

Dystrophin基因 3~5 号外显子缺失连接片段的克隆和测序

钟敏¹, 潘速跃¹, 陆兵勋¹, 姜立², 李伟¹(南方医科大学¹南方医院神经内科,²分子生物学研究所, 广东 广州 510515)

摘要:目的 通过对抗肌萎缩蛋白(dystrophin)基因 3~5 号外显子缺失后连接片段的克隆和测序分析,探讨 dystrophin 基因缺失的发生机制。方法 先以外显子 PCR 反应检测证实 1 例杜氏肌营养不良症患者 3~5 号外显子缺失,然后在 2、5 号内含子上用 PCR 步移方法寻找断裂位点,最后用靠近断裂位点处设计的引物,以 PCR 法直接扩增 dystrophin 基因的缺失连接片段并测序,测序结果和正常内含子序列作对比分析。结果 获得 2113 bp PCR 产物,本例基因缺失片段长约 49 000 bp。5' 端断裂点位于 2 号内含子短散在元件 Alu 序列内,3' 端断裂点在单一序列,附近有 TTTAAA 序列。断裂点附近有较强的拓扑异构酶 II 酶切位点。连接片段插入了 26 bp 序列并在断裂点周围形成 3 个 13 bp 的短序列重复(GGCTTATATTTAA)连接断裂点两端。结论 推测重复序列、断裂点附近较强的拓扑异构酶 II 酶切位点关联易引起基因的断裂重组,加上非同源末端连接修复机制等综合因素可能是导致基因缺失的重要原因。

关键词: 肌营养不良症;连接片段;基因缺失

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)06-0757-03

Cloning and sequencing of the junction fragment of dystrophin gene with exons 3 to 5 deletion

ZHONG Min¹, PAN Su-yue¹, LU Bing-xun¹, JIANG Li², LI Wei¹

¹Department of Neurology, Nanfang Hospital; ²Institute of Molecular Biology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: **Objective** To study the mechanisms of dystrophin gene deletion by cloning and sequencing the junction fragment of dystrophin gene with exons 3 to 5 deletion. **Methods** PCR was performed to verify dystrophin gene exons 3 to 5 deletion in a patient with Duchenne muscular dystrophy. A PCR-based genome-walking method was used to localize the breakpoint in introns 2 and 5, and the deletion-junction fragment was directly amplified by PCR approach with forward and reverse primers annealing to a DNA sequence as close as possible to the breakpoint in the introns 2 and 5. The sequencing result of the deletion-junction fragment was compared with the normal intron sequences. **Results** A sequence of 2113 bp containing the junction fragment was obtained. The 5' breakpoint was located in SINE/Alu element of intron 2, and the 3' breakpoint was located in the unique sequence near the sequence TTTAAA. The breakpoints were associated with a strong topoisomerase II cleavage site. A 26-bp fragment was inserted into the breakpoint and formed 3 duplications (GGCTTATATTTAA) of 13 bp around the deletion-junction fragment. **Conclusion** Repeat sequence and strong topoisomerase II cleavage site around the breakpoint may predispose double-strand DNA breaks and recombination, which, in addition to the nonhomologous end-joining mechanism, may contribute as important factors to the gene deletion.

Key words: muscular dystrophy; junction fragment; gene deletion

抗肌萎缩蛋白(dystrophin)基因缺失突变是导致假肥大型肌营养不良症的最常见基因突变类型,占有突变类型的 55%~65%。dystrophin 基因缺失的机制至今未完全阐明,为对 dystrophin 基因缺失机制作继续探讨研究,我们继在国内首次直接用 PCR 法完成了 45~54 号外显子长片段基因缺失连接片段的克隆和测序后,再次用该方法成功克隆 3~5 号外显子缺失的连接片段,其中 2 号内含子上发生断裂的序列分析迄今国内外文献还未见有报道。

1 材料和方法

1.1 病例资料

男性杜氏肌营养不良症患者,31 岁,有 DMD 家族病史,经检测 3~5 号外显子缺失。

1.2 试剂

Taq Plus DNA 聚合酶、dNTP 购自上海生工生物工程技术有限公司,扩增长片段的 LA Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物工程有限公司,西班牙 Hispanagar 公司 Biowest Agarose 进口分装琼脂糖,其他试剂为国产分析纯。

1.3 引物设计

本实验涉及 20 对外显子引物,其中 18 对引物参照 Chamberlain 等^[1]和 Beggs 等^[2]的文献设计,另 2 对引物从 <http://www.dmd.nl> 上获取。

本实验涉及 13 对内含子引物,其中在 2 号内含

收稿日期:2005-12-27

基金项目:广东省自然科学基金(001032)

Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (001032)

作者简介:钟敏(1975-),男,在读硕士研究生,主治医师,电话:

020-88141256, E-mail: pomelomin@hotmail.com

通讯作者:潘速跃,副教授, E-mail: pansuyue82@yahoo.com.cn

子分次间隔约 30 kb 和 3 kb 共设计 11 对引物, 在 5 号内含子间隔约 3 kb 共设计 2 对引物。引物通过在线设计程序 http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi 完成设计, 每对引物均限定其 PCR 产物长度在 301~400 bp 范围。为提高克隆基因缺失连接片段的特异性, 经上述引物完成对断裂点的定位后在靠近 2 个内含子断裂点处再设计 1 对配对引物 (D1-F: 5'-AAATCAAGAGAAGGTTAATGTGGAC-3' D1-R: 5'-CTTACCTATGACTATGGATGAGAGCA-3') 以直接对连接片段进行长片段 PCR 扩增。以上所有引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.4 3~5 号外显子缺失连接片段的克隆

常规酚-氯仿法抽提制备上述 DMD 患者的基因组 DNA。

通过 18 对外显子引物进行 PCR 反应初步筛查, 确认患者 3 号、4 号外显子缺失, 加用 2 号、5 号外显子引物 PCR 反应后证实为 3~5 号外显子缺失。PCR 反应条件: 96 °C, 2 min; 94 °C, 30 s, 退火 (具体温度依据各引物 T_m 值确定), 30 s, 72 °C, 1 min, 35 循环; 72 °C, 10 min。

用所设计的内含子引物定位断裂点的位置 若相邻 2 对内含子引物 1 对扩增出正常阳性结果而另 1 对扩增为阴性结果, 即可判断内含子上断裂点的大致位置。PCR 反应条件同上。

以引物 D1-F、D1-R 直接对连接片段进行长片段 PCR 扩增 PCR 反应条件: 96 °C, 2 min; 94 °C, 30 s, 54 °C, 30 s, 72 °C, 2 min, 35 循环; 72 °C, 10 min。

1.5 基因缺失连接片段的测序

将扩增成功的 PCR 产物纯化后测序。测序工作由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.6 连接片段和断裂点序列特点分析

将所测序列和正常内含子序列进行对比, 分析 5' 和 3' 端断裂点两侧各 100 bp 序列的分子结构特点。内含子重复序列的分析采用 RepeatMasker 程序 (http://www.repeat_masker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker), 基质附着区 (matrix attachment regions, MARs) 分析采用 MAR-Wiz 程序 (<http://www.futuresoft.org/MAR-Wiz>)。

2 结果

2.1 经以内含子引物进行 PCR 反应检测

5' 端断裂点位于 2 号内含子距离第一个碱基 153 kb 左右的位点处, 3' 端断裂点位于 5 号内含子末端邻近 6 号外显子处。对基因缺失连接片段的长片段 PCR 反应扩增出长约 2 kb 的产物片段 (图 1)。

2.2 PCR 产物测序

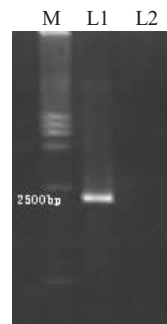


图 1 连接片段的 PCR 扩增电泳图
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the PCR amplified product of the junction fragment

M: DL15000 Marker; L1: A PCR amplified product of about 2 kb from a DMD patient; L2: Normal control

经 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/HsBlast.html> 作相似性比较证实为 dystrophin 基因片段, 缺失总长度约 49 kb。重复序列分析本例基因缺失的 5' 端断裂点位于 2 号内含子 153106~153387 位的 SINE/Alu 序列内, 3' 端断裂点在单一序列。MARs 分析 3' 端断裂点在 MAR 下游 4720 bp, 5' 端断裂点不靠近内含子的 MAR 区域。5' 端断裂点附近在 2 号内含子正链 153424、153428、153432 位点以及反链 16868、17006 位点有拓扑异构酶 II 酶切位点; 3' 端断裂点附近在 5 号内含子正链 5726 位点以及反链 891、1005 位点有拓扑异构酶 II 酶切位点。同时发现 3' 端断裂点下游 15 bp 处有 TTTAAA 序列。分析本例基因缺失相连接的序列无广泛同源性, 连接片段插入了 26 bp 序列并在断裂点周围形成 3 个 13 bp 的短序列重复 (GGCTTATATTTAA) 连接断裂点两端。另外在 5' 端断裂点上游 20 bp 位置发现一处 A→G 点突变 (图 2、3)。

3 讨论

总长约 2500 kb 的 dystrophin 基因是人类最大基因, 现有的资料显示 dystrophin 基因缺失的断裂点都位于内含子上, 且可遍布其内含子序列的各个位点, 因此准确寻找到断裂点并克隆基因缺失连接片段并非易事。本例的 5' 端断裂点位于 2 号内含子, 2 号内含子是 dystrophin 基因上长度仅次于 44 号和 1 号内含子的庞大内含子, 长约 170 kb。研究发现内含子的稳定性主要取决于其内在的分子结构^[3], 但随机的长度因素对内含子的缺失率也有重要的影响, 因此如何定位 dystrophin 基因庞大内含子上的断裂点对研究者一直都具有挑战性。本例是我们第 2 例以 PCR 步移法定位基因缺失的断裂点后, 成功地用断裂点附近上下游的一对引物完成对连接片段的扩增和测序。

分析结果进一步发现 5' 端断裂点位于 2 号内含子上的一个 Alu 序列内, Alu 作为重复序列中的重要一种可以形成发夹环结构, 从而使 DNA 双链易于发生断裂重组。同时观察到两端断裂点附近均有较强的拓扑异构酶 II 酶切位点关联, 有资料显示与强拓扑异

