

利用 PCR-SSCP 对人 *MINK* 基因的研究^①

杨平,¹ Martin Armstrong,² 戴德哉,¹ Walter Luyten²

(1. 中国药科大学药理研究室, 江苏 南京 210009; 2. 杨森研究基金会, B-2304 Beerse, 比利时)

摘要: 人类 *MINK* 基因的两种突变导致长 QT 综合征 (LQTS)。我们设计了两对引物利用 PCR-SSCP 结合直接测序法在病人及健康者中对 *MINK* 基因进行分析, 结果发现第 149 位密码子产生 A→G 转换。在所研究的对象中, 此变化在病人及正常对照者中均有存在。提示 *MINK* 基因的此突变性质为非病理性的多态突变。

关键词: 人 *MINK* 基因; 聚合酶链反应-单链构象多态性分析; 长 QT 综合征

中图分类号: Q39 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9772(1999)05-0014-16

The Study of *hMINK* Gene by PCR-SSCP Analysis

YANG Ping,¹ Martin Armstrong,² DAI De-zai,¹ Walter Luyten²

(1. Research Division of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Janssen Research Foundation, B-2304 Beerse, Belgium)

Abstract: Two novel mutations that have been described in human *MINK* gene are corresponding for Long QT Syndrome (LQTS). Two pairs of primers were designed to screen *hMINK* gene both in patients and in normal controls. We performed screening by PCR-SSCP analysis combining with direct sequencing. It showed a single A→G transition at position 149. This change was found in both patients and healthy subjects.

Key words: Human *MINK* gene; PCR-SSCP; Long QT syndrome(LQTS)

MINK 基因编码一段长 130 个氨基酸的蛋白质, 它与 *KvLQT1* 编码的蛋白共同构成心肌慢激活整流型钾电流 *IKs* 通道^(1~3)。研究表明, *MINK* 基因的突变可减弱 *IKs*, 降低复极电流, 延长动作电位从而产生长 QT 综合征(LQTS)^(4,5)。LQTS 是一类遗传性疾病。其特征是心室复极化的延长, 往往进一步发展成威胁生命的恶性心律失常, 最终导致猝死的高发生率⁽⁶⁾。本研究利用 PCR-SSCP 结合 DNA 测序方法对 *MINK* 基因进行突变筛选, 从而研究它与 LQTS 的关系。

1 材 料 和 方 法

1.1 病例选择及 DNA 制备

8 例心电图均显示具有长 QT 特征的 LQTS 病人, 健康对照者是来自比利时 Janssen 公司的志愿受试者。采集静脉血样, 并采用 QIAamp Blood Midi Kits 提取全部基因组 DNA。

1.2 PCR-SSCP

PCR 扩增反应仪器采用 Perkin-Elmer 9700 型热循环仪, Borhringe 公司 PCR 反应试剂盒。本文所合成的两对 PCR 引物的序列如下: *MINK1F*: 5'-CTGCAGCAGTGG AACCTTAATG-3'; *MINK1R*:

①收稿日期: 1999-06-08; 修订日期: 1998-09-04

作者简介: 杨平(1971-), 男, 甘肃兰州人, 博士研究生, 专业方向: 药理学。

5'-GTTCGAGTGCTCCAGCTTCTTG-3'; *MINK2F*: 5'-AGGGCATCATGCTGAGCTACAT-3'; *MINK2R*: 5'-TTTAGCCAGTGGTGGGGTTCA-3'。首先以 1F/2R 引物对扩增全部 *MINK* 基因, PCR 反应体系含基因组 DNA 0.2 μ g; 上下游引物 0.25 μ mol/L, DNTPs 2.5 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1.25U。总反应体系 50 μ l。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 10 分钟; 95 $^{\circ}$ C 1 分钟, 58 $^{\circ}$ C 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 1 分钟, 循环 30 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。经测序证实后纯化所得产物, 纯化样品采用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 公司); 然后分别利用 *MINK* 1F/1R, 2F/2R 二对引物以纯化后的 *MINK* 基因为模板再次进行扩增, 得到头尾相互重叠的两对片段, 每一片段均小于 300 对碱基。取 PCR 产物 10 μ l 加入等体积 SSCP 变性加样液 95 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟, 两种不同条件下进行 SSCP 分析。(1) 4 $^{\circ}$ C 下经 12.5% 的中性聚丙烯酰胺凝胶 (ExcelGel^R DNA Analysis Kit Pharmacia Biotech 公司) 电泳 2.5 小时; (2) 15 $^{\circ}$ C 下经 15% 的中性聚丙烯酰胺凝胶 (ExcelGel^R 48S DNA Kit Pharmacia Biotech 公司) 电泳 3 小时。电泳后根据 DNA 银染试剂盒 (DNA Silver Staining Kit, Pharmacia Biotech 公司) 操作说明固定染色直至带型清晰。

1.3 测序

SSCP 结果显示异常的条带, 对其 PCR 产物进行纯化。测序采用引物 *MINK1F*, *MINK1R* 双向进行, ABI PRISM 377 测序仪上直接测序。

2 结果与讨论

应用 PCR-SSCP 在对长 QT 的患者及正常对照者的研究结果表明, 患者组标本及正常对照组中照都出现了电泳条带的增减及位置的相对迁移, 其电泳特征提示可能存在的杂合子及纯合子。图 1 显示, 在 4 $^{\circ}$ C 下, 经 12.5% 的中性聚丙烯酰胺凝胶, 可见病人组及正常组均有异常条带的存在。

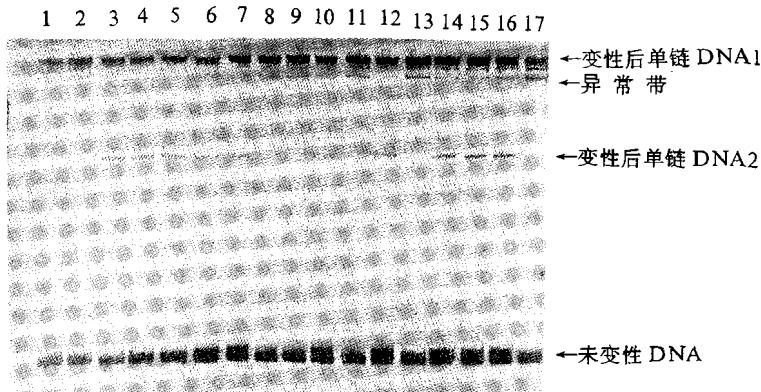


图 1 人 *MINK* 基因的 PCR-SSCP 分析

1~8. 对照组; 9~17. LQTS 病人。其中丝氨酸纯合子(S/S): 3~5; 半胱氨酸杂合子(S/C): 6~7、10、12、14~16; 半胱氨酸纯合子(C/C): 1~2、8~9、11、13、17。

所得 DNA 经测序分析确证与已知 *MINK* 序列(EMBL-id: HSISK)相比, 部分受试者中 *hMINK* 基因的第 149 位密码子发现 AT→GC 的转换 (图 2), 其中 S38 纯合子在患者中 0 例, 在健康对照组中 3 例; C38 纯合子在患者中 5 例, 在健康对照组中 2 例; C38 杂合子在患者中 3 例, 在健康对照组中 4 例 (图 1), 这一变化将导致其编码的蛋白序列 38 位的丝氨酸 (AGT) 转变成成为半胱氨酸 (GGT)。因此, 在所研究的对象中, 等位基因中出现 G 的变化同时存在于 LQTS 患者及健康对照者中, 提示人类 *MINK* 基因多态性的存在。

人类 *MINK* 基因编码的蛋白与 KVLQT1 所组成的(亚基共同组成 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体的电压门控的钾通道, 通过调节钾电流对于动作电位的复极化过程起着重要的作用⁽⁷⁾, 已报道的两种位于 *hMINK* 上的突变 D76N、S74L, 均会导致 QT 间期的延长并表现出强的显性负效应⁽²⁾, 属病理性突变。与上述病理性突变不同, 在本研究中所

发现的 *hMINK* 基因 S38C 的纯合子及杂合子在病人及健康对照者中均有发生, 表明此突变的性质属于非病理性多态突变。该结果提示, 由该突变产生的丝氨酸突变为半胱氨酸类型的改变可能不会造成蛋白质构象的显著性变化, 从而不明显影响其正常的离子通道及生理功能, 这与上述报道的病理性突变不同。在我们的研究中, 病人组中均未发现有 D76N、S74L 突变的存在。但是, 由于目前已经确定的与 LQTS 相关的基因共有 5 个, 包括: *KvLQT1*(LQT1)⁽⁸⁾, *HERG*(LQT2)⁽⁹⁾, *SCN5A*(LQT3)⁽¹⁰⁾, *MINK*(LQT5)⁽¹¹⁾ 以及位于 4q25~27 位点其突变导致 LQT4⁽¹²⁾, 因此, 除 *MINK* 基因外, 对上述患者进一步进行其他 4 个相关基因的筛选是十分必要的。

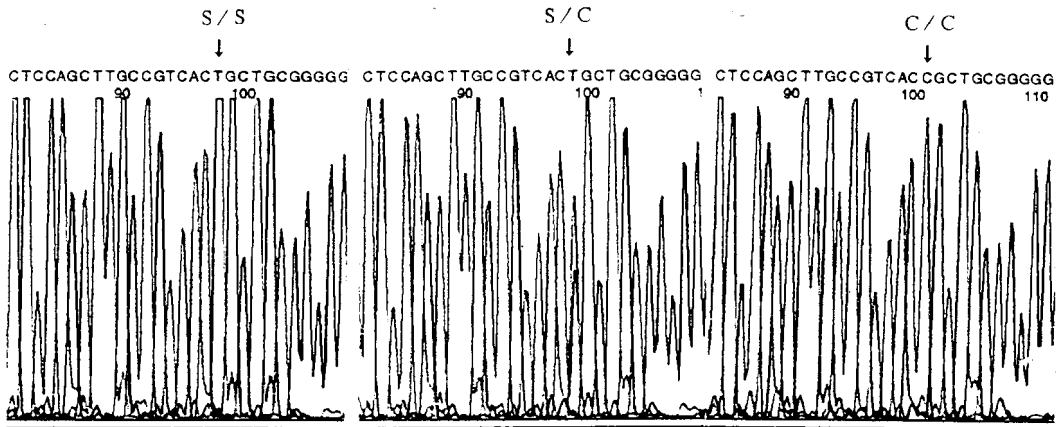


图2 SSCP 结果的序列分析
左. S/S; 中. S/C; 右. C/C。测序引物为反向引物 *MINK* 1R。

参 考 文 献:

- (1) Kaczmarke L K, Blumenthal E M. Properties and regulation of the *MINK* potassium channel protein[J]. *Physiol Rev*, 1997, 77: 627~641.
- (2) Sanguinetti M C, Curran M E, Zou A, *et al.* Coassembly of *KvLQT1* and *IK_s*(*MINK*) proteins to form the *IK_s* cardiac potassium current[J]. *Nature*, 1996, 384: 80~83.
- (3) Romey G, Attali B, Chouabe C, *et al.* Molecular mechanism and functional significance of the *MINK* control of the *KvLQT1* channel activity[J]. *J Bio Chem*, 1997, 272: 16713~16716.
- (4) Splawski I, Firouzi M T, Lehmann M H. Mutation in the *hMINK* gene cause long QT syndrome and suppress *IK_s* fuction[J]. *Nat Genet*, 1997, 17: 338~340.
- (5) Schulze B E, Wang Q, Weitekind H, *et al.* *KCNE1* mutation cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome[J]. *Nat Genet*, 1997, 17: 267~268.
- (6) Keating M T, Sanguinetti M C. Pathophysiology of ion channel mutations[J]. *Cur Opin Genet Develop*, 1996, 6: 326~333.
- (7) Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Finc M, *et al.* *KvLQT1* and *IK_s*(*MINK*) proteins associate to form the *IK_s* cardiac potassium curent[J]. *Nature*, 1996, 384: 78~80.
- (8) Wang Q, curran M E, Splawski I, *et al.* Positional cloning of a novel potassium channel gene: *KvLQT1* mutations cause cardiac arrhythmias[J]. *Nat Genet*, 1995, 12: 17~23.
- (9) London B, Trudeau M C, Newton K P, *et al.* Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier *K⁺* current[J]. *Circ Res*, 1997, 81: 870~878.
- (10) Wang Q, Shen J, Li Z, *et al.* Cardiac sodium mutations in patients with long QT syndrom, an inherited cardiac arrhythmia[J]. *Hum Mol Genet*, 1995, 4: 1603~1607.
- (11) Dumain R, Wang Q, Keating M T, *et al.* Multiple mechanisms of sodium channel-linked long QT syndrome[J]. *Circ Res*, 1996, 78: 916~924.
- (12) Schott J J, Charpentier F, Peltier S, *et al.* Mapping of a gene for Long QT syndrome to chromosome 4q25~27[J]. *Am J Hum Genet*, 1995, 57: 1114~1122.