

# 一个 BMD 家系中 DXS 164 缺失突变分析\*

张志平 黄鹰 张丽珊 鲁晓瑄 高翼之 王世浚

(南京铁道医学院生物学教研室, 210009)

用 DXS164 探针在一例 BMD 家系中发现有缺失突变。这一缺失跨越了 pERT87-1 至 pERT87-15 区域, 缺失片段至少在 50kb 以上。用 DMD 基因内部的 J-Bir 和 DMD 基因两侧的 C7 和 754 探针确定缺失片段位于 DXS164。本文还对这一家系中一正常男性可能存在 754 片段的重复进行了探讨。

**关键词:** X-连锁肌营养不良症, 基因缺失, 基因重复

Duchenne 肌营养不良 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 基因是目前已知的人类最大基因<sup>[6]</sup>, 长约 2000kb 左右, 定位于 Xp21, 包含 60 个外显子。在这样大的区域里基因突变频率是相当高的, 常引起致死性的 Duchenne 肌营养不良和 Becker 肌营养不良 (Becker muscular dystrophy, BMD) Monaco<sup>[7]</sup> 等于 1985 年用 pERT87 探针首次发现 DMD 基因缺失并将缺失定位在 DXS164。用这一位点的 DMD 基因组探针可以在 10% 的 DMD 或 BMD 患者的这一区域发现缺失, 但缺失大小与此病的临床表现无明显的平行关系。研究表明, DMD 基因突变方式起码有 50% 为基因缺失或基因重排, 且大部分突变的位置在 DMD 基因的中间区域。pERT87 探针正位于 DMD 基因的中央, 此探针所能检测到的缺失频率相对较高。

1986 年 Koenig 等人<sup>[1,2,5]</sup> 克隆出 DMD 基因全长 14kb 的 cDNA, 从而使系统地分析和研究 DMD 基因成为可能, 直接分析 DMD 基因某一区域, 可以更加精细地确定 DMD 基因突变的位置。

## 材料和方法

**家系资料** 先证者孙××, 男, 18 岁, 江苏省沭阳县人。有典型的 Becker 肌营养不良病史和体征, 血清 CPK 明显升高, 肌电图显示

肌原性损害, 肌活检可见部分横纹肌萎缩, 患者舅父也患同样病症, 已亡(图 1)。临床诊断为 Becker 肌营养不良。此家系由南京铁道医学院附属医院儿科单毓芬医师提供。

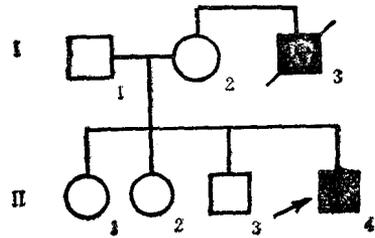


图 1 患者家系图

表 1 DMD 基因探针资料表

探针名称	载体	插入片段	
DXS28	C7	pBR322	2.5kb/EcoRI
	J-Bir	pUC18	1.1kb/KpnI HindIII
DXS164	pERT87-1	pUC18	1.35kb/KpnI SalI
	pERT87-15	pUC18	1.5kb/HindIII
DXS84	754	pAT153	2.2kb/HindIII

**探针** 探针资料见表 1。pERT87 和 J-Bir 探针由美国哈佛大学波士顿儿童医院 Kunkel 博士提供。C7 由法国化学生物研究所

Zhang Zhiping et al.: Analysis of DXS164 Deletion in a Family with Becker Muscular Dystrophy

本课题获江苏省科委的资助。

本文于 1990 年 3 月 12 日收到。

Mandel 博士提供。754 由荷兰 Leiden 大学人类遗传学系 Pearson 博士提供。

**方法** 取 ACD 抗凝的外周血经  $\text{NH}_4\text{Cl}$  破红细胞后,用酚抽提 DNA,限制性内切酶酶切 DNA 样品,0.8% 琼脂糖凝胶电泳 20—24 小时,依不同材料要求以 Southern blotting 法分别转移到 Hybond-N、Gene Screen Plus 和硝酸纤维素膜上。质粒经扩增后用碱法提取,用限制酶切击插入片段,经凝胶电泳后以透析袋回收探针。用  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dATP}$  通过 Nick-translation 法标记探针。杂交采用  $65^\circ\text{C}$  体系 ( $6 \times \text{SSC}$ , 0.5% SDS, 10mmol/L EDTA,  $5 \times \text{Denhardt's}$  200  $\mu\text{g}$  鲑鱼精 DNA/ml) 杂交 16—20 小时,  $65^\circ\text{C}$  洗膜,  $-70^\circ\text{C}$  放射自显影一周。

### 结 果

C7/EcoRI 和 J-Bir/BamHI 杂交组合在所研究的成员中均出现 7.5kb 或 5.0kb 的相同片段(见表 2)。pERT87-1/MspI 杂交出现 4.0kb 和 1.8kb 两种等位片段, I<sub>1</sub> 为 4.0kb 带, II<sub>3</sub> 和 I<sub>2</sub> 为 1.8kb 带, II<sub>1</sub> 和 II<sub>2</sub> 均为 4.0kb 和 1.8kb 的杂合子, 而患者 II<sub>4</sub> 未获任何杂交带(见图 2)。pERT87-15/BamHI 杂交除 II<sub>4</sub> 没有显带外,其他成员均为 7.1kb 和 2.3kb 两条杂交带。754/PstI 杂交均出现 9.0kb 带, 而 II<sub>3</sub> 还出现了另外两条 3.9kb 和 2.0kb 带(见图 3)。

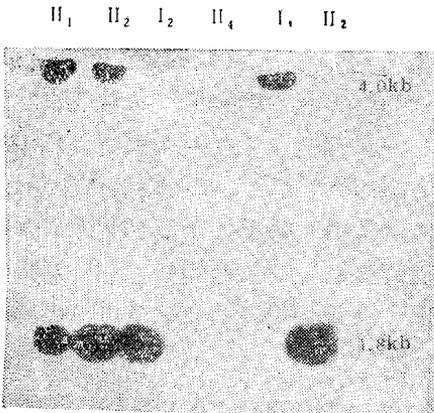


图 2 pERT87-1/Msp I 杂交结果

II<sub>1</sub> II<sub>2</sub> I<sub>2</sub> II<sub>3</sub> I<sub>1</sub> II<sub>3</sub>

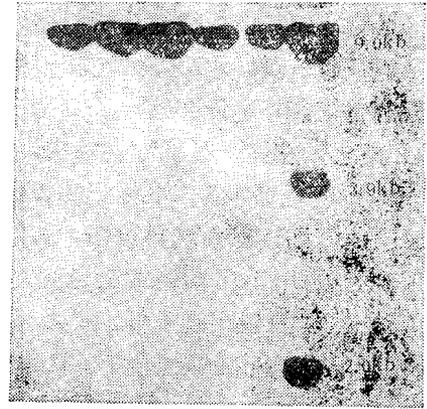


图 3 754/Pst I 杂交结果

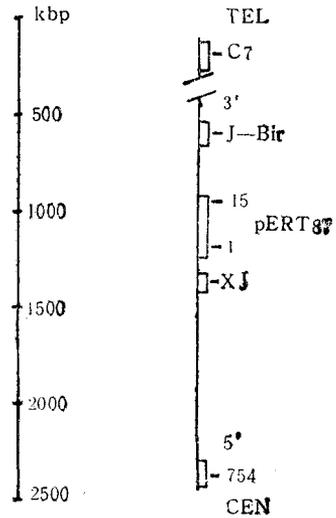


图 4 DMD 基因探针分布图

表 2 家系各成员基因组 DNA 与多种探针组合杂交结果

探针组合	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	II <sub>1</sub>	II <sub>2</sub>	II <sub>3</sub>	II <sub>4</sub>
C7/EcoRV	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
J-Bir/BamHI	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
pERT87-1/MspI	4.0	1.8	4.0	4.0	1.8	*
pERT87-15/BamHI	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	*
754/PstI	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
					3.9	
					2.0	

\* 表示未获杂交结果

## 讨 论

### (一) DXS164 缺失突变分析

从 pERT87-1/*Msp* I 杂交结果可见, II<sub>1</sub> 未获任何杂交带, II<sub>1</sub> 不能和这一探针杂交, 说明 II<sub>1</sub> 的 X 染色体在这一区域存在缺失。II<sub>3</sub> 出现 1.8kb 带, 说明母亲带 1.8kb 标记的 X 染色体为正常 X 染色体。从家系资料可知, II<sub>1</sub> 的致病基因是从 I<sub>2</sub> 得到的, I<sub>2</sub> 的两条 X 染色体之一的 DMD 基因有缺失, I<sub>2</sub> 仅出现 1.8kb 带, 说明 I<sub>2</sub> 的 1.8kb 带仅为半合子而非纯合子。II<sub>2</sub> 和 II<sub>1</sub> 均为 4.0kb 和 1.8kb 的杂合子, 显然 4.0kb 带的标记是从 I<sub>1</sub> 得到的, 而 1.8kb 带标记是从 I<sub>2</sub> 得来的。既然 I<sub>2</sub> 的两条 X 染色体中带 1.8kb 标记的为正常 X 染色体, II<sub>1</sub> 和 II<sub>2</sub> 从 I<sub>2</sub> 得到的 X 染色体带有正常的 DMD 基因, II<sub>1</sub> 和 II<sub>2</sub> 应为正常女性而非携带者。pERT87-15/*Bam*H I 杂交结果显示, II<sub>1</sub> 还是不能和这一探针杂交, II<sub>1</sub> 的 DMD 基因缺失一定跨越了这两个探针所在的位置, 而其 DMD 基因内部的 J-Bir 和两侧 C7 和 754 均能与 II<sub>1</sub> 正常杂交。这一基因缺失至少在 50kb 以上, 且缺失仅限于 DXS164<sup>[8]</sup> (见图 4)。

DMD 基因很大, 仅用基因组探针探查 DMD 基因缺失是有限的。由于 DMD 基因的 cDNA 跨越范围大, 发现缺失的频率较高。最近发现 DMD 基因的大部分缺失在 DMD 基因的 cDNA8 和 cDNA<sub>1-2</sub> 探针分布区域<sup>[9]</sup>, 一旦在 DMD 或 BMD 患者发现有 DMD 基因缺失, 通过缺失分析和剂量效应就可以直接进行基因诊断, 不必进行连锁分析。同时有助于探讨 DMD 发病的分子机理。

### (二) II<sub>3</sub> 的 X 染色体 754 片段可能有部分

## 重复

在这一家系中, II<sub>3</sub> 与 754/*Pst*I 杂交不仅出现了与其它成员一样的 9.0kb 带, 还出现了另外 3.9kb 和 2.0kb 两条杂交带。男性仅一条 X 染色体, 说明 II<sub>3</sub> 的 X 染色体除了具有正常的 754 片段外, 可能还存在与 754 同源的其它片段。II<sub>3</sub> 的 X 染色体是从 I<sub>2</sub> 得到的, 而 I<sub>2</sub> 又未出现这两条带, 所以这两条带可能是在卵子形成过程中基因突变而产生的。I<sub>2</sub> 为 DXS164 的缺失杂合子, 在卵子生成过程中的减数分裂染色体联会时<sup>[3]</sup>, 一条 X 染色体的 DMD 基因有缺失, 在这一区域不能和正常 X 染色体配对, 基因交叉互换时发生不平等交换——重组修复, 可能造成 DMD 基因外侧 754 片段的某一部分重复<sup>[9]</sup>。II<sub>3</sub> 现已 30 岁, 表型完全正常, 说明 II<sub>3</sub> X 染色体的这一重复对 DMD 基因发挥功能无多大影响。可以设想, 这种突变如发生在 DMD 基因内部就可能影响 DMD 基因的正常功能。

## 参 考 文 献

- [1] Darras, B. T. et al.: 1988. *Am. J. of Med. Genet.*, 29: 713—726.
- [2] Koenig, M. et al.: 1987. *Cell*, 50: 509—517.
- [3] Lanman, J.T. et al.: 1987. *Am. J. of Med. Genet.*, 41: 138—144.
- [4] Leroy, B. S. et al.: 1988. *Am. J. of Med. Genet.*, 31: 709—721.
- [5] Lichti-Gallati, S. et al.: 1989. *Hum. Genet.*, 81: 343—348.
- [6] Monaco, A.P. et al.: 1987. *Trends in Genet.*, 3: 33—37.
- [7] Monaco, A. P. et al.: 1985. *Nature*, 315: 842—845.
- [8] Read, A. P. et al.: 1988. *Hum. Genet.*, 41: 138—144.
- [9] Xiayuan, H. U. et al.: 1988. *J. of Med. Genet.*, 25: 369—376.