

中国汉族人群原纤维蛋白-1 基因(*FBN1*) 第 27 内含子 *G/A* 多态性

陆振虞 陈仁彪

(上海第二医科大学医学遗传学教研室, 上海 200025)

小林公子 李黎明 有波忠雄 滨口秀夫

(日本国筑波大学医学遗传研究室, 日本筑波)

摘要 采用 PCR-ASO 方法, 对日本筑波大学 101 名中国汉族留学人员的 DNA 样品进行了原纤维蛋白-1 基因(*FBN1*)第 27 内含子 *G/A* 多态性测定。结果发现, *A* 等位基因频率为 0.5396, *G* 等位基因频率为 0.4604。与 Tynan 等人报道的数据(*A* 和 *G* 等位基因的频率分别为 0.1675 和 0.8325)相比, 有非常显著差异($P < 0.01$), 提示两样本间有不同的遗传背景。

关键词 *FBN1* 基因, *G/A* 多态性, PCR, ASO

Study on *G/A* Polymorphisms in Intron 27 of Fibrillin-1 Gene in Chinese Han Population

Lu Zhenyu Chen Renbiao

(Department of Medical Genetics, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025)

K. Kobayashi, Li Liming, T. Arinami, H. Hamaguchi

(Department of Medical Genetics, Institute of Basic Medical Science, University of Tsukuba, Tsukuba, 305 Japan)

Abstract The *G/A* polymorphisms in intron 27 of fibrillin-1 gene in 101 Chinese Hans who were studying and working in University of Tsukuba, Japan were analyzed with PCR-ASO method. The frequencies of *A* and *G* alleles, were 0.5396 and 0.4604 respectively. In a population sample reported by Tynan the frequency of *A* allele was 0.1675 while that of *G* allele was 0.8325. The distribution of *G/A* polymorphism was significantly different between the two population sample ($P < 0.01$), suggesting different genetic backgrounds.

Key words *FBN1* gene, *G/A* polymorphism, PCR, ASO

Marfan 综合征是一种涉及心血管、骨骼和眼的结缔组织异常的常染色体显性遗传病⁽¹²⁾, 该综合征在人群中的发病率约为 1/10 000—1/25 000, 病例中 15—30% 为新的突变^(1, 12)。

现已发现, 15 号染色体长臂原纤维蛋白-1 基因(*FBN1*)突变导致 Marfan 综合征^(3, 4, 6)。近来, Pereira 等又对 *FBN1* 基因作了基因组 DNA 的序列测定, 发现该基因全长 110kb, 有 65 个外显子⁽¹⁰⁾。该基因转录的 mRNA 长约 10kb, 其产物原纤维蛋白的分子量为 350kD^(7, 8, 13)。迄今为止, 在 Marfan 综合征病人中, 已发现 *FBN1* 基因突变和小缺失多达 50 多种^(2, 9, 14, 16), 各个家系间 *FBN1* 基因突变情况各不相同。这些都引起了学者们对 *FBN1* 基因的极大兴趣。

Hewett 等人发现, 在 *FBN1* 基因第 27 内含子的 3'端距第 28 外显子 5 个碱基处的位点存在 G/A 多态性^[5]。作者在日本筑波大学基础医学系工作期间, 对在该校的 101 位中国汉族留学人员作了 *FBN1* 基因 G/A 多态性检测, 以期建立中国人群的有关数据, 探索 *FBN1* 基因内含子 G/A 多态性在我国 Marfan 综合征检测和人类学研究上的可能应用。

1 材 料 和 方 法

1.1 材料

血液标本采自日本筑波大学身体健康的中国留学人员, 共 101 名, 其中男性 58 名, 女性 43 名, 均为汉族, 年龄在 18—66 岁, 来自中国的 10 多个省市、自治区。其本人及家族均无 Marfan 综合征病史。

1.2 方法

1.2.1 聚合酶链反应(PCR)

按常规从外周血白细胞中抽提 DNA 后作 PCR 扩增, 所用的引物为 UF-348 和 UF-424, 其核苷酸序列为^[15]:

UF348: 5'-GGCACACTGATACTTCCCT-3'

UF424: 5'-GACGAAGGCTATGAAAGTG-3'

PCR 反应周期为 94℃ 60 秒、56℃ 60 秒、72℃ 90 秒, 共 35 个周期。经 PCR 反应后, 得到的扩增片段的长度为 1kb。

1.2.2 等位基因特异寡聚核苷酸(ASO)杂交

PCR 反应完成后, 取 5 μ l 产物经氢氧化钠变性后转移到尼龙膜上作预杂交, 预杂交液的组成成分为: 6 \times SSC, 5 \times Denhart, 1%SDS, 100 μ g/ml 鱼精蛋白。将尼龙膜放入有 3ml 预杂交液的塑料袋后封口, 42℃ 振荡 1 小时后将陈旧的预杂交液去除, 注入新的预杂交液 2ml, 加入经末端标记的 ASO 探针作杂交, ASO 探针的序列为^[15]:

5'-GATGTCTGTCTGGGAAAATA-3' (G 等位基因反意义链)

5'-TATTTTCCCAACAGACATC-3' (A 等位基因意义链)

杂交的温度为 45℃, 在水浴摇床中过夜。终止杂交后用 6 \times SSC, 0.1%SDS 液洗膜。洗膜的条件为: 45℃ 10 分钟、50℃ 5 分钟、55℃ 10 分钟。

杂交后尼龙膜晾干, 放射自显影(-70℃), X 片冲洗后得到实验结果。

2 结 果 与 讨 论

在所测 101 例中, 25 例只与 A 等位基因意义链探针有明显的杂交点, 17 例只与 G 等位基因反意义链探针有明显的杂交点, 59 例与二者均有明显的杂交点, 从而测得杂合子频率为 0.5842, G 等位基因频率为 0.4604, A 等位基因频率为 0.5396。据 Tynan 报道的数据^[15], 其样本总数为 382 条独立的染色体, 所有的样本中除 6 例以外均与 G 杂交, 58 例与 A 杂交, 其中 6 例只与 A 杂交, 由此推算, 杂合子频率为 0.2723, A 等位基因频率为 0.1675, G 等位基因频率为 0.8325。但 Tynan 没有详细说明该人群的组成, 只是说其中包括美籍华人、美籍日本人、美籍葡萄牙人、墨西哥人、北欧人、菲律宾人、白人等, 推测其中大部分样本为白人。

表1 中国汉族人群与 Tynan 报道的人群 *FBN1* 基因 *G/A* 多态性基因型频率和基因频率

人 种 群	基 因 型 频 率			基 因 频 率	
	<i>AA</i>	<i>GA</i>	<i>GG</i>	<i>A</i>	<i>G</i>
中国汉族人群	0.2475	0.5842	0.1683	0.5396	0.4604
Tynan 报道的人群	0.0314	0.2723	0.6963	0.1675	0.8325

中国汉族人群和 Tynan 报道的人群分别作 *G/A* 基因型频率和基因频率的显著性检验, 结果各项 *P* 值均小与 0.01, 表明二者间有非常显著的差异。

近年来, 世界各国, 尤其是欧美学者, 对 Marfan 综合征病因的研究十分重视, 已在分子水平的研究上取得了重大进展, 特别是对 *FBN1* 基因的研究日趋深入, 目前, 已将该基因的 DNA 序列测定工作全部完成, 并在 Marfan 综合征患者中检测到 *FBN1* 基因的突变和小缺失达 50 多种。这些结果表明, *FBN1* 基因的突变很可能是导致 Marfan 综合征的直接原因。但 *FBN1* 基因很大, 长达 110kb, 有 65 个外显子, 人们还注意到各个家系间的突变情况各不相同, 这给用检测突变的方法作 Marfan 综合征的症状前诊断或出生前诊断带来一定的困难。最近, 国外陆续发表了在 *FBN1* 基因内含子发现一系列重复顺序多态性位点, 主要有 *mts-1* [(CA)*n*]、*mts-2* [(CA)*n*]、*mts-3* [(TAAA)*n*]、*mts-4* [(CA)*n*]。它们分别位于第 1、5、28、43 内含子中。这些多态性位点构成的分子单倍型, 为 Marfan 综合征家系的连锁分析, 进而为在这些家系中作症状前诊断或出生前诊断提供了研究的手段^[11]。

此外, 据 Tynan 等人报道^[15], *FBN1* 基因第 27 内含子 *G/A* 多态性位点中具有 *A* 等位基因的个体中, 一部分人的第 3442 位核苷酸由正常的 C 颠换成 G, 从而导致第 1148 位氨基酸由正常的脯氨酸变为丙氨酸, *G/A* 多态性位点可能对 Marfan 综合征研究具有一定的价值。

与国外相比, 国内这方面的工作起步较晚, 目前尚未有 Marfan 综合征分子遗传学研究方面的报道。本文发现, 中国人群在 *FBN1* 基因的第 27 内含子 *G/A* 多态性与 Tynan 报道的资料有非常显著的差异。今后, 我们可把这种 *G/A* 多态性应用于我国 Marfan 综合征的检测和人类学方面的研究。

参 考 文 献

- (1) Beighton *et al*, 1988. *Am. J. Med. Genet.*, 29: 581—594.
- (2) Byers P H, 1993. *Hum. Mutat.*, 2: 80—81.
- (3) Dietz H C *et al*, 1991. *Nature*, 352: 337—339.
- (4) Dietz H C *et al*, 1992. *J. Clin. Inv.*, 89: 1647—1680.
- (5) Hewett D R *et al*, 1991. *Nucleic. Acids Res.*, 19: 6975.
- (6) Kainulainen K *et al*, 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5917—5921.
- (7) Lee B *et al*, 1991. *Nature*, 352: 330—334.
- (8) Maslen C L *et al*, 1991. *Nature*, 352: 334—337.
- (9) McInnes R *et al*, 1993. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 3: 475—483.
- (10) Pereira L *et al*, 1993. *Hum. Mol. Genet.*, 2: 961—968.
- (11) Pereira L *et al*, 1994. *N. Engl. J. Med.*, 331: 148—153.
- (12) Pyeritz R E and Mckusick V A, 1979. *N. Engl. J. Med.*, 300: 772—777.
- (13) Sakai L Y *et al*, 1986. *J. Cell Biol.*, 103: 2499—2509.
- (14) Sykes B, 1993. *Nature Genet.*, 3: 99—100.
- (15) Tynan K *et al*, 1993. *Hum. Mol. Genet.*, 2: 1813—1821.
- (16) Gaby Nijbroek *et al*, 1995. *Am. J. Hum. Genet.*, 57: 8—21.