

①

变性梯度凝胶电泳在遗传性多发性 外生性骨疣基因诊断中的应用

何洪波¹, 胡正茂², 李贺君¹, 朱 勇¹, 施小六³, 雷光华¹, 周江南¹, 李康华¹

(中南大学 1. 湘雅医院骨科, 长沙 410008; 2. 中国医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410078;
3. 湘雅二医院消化内科, 长沙 410011)

[摘要] 目的: 采用检测遗传性多发性外生性骨疣 (hereditary multiple exostoses, HME) 患者 *EXT2* 基因的突变, 分析该方法的敏感性及用于 HME 基因诊断的可行性。方法: 收集 5 个 HME 家系和 3 个 HME 散发患者, 利用变性梯度凝胶电泳方法对 *EXT2* 基因的所有编码外显子及其旁侧内含子序列进行检测, 并对出现异常构象的片段进行 DNA 测序分析。结果: 在两个家系中分别发现了一种 A313T 的无义突变和一种 319insGT 的移码突变。结论: 在 HME 患者中发现了 2 个 *EXT2* 基因致病突变, DGGE 可作为基因诊断理想的候选方法。

[关键词] 外生性骨疣; *EXT2* 基因; 基因诊断; 变性梯度凝胶电泳

[中图分类号] R738.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2007)02-0323-05

Denaturant gradient gel electrophoresis in the genetic diagnosis of hereditary multiple exostoses

HE Hong-bo¹, HU Zheng-mao², LI He-jun¹, ZHU Yong¹,

SHI Xiao-liu³, LEI Guang-hua¹, ZHOU Jiang-nan¹, LI Kang-hua¹

(1. Department of Orthopaedics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008; 2. National Laboratory of Medical Genetics of China, Central South University, Changsha 410078; 3. Department of Gastroenterology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To detect the mutations of *EXT2* gene in hereditary multiple exostoses (HME) families and to investigate the sensitivity of denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE) in screening the mutations in *EXT2* gene. **Methods** Five HME families and 3 sporadic patients were screened for the mutation detection in all exons of *EXT2* gene covering the coding sequence and the flanking intronic sequence by DGGE, and DNA sequencing was performed for products with abnormal conformation. **Results** Among these HME patients, we found 2 disease-causing mutations: A313T (nonsense mutation) and 319insGT (frameshift mutation). **Conclusion** Two mutations of *EXT2* gene are identified in the sample. DGGE can be an ideal choice for gene diagnoses of HME.

Key words: hereditary multiple exostoses; *EXT2*; gene diagnoses; denaturant gradient gel electrophoresis

[J Cent South Univ (Med Sci), 2007,32(2):0323-05]

遗传性多发性外生性骨疣 (hereditary multiple exostoses, HME) 是一种累及软骨化骨的常染色体显性遗传病, 以长骨近骺部多发的外生骨疣形成

为特征, 是骨系统常见的肿瘤, 约 2/3 有阳性家族史^[1]。目前已定位的 HME 致病基因位点至少有 8q24.1 上的 *EXT1*^[2], 11p11 上的 *EXT2*^[3] 及 19p

①收稿日期 (Date of reception) 2006-05-17

作者简介 (Biography) 何洪波 (1970-), 男, 湖南醴陵人, 主治医师, 硕士, 主要从事骨科遗传病的研究。

通讯作者 (Corresponding author) 何洪波, E-mail: hehongbo@cnlmg.com

上的 *EXT3*^[4],其中 *EXT1*,*EXT2* 基因分别于 1995 年和 1996 年被克隆^[5-7]。近年来的研究已在欧美人群的 HME 家系中发现了多种 *EXT1* 与 *EXT2* 基因的致病突变,突变方式多种多样。已报道的 *EXT* 基因突变检测方法包括:PCR-直接测序法、单链构象多态性法(PCR-SSCP)、变性高效液相色谱(DHPLC)等^[8],但是尚未见到变性梯度凝胶电泳法(DGGE)用于此基因突变的检测。为进一步了解中国人群 *EXT2* 基因突变的情况,笔者以 5 个汉族 HME 家系和 3 个散发患者作为研究对象,采用 DGGE 测序对 *EXT2* 基因的所有编码外显子进行了突变分析。

1 材料与方法

1.1 家系收集 所有 HME 患者均由中南大学医学遗传学国家重点实验室、湘雅医院及湘雅二医院骨科联合收集,每一家系成员的先证者由专科教授确诊,其中有 5 个为家系发病,3 个为散发患者。患者年龄 8~40(平均 18)岁,男女各 7 位。5 个家系先证者和 3 个散发患者的发病年龄为 1~6 岁,其肱骨、膝部及肋骨等处均有大小数目不等的骨疣。

1.2 标本采集及 DNA 抽提 在获得书面的知情同意后,每个个体抽取 10 mL 外周血(肝素抗凝),采用苯酚氯仿法抽提基因组 DNA。

1.3 PCR 扩增 引物序列参照 Philippe 等^[9]的方法。引物合成由上海博亚生物技术有限公司完成。PCR 反应体系如下:总体积 50 μ L,包括 10 \times buffer 5 μ L;15 mmol/L $MgCl_2$ 5 μ L;10 mmol/L dNTP 1 μ L;gDNA(100 ng/ μ L) 1.5 μ L 及 Taq DNA polymerase 0.3 μ L;不带 CG 夹的引物 200 ng,带 CG 夹的引物 600 ng。反应在 Perkin Elmer 公司的 9700 型 PCR 仪上完成。反应条件为:96 $^{\circ}C$ 预变性 2

min;95 $^{\circ}C$ 变性 30 s,适当温度退火 30 s,72 $^{\circ}C$ 延伸 50 s,共 32~34 个循环;72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min;4 $^{\circ}C$ 保存。PCR 产物加入等体积的载样缓冲液,用 2 \times TAE 溶解至 10 mL 终止反应,经中性胶检测后即可用于 DGGE 电泳。反应所用的 Taq 酶及配套的 Buffer, $MgCl_2$, dNTP 均购自上海生工生物工程技术服务公司。

1.4 DGGE 检测 制备 20%~70% 变性强度的垂直梯度胶,聚丙烯酰胺胶浓度为 8%,胶黏度为 37.5:1。放入装有 1 \times TAE 电泳缓冲液的电泳槽内预热,预电泳 15 min 后取 50 μ L 混有载样缓冲液的 PCR 产物上样于胶孔,56 $^{\circ}C$ 恒温,130~140 V 恒电压下电泳至二甲苯青刚好出胶时下胶,然后银染显色。如发现异常构象,则改平行梯度胶(梯度范围不变)检测家系成员及正常对照,电压 150 V,电泳时间 6~9 h。

1.5 测序反应与序列分析 对 DGGE 检测出现异常构象的标本进行放大反应体积 PCR 扩增,产物纯化,并用正反向引物在 ABI 公司 3100 型的自动测序仪上完成测序。同时对所有家系先证者 *EXT2* 基因的 2 号和 8 号外显子测序。测序结果用 SeqMan 软件与正常序列比较并判断核苷酸及编码的氨基酸是否发生改变。

2 结 果

2.1 DGGE 检测结果

2.1.1 垂直 DGGE 结果 本实验在 5 个家系的先证者及 3 个散发患者中发现了两个家系的构象改变,其中一个家系在外显子 2 的第二对引物的扩增产物中发现异常构象带,另一家系在外显子 2 的两对引物的扩增产物中都发现有异常构象带(图 1)。

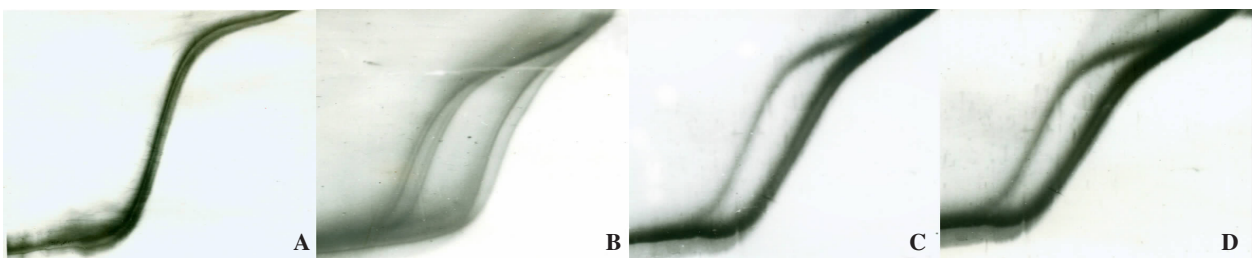


图 1 *EXT2* 基因突变的垂直 DGGE 电泳图谱 A:正常对照,表现为一种单一曲线;B:在 43 号家系患者 2 号外显子的第二对引物的扩增产物中发现异常构象带;C,D:在 14 号家系先证者 2 号外显子的两对引物的扩增产物中都发现异常构象带
Fig. 1 Vertical DGGE electrophoresis of *EXT2* gene A: Control, the result showing a single curve; B: Patient in Family 43, the PCR fragment of the exon 2 amplified by the second pair of primers showing abnormal conformation bands; C and D: Proband in Family 14, the PCR fragments of the exon 2 amplified by 2 pairs of primers showing abnormal conformation bands

2.1.2 平行 DGGE 结果 上述扩增片段的平行 DGGE 结果见图 2。上述扩增片段的平行 DGGE 结果证实了垂直 DGGE 的结果,一个家系在外显子 2 的第二对引物的扩增产物中出现异常构象带,另一家系在外显子 2 的两对引物都出现异常构象带。

2.2 序列分析结果 对上述异常片段测序后发现了 3 种核苷酸序列的杂合性改变:其中在 14 号家系有一个 A313T(图 3A),该变异使第 105 位密码子 AAG(编码精氨酸)变为终止密码 TAG,为无义突变,家系中的两患者(父亲、儿子)均有此突变,正常人无;在 14 号家系还有一 C28A(图 3B),使第 10 位密码子由 CGG 变为 AGG,但均编码精氨酸,是一个多态。在 43 号家系患者编码区有一个 319insGT(图 3C),该变异导致其后的阅读框移码,并于第 111 位氨基酸后出现终止密码子 TAG,此突变仅见于家系中的患者。对其他家系中先证者的外显子 2 和 8 直接测序,未发现有突变或多态。

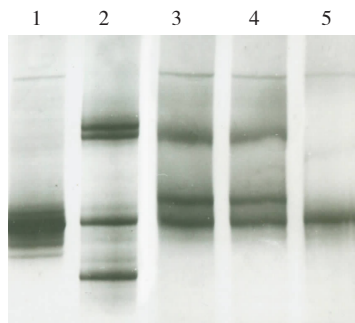


图 2 *EXT2* 基因突变的平行 DGGE 电泳图谱 1,2 和 3 为 2 号外显子的第二对引物的扩增产物,其中 1 为正常对照,仅见单一构象带;2 为 43 号家系患者的扩增片段构象带,其中两条迁移率明显慢于正常;3 为 14 号家系患者的扩增片段,见明显 3 条构象带。4 和 5 为 2 号外显子的第一对引物的扩增产物,其中 4 为 14 号家系患者的扩增片段,见明显 3 条构象带;5 为家系内正常对照,仅见单一构象带

Fig. 2 Parallel DGGE electrophoresis of *EXT2* gene Lane 1, Lane 2 and lane 3 showing the PCR fragments of the EXON 2 amplified by the 2nd pair of primers Lane 1: Only a single conformation band in the control; Lane 2: Abnormal conformation bands in the patient in Family 43; the mobility of two of which was obviously slower compared with Lane 1; Lane 3: Patient in Family 14, 3 apparent pieces of conformation bands in the patient in Family 14. Lane 4 and Lane 5 showing the PCR fragments of the EXON 2 amplified by the 1st pair of primers; Lane 4: Three apparent pieces of conformation bands in the patient in Family 14; Lane 5: Only a single conformation band in the control in Family 14

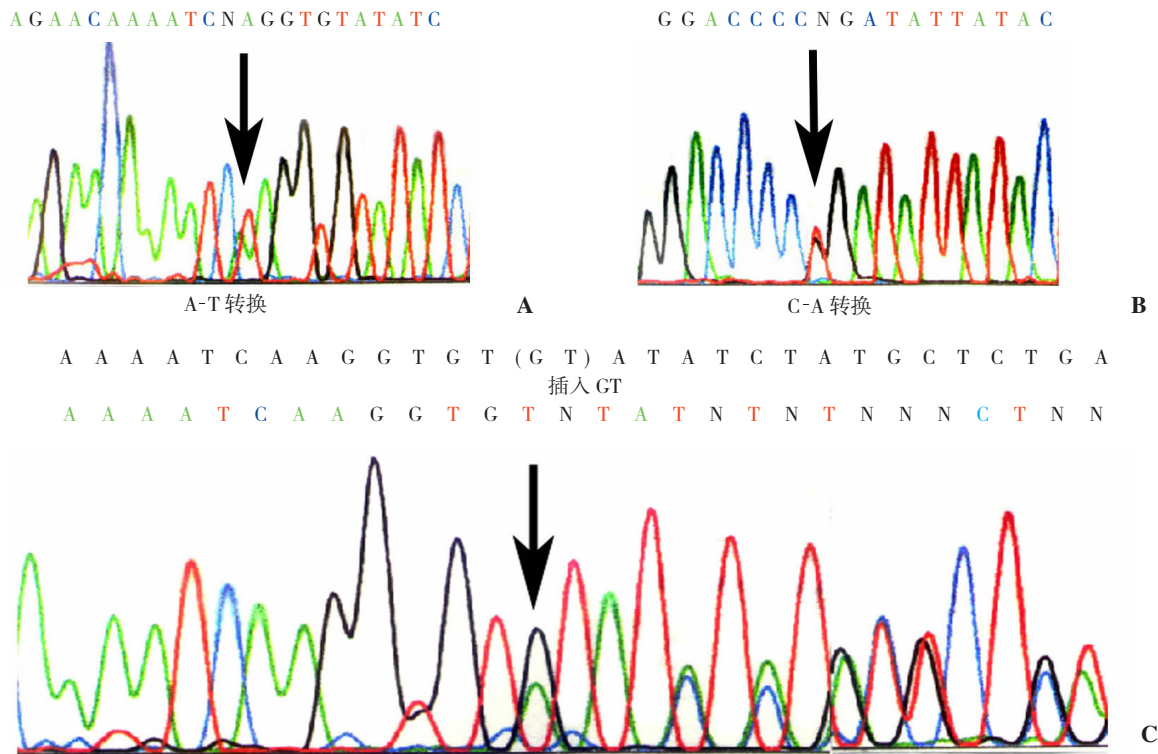


图 3 出现异常构象的 PCR 扩增片段的测序结果 A:14 号家系患者的 A313T;B:14 号家系患者的 C28A(反向序列);C: 43 号家系患者的 319insGT,导致其阅读框移码,并于第 111 位氨基酸后出现终止密码子 TGA

Fig. 3 Sequencing of the PCR fragments which showed the abnormal conformation bands in Fig. 1 and Fig. 2 A: A313T in patient in Family 14; B: C28A in patient in Family 14 (reverse sequence); C: patient in Family 43,319insGT which leads to the shifting of reading frame and causes the appearance of stop code TGA after the 111th amino acids location

3 讨 论

遗传性多发性外生性骨疣(HME)可有多种并发症,较正常人群有较高的恶变率(0.5~2%)^[4]。根据HME人群有较高的恶变率(如考虑年龄因素可达2%~5%,而正常人群为1/100000)^[10]以及在散发骨软骨肉瘤或EXT继发的骨软骨肉瘤中发现的多个EXT基因位点的杂合性丢失(LOH)现象,Hetch等^[10]认为EXT基因可能属于一新的肿瘤抑制基因家族,而近年的研究表明:EXT1,EXT2基因都编码肝素硫酸盐聚合酶,该酶既具有D-葡萄糖醛酸转移酶活性又具有N-乙酰-D-氨基酸葡萄糖转移酶活性,参与肝素硫酸盐(heparan sulfate,HS)的合成,HS是蛋白多糖的重要组成部分,而蛋白多糖在HME的发病中起重要作用^[6]。笔者对找到致病突变的14号和43号家系进行了基因型和表型的相关分析,发现14号家系的先证者和43号家系的先证者发病年龄都较早,分别是1和2岁,这两个家系的患者都有不同程度的身材矮小,而且骨疣数目比较多,大约有20个左右可扪及的骨疣,分布在肱骨、前臂、膝部、踝关节以及脊椎等多处。EXT2基因共编码718个氨基酸^[11],本研究发现的2种EXT2致病突变,A313T和319insGT是两种已报导的致病突变,均可能导致蛋白合成提前终止。经查阅文献及在互联网上查询,发现是两种已报导的致病突变,均可能导致蛋白合成提前终止,且终止出现在氨基端,致使编码蛋白羧基端的大多数氨基酸丢失,使该蛋白功能丧失,导致肝素硫酸盐的生物合成不足,从而可能引起调节软骨细胞增殖与成熟的负反馈环遭到破坏,使软骨细胞过早分化,造成局部骨生长异常而发病^[12]。EXT2基因编码蛋白质的大多数氨基酸丢失可能导致比较严重的症状,而患者严重的临床表现与其突变类型也是对应的。

对于HME,目前尚无特效药物进行预防或抑制其生长,手术治疗有复发风险,而且对一些多发性病例也不可能做到全部切除,更由于此病的遗传早发现象(后一代较前一代发病早、症状重),使得基因诊断、特别是产前诊断具有重要意义。已有的连锁分析与突变研究的结果认为70%以上HME家系或病例是由EXT1或EXT2基因突变所致^[13]。据人类基因突变数据库(The Human Gene

Mutation Database, HGMD)统计,到2005年底,在EXT1基因中共发现了111种突变;在EXT2基因中发现了49种突变。从目前已发现的EXT1与EXT2基因突变情况分析,突变形式以无义突变或移码突变为主,本研究中发现的两种突变亦属于这两种类型。从发生突变的位点上看,未发现突变热点,但相对集中在少数几个外显子:在EXT1基因中,78%的突变发生在第1,2和6号外显子。在EXT2基因中,66%的突变发生在2号和8号外显子。此结果为临床基因诊断提供了便利。

变性梯度凝胶电泳最初是由Fisher等^[14]于1983年创立,现在该技术与PCR技术相结合已被广泛应用于各种突变分析。它主要是利用梯度变性胶来分离DNA片段。一个DNA片段其特定的序列组成决定了其解链区域(melting domain, MD)和解链行为(melting behavior)^[14],不同的双链DNA片段因为其序列组成不一样,所以其解链区域及各解链区域的解链温度也不一样。当它们进行DGGE/TGGE时,初时变性剂浓度(或温度)比较小,DNA片段的迁移行为与在一般的聚丙烯酰胺凝胶中一样。然而一旦DNA片段迁移到一特定位置,其变性剂浓度(或温度)刚好能使双链DNA片段最低的解链区域解链时,双链DNA片段最低的解链区域立即发生解链,部分解链的DNA片段在胶中的迁移速率会急剧降低。同样长度但序列不同的DNA片段会在胶中不同位置达到各自最低解链区域的解链温度,因此它们会在胶中的不同位置发生部分解链导致迁移速率大大下降,从而在胶中被区分开来。尤其是当加了GC夹子后,DNA片段中基本上每个碱基处的序列差异都能被区分开^[15,16]。于波等^[17]研究发现用DGGE检测皮肤癌p53基因第5~8外显子的总突变率为33%,而SSCP只有25%。侯君等^[18]比较了DGGE,SSCP和RFLP3种方法后认为:DGGE检测结果具有无假阳性,重复性好、准确率高等优势。而且DGGE可初步判断基因型:野生型为一条带;杂合子有3~4条带;而纯合子只有一条带,但与野生型不同。本研究采用DGGE对EXT2基因进行突变检测,结果显示:具有移码突变的模板在DGGE构象图中出现明显的4条构象带,而仅有单核苷酸改变的则在垂直胶中出现了明显的2条构象带,可能是由于4种双链中的3种因构象改变相似而使迁移率相近所致(构成深色曲线),与其对应的平行DGGE电泳图谱也可见3条构象带。可见由于

错配的异源双链的存在,使 DGGE 在检测突变时较其他方法更易发现异常构象,假阴性率更低。考虑到 *EXT2* 基因中,66% 的突变发生在 2 号和 8 号外显子,笔者对其他家系中先证者的外显子 2 和 8 直接测序,未发现有 DGGE 未检出的突变或多态。DGGE 对 *EXT2* 基因外显子 2 和 8 的变异检出率达到了 100%。

总之,与 SSCP 相比,DGGE 不但具有重复性好、准确率高等优势;而且 DGGE 可检测较长片段,而 SSCP 在片段大于 300 bp 时检出率已经大打折扣^[19]。与 DHPLC 相比,DHPLC 虽然检出率高,但是其所需仪器设备价格昂贵。与直接测序相比,DGGE 所需仪器设备及直接成本更低。因此我们认为:采用 DGGE 法结合测序,对 *EXT1* 和 *EXT2* 基因发生突变相对集中的几个外显子进行突变分析,既经济又可信,是对 HME 进行基因诊断与产前诊断的一种较好的候选方法。

参考文献:

- [1] Hennekam RC. Hereditary multiple exostoses [J]. *J Med Genet*, 1991,28(4):262-266.
- [2] Cook A, Raskind W, Blanton SH, et al. Genetic heterogeneity in families with hereditary multiple exostoses [J]. *Am J Hum Genet*, 1993,53(1):71-79.
- [3] Wu YQ, Heutink P, de Vries BB, et al. Assignment of a second locus for multiple exostoses to the pericentromeric region of chromosome 11 [J]. *Hum Mol Genet*, 1994,3(1):167-171.
- [4] Le Merrer M, Legeai-Mallet L, Jeannin PM, et al. A gene for hereditary multiple exostoses maps to chromosome 19p [J]. *Hum Mol Genet*, 1994,3(5):717-722.
- [5] Ahn J, Ludecke HJ, Lindow S, et al. Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (*EXT1*) [J]. *Nat Genet*, 1995,11(2):137-143.
- [6] Stickers D, Clines G, Burbee D, et al. The *EXT2* multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes [J]. *Nat Genet*, 1996,14(1):25-32.
- [7] Wuys W, Van Hul W, Wauters J, et al. Positional cloning of a gene involved in hereditary multiple exostoses [J]. *Hum Mol Genet*, 1996,5(10):1547-1557.
- [8] Vink GR, White SJ, Gabelic S, et al. Mutation screening of *EXT1* and *EXT2* by direct sequence analysis and MLPA in patients with multiple osteochondromas: splice site mutations and exonic deletions account for more than half of the mutations [J]. *Eur J Hum Genet*, 2005,13(4):470-474.
- [9] Philippe C, Porter DE, Emerton ME, et al. Mutation screening of the *EXT1* and *EXT2* genes in patients with hereditary multiple exostoses [J]. *Am J Hum Genet*, 1997,61(3):520-528.
- [10] Hecht JT, Hogue D, Strong LC, et al. Hereditary multiple exostosis and chondrosarcoma: linkage to chromosome II and loss of heterozygosity for *EXT*-linked markers on chromosomes II and 8 [J]. *Am J Hum Genet*, 1995,56(5):1125-1131.
- [11] Duncan G, McCormick C and Tufaro F. The link between heparan sulfate and hereditary bone disease: finding a function for the *EXT* family of putative tumor suppressor proteins [J]. *J Clin Invest*, 2001,108(4):511-516.
- [12] Kim BT, Kitagawa H, Tamura J, et al. Human tumor suppressor *EXT* gene family members *EXTL1* and *EXTL3* encode alpha 1,4-N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/heparin biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001,98(13):7176-7181.
- [13] Gigante M, Matera MG, Seripa D, et al. Ext-mutation analysis in Italian sporadic and hereditary osteochondromas [J]. *Int J Cancer*, 2001,95(6):378-383.
- [14] Fischer SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983,80(6):1579-1583.
- [15] Myers RM, Fischer SG, Maniatis T, et al. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Nucleic Acids Res*, 1985,13(9):3111-3129.
- [16] Myers RM, Fischer SG, Lerman LS, et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Nucleic Acids Res*, 1985,13(9):3131-3145.
- [17] 于波,阎春林,朱运松,等. 变性梯度凝胶电泳和单链构象多态性分析检测皮肤癌 *p53* 基因突变的比较 [J]. *复旦学报(医学科学版)*, 2001,28(3):209-212.
YU Bo, YAN Chun-lin, ZHU Yun-song, et al. A comparison of denaturing gradient gel electrophoresis and single strand conformation polymorphism analysis in detecting the mutation of *p53* gene in skin cancer [J]. *J Fudan Univ (Med Sci)*, 2001,28(3):209-212.
- [18] 侯君,谭云山,韩琼林. 3 种常用单核苷酸多态性检测方法的应用比较 [J]. *中国临床医学*, 2004,11(2):255-257.
HOU Jun, TAN Yun-shan, HAN Qiong-lin. Comparison of three methods in detection the single nucleotide polymorphism [J]. *Clinical Medical Journal of China*, 2004,11(2):255-257.
- [19] 张宇红,周常文. PCR-SSCP 分析技术的研究进展及应用前景 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2002,10(5):126-127.
ZHANG Yu-hong, ZHOU Chang-wen. Three progress and potential application of PCR-SSCP [J]. *Chin J Birth Health Heredity*, 2002,10(5):126-127.