M E, Harley H G, et al. Molecular basis of a myotonic dystrophy: expansion of trinucleotide(CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member[J]. Cell, 1992, 68: 799 ~ 808.

1992, 68: 799 ~ 808.

- [5] Fu Y H, Pizzuti A, Fenwick R G, et al. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy[J]. Science, 1992; 255(5049): 1256 ~ 1258.
- [6] Mahadevan M S, Tsilfidis C, Sabourin L, et al. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene[J]. Science, 1992, 255: 1253 ~ 1255.
- [7] Mahadevan M S, Foitzik M A, Surh L C, et al. Characterization and polymerase chain reaction(PCR) detection of an Alu deletion polymorphism in total linkage disequilibrium with myotonic dystrophy[J]. Genomics, 1993b, 15(2): 446 ~ 448.
- [8] Lavedan C, Hofman - Radvanyi H, Bolleau C, et al. French myotonic dystrophy families show expansion of a CTG repeat in complete linkage disequilibrium with an intragenic 1kb insertion[J]. J Med Genet, 1994, 31: 33 ~ 36.
- [9] Imbert G, Kretz C, Johnson K, et al. Origin of the expansion mutation in myotonic dystrophy[J]. Nat Genet, 1993, 4: 72 ~ 76.
- [10] 潘阿根, 张思仲. 中国人强直性肌营养不良基因 CTG 重复序列多态性的初步研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 1996, 13(3): 138 ~ 142.
- [11] Zhang SZ, Wu H, Hou YP, et al. Low incidence of myotonic dystrophy in Chinese Hans is associated with a lower number of CTG trinucleotide repeats[J]. Am J Med Genet, 1999(in press).
- [12] 武辉, 张思仲. 用长 PCR 方法检测含有较大缺失或插入的 DNA 大片段[J]. 遗传, 1998, 20(3): 8 ~ 10.
- [13] Goldman A, Ramsay M and Jenkins T. New founder haplotypes at the myotonic dystrophy locus in Southern Africa[J]. Am J Hum Genet, 1995, 56: 1373 ~ 1378.
- [14] Goldman A, Krause A, Ramsay M, et al. Founder effect and prevalence of myotonic dystrophy in South Africans: molecular studies[J]. Am J Hum Genet, 1996, 59(2): 445 ~ 452.