

利用与 PKD1 紧密连锁的微卫星多态性对黑龙江省汉族人群进行 ADPKD 的症前诊断

王禹霄 张承巍 薛继强 毕 敏 李春媚

(哈尔滨医科大学附属第二医院 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的: 利用与 PKD1 紧密连锁的微卫星的多态性对黑龙江省汉族人群常染色体显性遗传性多囊肾病 (autosomal dominant polycystic disease ADPKD) 家系成员进行症状前诊断。方法 扩增 PKD1 基因内部 (KG8) 及基因两侧 (AC2.5、CW4) 共三个微卫星遗传标记, 并采用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测, 银染, 最后进行家系连锁分析。结果 家系 1 中一名男孩携带了 PKD1 突变基因, 处于发病前期。结论 通过连锁分析 ADPKD 进行连锁分析能高效、快捷、准确地进行早期诊断。

关键词 多囊肾病, 常染色体显性遗传, 连锁分析, 基因诊断, 微卫星

中图分类号: R394 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)18-3449-04

Presymptomatic Diagnosis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease in the Hans of Heilongjiang Province by Microsatellites Closely Linked to PKD1

WANG Yu-xiao, ZHANG Cheng-wei, XUE Ji-qiang, BI Min, LI Chun-mei

(The 2nd affiliated hospital of Haerbin Medical University, 150086, Harbin, China)

ABSTRACT Objective: To make the presymptomatic diagnose on the Hans in Heilongjiang province with the microsatellite DNA makers tightly linked with PKD1 gene. **Methods:** The microsatellite DNA makers tightly linked to PKD1 gene were amplified by PCR. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), silver staining and Gene linkage analysis were performed. **Results:** One individual from strip 1 was diagnosed as PKD1 mutation carrier who was in the pre-stage of cyst. **Conclusion:** Early diagnosis with united-application of multi-microsatellite DNA makers are active, quick and accurate after linked analysis

Key words: Polycystic kidney disease; Autosomal dominant; Linkage analysis; Gene diagnosis; Microsatellite

Chinese Library Classification: R394 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)18-3449-04

前言

常染色体显性遗传性多囊肾病 (ADPKD) 是一种常见的遗传病^[1], 在外国发病率为 1/1000~1/600^[2], 约占终末期肾衰病因的 10%, 在我国约有 150~300 万患者。主要病理特征是双侧肾脏分布充满液体的囊肿, 并随年龄的增长而逐渐增大, 造成肾脏结构和功能的损害, 约 50% 的患者在 60 岁左右发展成终末期肾病, 需要肾移植或血液透析治疗^[3], 一般死于尿毒症并发感染或心脑血管意外。由此可见, ADPKD 是一种常见的危害人类健康的疾病, 目前对 ADPKD 仍缺乏有效的治疗手段, 所以早期基因诊断就显得尤为重要^[4]。与 PKD1 基因紧密连锁的标记有 SM6、SM7、KG8、CW2、CW4、AC2.5 等^[5,6], 本文应用 KG8、AC2.5、CW4 对 7 个 ADPKD 家系进行症状前基因诊断。

1 材料和方法

1.1 研究对象

收集我院门诊及住院患者中确诊为 ADPKD 的家系 7 个,

患者 29 例, 均来自黑龙江地区, 均为汉族人, 均得到患者的知情同意权。经肾脏彩超检查诊断为 ADPKD, 确诊标准为^[7] 30 岁以下患者单侧或双侧肾脏有 2 个囊肿以上, 30-59 岁患者双侧肾脏囊肿至少各 2 个, 60 岁以上双侧 1 肾脏至少各 4 个囊肿。如同时具有其他器官 ADPKD 表现 (如肝囊肿), 其肾脏诊断标准适当放宽。超声声像图表现为: 肾脏体积明显增大, 肾内无数个大小不等的囊肿及肾实质回声增强。患者年龄为 9~70 岁, 男女比例为 3:5。

1.2 主要试剂

Relax Geneblood 血液基因组提取试剂盒, 以 KG8、AC2.5、CW4 微卫星设计 PCR 引物 (上海英骏生物技术有限公司提供) 及 2* Taq PCR MasterMix。

1.2.1 电泳试剂 琼脂糖, 30% 丙烯酰胺溶液, 丙烯酰胺, 甲叉丙烯酰胺, 0.5× TBE, 10% 过酸铵, 1% TEMED, EB, 溴化乙锭, 上样缓冲液, 蔗糖 (实验室提供), 去离子甲酰胺, 一, 甲基苯青, 溴酚兰, Maker (TaKaRa 公司)。

1.2.2 银染试剂 2 mmol/L AgNO₃ 溶液, 银染固定液 10% 的乙醇, 0.5% 乙酸, 还原剂 0.74 mmol/L NaOH, 0.1 mmol/L 甲醛。

1.3 主要仪器设备

HZS-H 水溶箱, Biofuge22R 高速离心机 (德国 HER-AEUS), PEKIN ELMER 480 DNA 扩增仪, GIS2010 全自动凝胶

作者简介: 王禹霄 (1981-), 女, 硕士, 住院医师, 主要研究方向: ADPKD 的基因诊断。电话: 0451-86605256, E-mail: Christine2345@163.com (收稿日期: 2011-06-06 接受日期: 2011-06-30)

图像处理系统,电泳仪、水平电泳槽,垂直电泳槽,琼脂糖凝胶电泳装置,垂直电泳装置

1.4 研究方法

1.4.1 基因组 DNA 提取 取晨起空腹静脉血 3 mL ACD 抗凝,加等体积生理盐水(3 mL),轻振混匀,离心 5000 rpm 20 min,加入 2.5 体积预冷的无水乙醇,有白色絮状沉淀物,既为所提取的 DNA,吸出 DNA 沉淀,放入 75 %乙醇的 EPPENDORF 管内,离心 12000 rpm,10 min,弃上清液,室温干燥。加适量 TE (200-500 μ L) 缓冲液,4 $^{\circ}$ C 保存,约 2-4 天 DNA 完全溶解,-20 $^{\circ}$ C 贮存。

1.4.2 PCR 扩增 引物设计(采用 RIGAT 等设计的反应引物)^[8]

KG8 F:5' CTCCCAGGTGGAGGAAGGTG 3'

R:5' GCAGGCACAGCCAGCTCCGAG 3'

AC2.5 F:5' GCAGCCTCAGTTGTGTTTCCTAATC 3'

R:5' GTGCTGGGATTACAGGCATGAACC 3'

CW4 F:5' AAGGCTGGCAGAGGAGGTGA 3'

R:5' CTAATCGGCGGGGAGCTCTA 3'

反应体系为 25 μ L,成分如下:模板 1.5 ng 正引物 1.0 μ L,负引物 1.0 μ L,2**Taq* PCR MasterMix 12.5 μ L,去离子水 9.0 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,58-60 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 32-40 个循环,终末延伸 72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.4.3 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物测定 因反应体系中已含有染料,直接取 5 μ L PCR 扩增产物,进行电泳,40V 恒压,30 min。

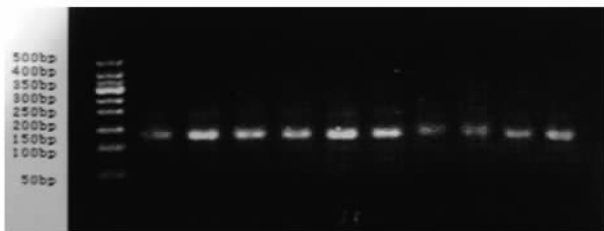


图 1 CW4 的 PCR 产物琼脂糖水平电泳

Fig.1 CW4's PCR productions in gelose horizontal strip electrophoresis

1.4.4 12%聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳 将 PCR 扩增产物,用微量加样器加入加样孔底部,使样品在孔底部成一层。两侧孔中加入 Marker 按 2-10V/CM 电压电泳,电泳 6-8 小时,使片段足够分开,待指示剂走到适当位置后,关闭电源,将胶片取出。分开两块玻璃板,将凝胶片置入 100 mL 银染固定液中轻振 30 分钟,然后将凝胶片转入 100 mL AgNO₃ 溶液中浸泡 20 分钟染色,吸去 AgNO₃ 溶液,用蒸馏水反复漂洗几次,再加入银染还原剂 100 mL 作用 15-30 分钟,待 DNA 带显示清楚时倾去还原液,加 5 %乙酸终止反应。

1.5 基因连锁分析

1.5.1 PCR 产物分子量估计 测定各带的电泳距离,参照分子量大小标记(PBR322/MSP1)各带位置,进行估算。其大小用碱基对数(bp)直接表示。

1.5.2 连锁分析和分子诊断 利用连锁分析对多囊肾病家系成员进行连锁分析和分子诊断。

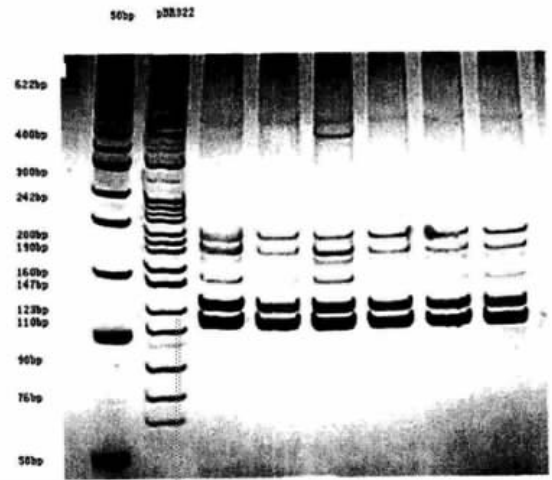


图 2 CW4 PCR 产物 12%聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳

Fig.2 CW4's PCR productions in polyacrylamide gel vertical electrophoresis

2 结果

通过连锁分析发现这些 ADPKD 患者均与 PKD1 连锁,确定如下家系均为 1 型多囊肾病家系,对家系成员进行囊肿前诊断,确定 7 个家系中有 1 名无临床症状且 B 超检查未发现肾脏囊肿的个体为 PKD1 突变携带者,处于囊肿发病前期。现选择其中三个家系图例如下。

家系 1: 1 为先证者,42 岁时发现血尿后经 B 超诊断为多囊肾,追踪其家系,其母亲死于该病,其两个妹妹 3、5 也为多囊肾患者(经 B 超证实)。对家系成员用 KG8、CW4、AC2.5 三个微卫星 DNA 为遗传标记,找出与 PKD1 连锁的单体型为 KG8 PCR 产物电泳的第二片段, CW4 的第二片段及 AC2.5 的第一片段。1、3、5 遗传了单体型 221,均为诊断明确的 ADPKD 患者。1(15 岁男孩)从其母遗传了与 PKD1 连锁的单体型 221,故为 PKD1 携带者,将来可能会发病。

家系 2: 3 为先证者,该患者经消化内科诊断为多囊肝后查肾脏 B 超诊断为多囊肾。追踪其家系其母为多囊肾患者,并死于此病。发现其妹 6 及其哥的儿子 2 也为多囊肾(经 B 超证实)。对家系成员选用 KG8、CW4、AC2.5 三个微卫星 DNA 为遗传标记,此家系中与 PKD1 连锁的单倍体型为 KG8 PCR 产物第二片段, CW4 的第三片段, AC2.5 的第二片段。遗传了单倍体型 232 的 3、6、2 均为诊断明确的 ADPKD 患者。表明单倍型 232 与 PKD1 连锁。5、3、4、5、1 未遗传单倍型 232,则不携带 PKD1 基因,将来也不会发病。

家系 3: 2 为先证者,腹胀腹痛肉眼血尿就医,后经 B 超诊断为多囊肾,后追问家族史,其父患该病,且死于多囊肾病。其弟 7,其妹 8,来院经 B 超诊断也为未有临床表现的多囊肾患者。对家系成员选用 KG8、CW4、AC2.5 三个微卫星 DNA 为遗传标记,此家系中与 PKD1 连锁的单倍体型为 KG8 PCR 产物第三片段, CW4 的第一片段, AC2.5 的第二片段。遗传了单倍体型 312 的 2、7、8 均为诊断明确的 ADPKD 患者。表明单倍型 312 与 PKD1 连锁。1、2、3 未遗传单倍型 312,则不携带 PKD1 基因,将来也不会发病。在选取的其他家

系中,均能根据家系连锁分析作出诊断,且均与 PKD1 连锁,在此不一一举例。

3 讨论

对有发病风险的 ADPKD 家系成员尽早作出诊断,从而进行医疗监护,避免或延缓肾功能失代偿的出现,降低患儿出生率,是当前我们医疗研究人员共同努力的方向。间接的连锁分析仍是分子诊断的主要手段^[9]。间接连锁分析是最早用于 ADPKD 基因定位和基因诊断的方法,并一直被广泛应用。随着杂合性更高的 STR 遗传标记的应用, RFLP 逐渐被 STR 所替代^[10]。

STR 在基因组中广泛存在,是以 2~7 个碱基为核心单位串联重复而成的一类序列,又称为微卫星 DNA (microsatellite DNA)^[11]。由于核心序列重复数目的变化而在群体中呈现出遗传多态性,但在同一家系内具有高度的遗传保守性,以孟德尔方式遗传^[12]。陆续发现 PKD1 和 PKD2 基因的內部和侧翼,存在若干具有高度多态性的微卫星 DNA 与之连锁(KG8、SM6、CW2、CW4、AC2.5、D4S423、D4S1534、D4S1563)^[13,14]。STR 为遗传标记有两个突出的优点 (1) 高度多态和高频率; (2) STR 以 PCR 技术为基础,可于基因座两端设计引物,进行 PCR 扩增,可实现机械化、自动化。但仍有缺点 (1) 需电泳分型,难于大规模检测 (2) 有些 STR 基因难于进行基因型判定。其次 PCR 扩增所需样本 DNA 量少,加之高度的多态信息含量,为开展症状前诊断奠定了基础。本实验就是应用微卫星 DNA 对 ADPKD 家系进行症状前诊断。

影响连锁分析的因素 (1) 基因座的选择: ① 本实验就选用 PIC 高的微卫星 DNA, KG8、CW4、AC2.5。② 遗传标记的遗传距离: 遗传标记越靠近致病基因,遗传距离越小,重组率越低,越能满足分析要求,本实验所选的 KG8 就是。③ ADPKD 的家系结构: 每个 ADPKD 家系至少由两代家系成员,每代至少有两个患者。④ 等位基因频率 ⑤ 重组频率 ⑥ 遗传异质性: ADPKD 具有遗传异质性。通过 RFLP 家系连锁分析,发现 85%~90% 的 ADPKD 患者是由于 PKD1 突变所致,其余的大部分有 PKD2 突变所致^[15,16],并认为 ADPKD 存在着第 3 位点的突变^[17],但目前 PKD3 未定位^[18]。因此在连锁分析是,需要设计 PKD1 和 PKD2 位点的探针或引物,分别进行分析。

本研究选用了 KG8、CW4、AC2.5 这三个微卫星对 7 个 ADPKD 家系进行了基因诊断。发现这 7 个家系均与 PKD1 连锁。由于 ADPKD 基因的复杂性和突变位点的不确定性,连锁分析仍为目前 ADPKD 基因诊断的主要手段。ADPKD 症前诊断的快捷准确可以广泛在临床推广的方法还有待于进一步研究。

4 结论

1) 微卫星 KG8、AC2.5、CW4 对 ADPKD 家系具有基因诊断意义。

2) 联合应用多个微卫星标记对 ADPKD 进行基因连锁分析,能有效进行早期诊断,有利于早期预防延缓肾功能恶化,并使生殖再选择成为可能。

参考文献(References)

- [1] Harris PC, Torres VE. Polycystic kidney disease [J]. Annu Rev Med. 2009;60:321-337

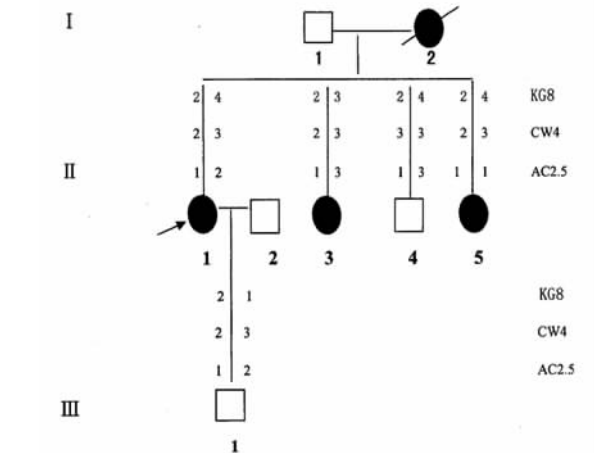


图3 家系1图谱:方型代表男性,圆形代表女性,白色代表健康,黑色代表患病

Fig.3 Stirp of genealogy 1: Square-Male, Rotundity-Female, White-Healthy, Black-Patient

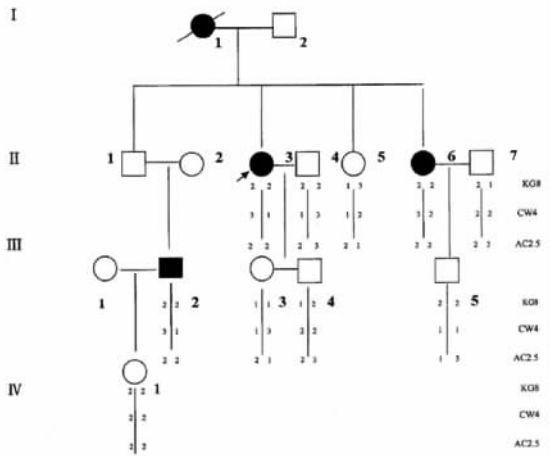


图4 家系2图谱:方型代表男性,圆形代表女性,白色代表健康,黑色代表患病

Fig.4 Stirp of genealogy 2: Square-Male, Rotundity-Female, White-Healthy, Black-Patient

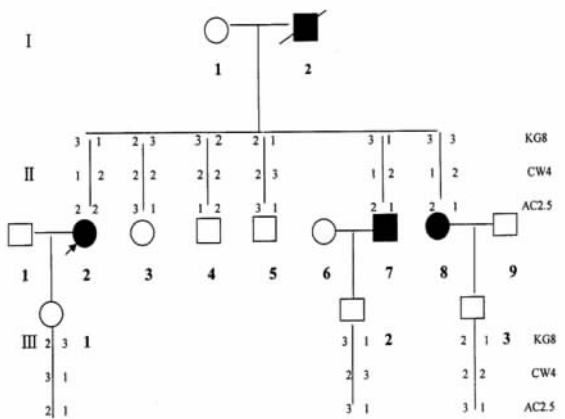


图5 家系3图谱:方型代表男性,圆形代表女性,白色代表健康,黑色代表患病

Fig.5 Stirp of genealogy 3: Square-Male, Rotundity-Female, White-Healthy, Black-Patient

- [2] Gabow PA, Polycystic kidney disease: Clues to pathogenesis[J]. *Kidney Int*, 1991,40(6):989-996
- [3] Gabow PA, Johnson AM, Kaehny WD, et al. Factors affecting the progression of renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 1992,41(5):1311-1319
- [4] Mangos S, Lam PY, Zhao A. The ADPKD genes *pkd1a/b* and *pkd2* regulate extracellular matrix formation [J]. *Dis Model Mech*, 2010, 3 (5-6):354-365
- [5] Torres MJ, Rodríguez PJC, Hernández SCR. Molecular diagnosis of adult dominant polycystic kidney disease in the Canary Islands[J]. *Nefrologia*, 2006,26(6):666-672
- [6] Ravine D, Gibson RN, Walker RG, et al. Evaluation of ultrasonographic diagnostic criteria for autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. *Lancet*, 1994,343(1 6): 824-827
- [7] Tan YC, Blumenfeld J, Rennert H. Autosomal dominant polycystic kidney disease: Genetics, mutations and microRNAs [C]. *Biochim Biophys Acta*, 2011
- [8] Peral B, Ward CJ, San Millan JL, et al. Evidence of disequilibrium in the Spanish polycystic kidney disease population. *Am J Hum genet*[J]. 1994,54(5):899-908
- [9] Yu CW, Zhang SZ. Recent advances in studies on autosomal dominant adult polycystic kidney disease[J]. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 2010, 27(4):402-405
- [10] Ariza M, Alvarez V, Marin R. A family with a milder form of adult dominant polycystic kidney disease not linked to the PKD1 (16p) or PKD2 (4q) genes[J]. *MedGenet*, 1997,34(7):587-589
- [11] Barua M, Pei Y. Diagnosis of autosomal-dominant polycystic kidney disease: an integrated approach [C]. *Semin Nephrol*, 2010, 30 (4): 356-365
- [12] Harris PC, Rossetti S. Molecular diagnostics for autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2010, 6(4):197-206
- [13] Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, et al. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein [J]. *Science*, 1996,272: 1339-1346
- [14] Hateboer N, Veldhuisen B, Peters D, et al. Location of mutations within the PKD2 gene influences clinical outcome [J]. *Kidney Int* 2000,57 :1444-1451
- [15] Bataille S, Demoulin N, Devuyst O, et al. Association of PKD2 (Polycystin 2) Mutations With Left-Right Laterality Defects [J]. *Am J Kidney Dis*, 2011 [Epub ahead of print]
- [16] Fick GM, Gabow PA. Hereditary and acquired cystic disease of the kidney [J]. *Kidney int*, 1994,46(4) :951-964
- [17] Ariza M, Alvarez V, Marin R, et al. A family with a milder form of autosomal dominant Polycystic kidney not linked to the PKD 1 (16p) or PKD2 (4q) genes[J]. *MedGenet*, 1997,34(7):587-589
- [18] Hoefele J, Mayer K, Scholz M, et al. Novel PKD1 and PKD2 mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Nephrol Dial Transplant*[J]. 2011, 26(7):2181-2188

(上接第 3468 页)

- [10] Boemi M, Simlla C, Fumelli P. Renal disease as a determinant of increased lipoprotein(a) concentrations in diabetic patients[J]. *Diabetes Care*, 1999,22(12):2033
- [11] Clodi M, Oberbauer R, Bodiaj G. Urinary excretion of apolipoprotein (a) fragments in type 2 diabetes mellitus patient [J]. *Metabolism*, 2002,48(3):369
- [12] Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) research group. The effect of intensive treatment of diabetes in the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus[J]. *New England Journal of Medicine*, 1993, 329:977-986
- [13] Romano N. Blood glucose in relation to blood pressure control as risk factors in the progression of renal damage in type 2 diabetes. *International Congress Series*. 2000,1253:295 -299
- [14] 侯旭宏, 王建华, 冯凭. 2 型糖尿病血糖控制情况与合并肾病的关系[J]. *中华流行病学杂志*, 2000,4(21): 263 -265
Hou Xuhong, Wang Jianhua, Feng Pin. The relationship between blood glucose control and diabetic nephropathy with type 2 diabetes [J]. *Chinese journal of epidemiology*, 2000,4 (21): 263-265
- [15] 滕香宇, 杨永年, 谭燕, 等. 1059 例 2 型糖尿病患者糖尿病肾病患病率及其相关危险因素[J]. *中国糖尿病杂志*, 2002,9(3):131-135
Teng Xiangyu, Yang Yongnian, Tan Yan, et al. Prevalence of diabetic nephropathy of 1059 cases with type 2 diabetes and its correlated risk factors[J]. *Chinese journal of diabetes*, 2002,9(3):131-135
- [16] 罗敏, 贾秀娟. 糖尿病肾病的抗高血压治疗[J]. *基础医学与临床*, 2003,23(4):263-265
Luo Min, Jia Xiujuan. Management of hypertension in patients with diabetic nephropathy [J]. *Basic and clinical medicine*, 2003,23 (4): 263-265
- [17] Naziwek Siewniak B, Moczulski D, Grzeszczak W. Risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: Results of longitudinal study design [J]. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 2002, 16: 271-276