文章编号:1000-5404(2005)16-1678-03

论著

Klinefelter综合征X染色体着丝粒区α-卫星DNA变异

李 恬,翁亚光,王应雄,何俊琳,刘学庆,陈雪梅 (重庆医科大学生殖医学系遗传优生室,重庆 400016)

提 要:目的 从DNA分子水平建立研究X染色体着丝粒区域的α-卫星DNA变异的方法,发现Klinefelt综合征患者的X染色体着丝粒区域的α-卫星DNA串联重复序列结构变化与染色体不分离的关系。**方法** 采用(representative sampling of multiple repetitive units, rep)PCR方法,通过设计适当的引物,对α-卫星DNA多个单拷贝串联重复序列同时进行扩增,检测重复序列中结构变化的种类、频率及重组位点。**结果** 首次发现由缺失产生的562 bp和220 bp变异片段和重组位点,异常组的570、562、220 bp构成显著高于正常组($P<0.05$)。Logistic回归分析显示:570、562 bp和220 bp 3个短片段同时出现和任两个短片段同时出现均是疾病相关的危险因素。**结论** Klinefelt综合征的X染色体着丝粒区α-卫星DNA过多的重组可能是造成X染色体不分离的重要原因之一。

关键词: 聚合酶链反应;Klinefelt综合征;α-卫星DNA;不等交换

中图法分类号: R394-33;R394.2;R691.102 **文献标识码:** A

Variation of alpha satellite DNA in X chromosome centric region of Klinefelter syndrome

LI Tian, WENG Ya-guang, WANG Ying-xiong, HE Jun-lin, LIU Xue-qing, CHEN Xue-mei (Department of Reproductive Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To establish an effective method that can be used in study on variation of X chromosome centromeric DNA and to investigate the relationship between the variation of centromeric alpha satellite repeat unit on Klinefelter syndrome X chromosome and nondisjunction of the human X chromosome. **Methods** Representative sampling of multiple repetitive units PCR (rep PCR) and DNA sequence analysis were respectively used to investgate the molecular basis of X chromosome alpha satellite repeat unit variation by designing proper primers, and the frequency and position of new "hot" recombination breakpoint were detected. **Results** 1 774 bp, 570 bp and 1 410 bp, 562 bp, 220 bp DNA segments existed in normal individual and Klinefelt syndrome, but the frequency of 570 bp, 583 bp and 220 bp PCR product bands in Klinefelt syndrome were significantly higher than that in normal individuals. The result of logistic regression analysis indicated that appearance of three or two short fragments together was a risk factor of aneuploidy formation. **Conclusion** More frequency of the genetic recombination in X chromosome centromeric alpha satellite DNA plays a role in nondisjunction of the Klinefelter syndrome X chromosome.

Key words: PCR; Klinefelter syndrome; alpha satellite DNA; homologous unequal crossing over

着丝粒是在细胞分裂的过程中与纺锤丝微管连接的一个重要部位,它包括着丝粒DNA和着丝粒蛋白两个重要成分,其中α-卫星DNA是目前发现的唯一的一个存在于所有人类染色体着丝粒区域的卫星DNA家族[1,2],其基本组成单位为一个171 bp DNA片段的单体,多个单体组成一个单拷贝的串联重复序列,再由多个单拷贝的串联重复序列组成α-卫星DNA。然而,不同染色体着丝粒区域的α-卫星DNA串联重复序列的拷贝数不同,一个单拷贝的串联重复序列中171 bp单体的数目以及171 bp单体片段的核苷酸组成也不同[3]。因此,可利用不同染色体着丝粒区域的α-卫星DNA结构上的差异,分别对不同的染色体着丝粒DNA结构变异进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

实验对象:异常组为20~39岁之间的Klinefelter综合征个体32例(病例来源于重庆医科大学附属医院和市内部分医

基金项目: 国家自然科学基金资助面上项目(30371485),重庆市教委资助项目(2000-12)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371485) and the Research Funds of the Education Committee of Chongqing (2000-12)

作者简介: 李 恬(1976-),女,重庆市人,硕士,医师,主要从事遗传学方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68485001

通讯作者: 翁亚光,电话:(023)68485001,E-mail:wengyg@sina.com

收稿日期: 2004-11-22;**修回日期:** 2005-03-04

院);正常组为无亲缘关系的正常女性个体 46 例和男性个体 48 例(染色体核型正常)。每例标本抽取外周血 2 ml,提取基因组 DNA,测 D(260)值,调节 D(260)值使其为(0.53 ± 0.04)[(A(260)/A(280)均为 1.8 ~ 1.9),-20 ℃保存备用。

1.2　方法

1.2.1　引物的设计　　参照 Warburton 等[1] 设计和 X 染色体 α-卫星 DNA 序列(GenBank: X02418.1 GI: 36361)变化的特点,筛选和设计了两对引物。

引物 1:FP:5′-AAGCCTTTTCCTTTATCTTCACA-3′
RP: 5′-CTGAGAATGCTTCCGTTTGCC -3′
引物 2: FP: 5′-ATTCTCAGAAAGTTTTCTGC -3′
RP: 5′-ATAACGAATGTTCAGCTCCC-3′

1.2.2　(rep)PCR 反应　　每个样本分别进行 2 个独立的 PCR 反应,50 μl PCR 反应体系。反应参数 94 ℃变性 5 min;94 ℃ 变性 50 s、60 ℃复性 1 min、72 ℃延伸 2 min、30 次循环;72℃延伸 7 min。扩增产物用 1.5 % 的琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统中分析并记录、保存试验结果。

每次 PCR 反应和电泳均设空白对照和阳性对照。空白对照为反应体系中不加模板,防止假阳性。阳性对照为扩增出各种长短片段的标本(这些片段已经测序证实为目的片段),防止假阴性。将短片段 DNA 回收后分别用相同的引物和另一引物做 rep PCR,再次验证其是否为特异目的片段,并克隆测序(上海生工)。

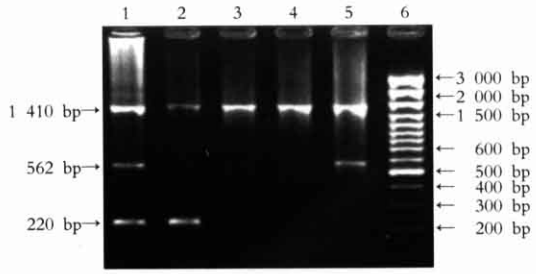
1.3　统计学处理

利用 SAS 软件包 FREQ 过程进行计数资料的 χ^2 检验和逐步 logistic 回归分析。

2　结果

2.1　PCR 结果

2.1.1　引物 1 扩增结果　　引物 1 扩增出 1 410、562、220 bp 片段(图 1),分别回收片段作为模板,用引物 1 再做 PCR,未发现 1 410 bp 片段。同样的提取模板用引物 2 无法得到任何片段,再次验证 562 bp 和 220 bp 片段是引物 1 扩增的目的片段。



1: The patient showing 1 410 bp, 562 bp and 220 bp; 2 - 5: Normal individuals, all showing 1 410 bp, 2 showing 220 bp, 3,4 not showing 562 bp or 220 bp, 5 showing 562 bp; 6: Marker

图 1　人 X 染色体着丝粒区 α-卫星 DNA 引物 1 rep PCR 产物凝胶电泳图

Fig 1　PCR products of X chromosome centromeric alpha satellite DNA controls using primer 1

2.1.2　引物 2 扩增结果　　引物 2 扩增出 1 774 bp 和 570 bp 片段(图 2)。再提取该片段作为模板,用引物 2 再次做 PCR,未发现 1 774 bp 片段,只扩增出相应的模板片段,同样的提取模板用引物 1 无法得到任何片段。

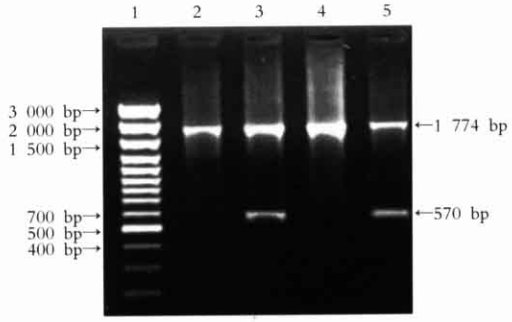
2.2　异常组与正常男性组、正常女性组的短片段出现率的比较(表 1)

表 1　异常组与两个正常组的短片段出现率(%)比较

Tab 1　Constituent ratio of short fragments between Klinefelter syndrome patients and normal karyotype controls (%)

Group	570 bp	220 bp	562 bp
Normal male	45.83 *	45.83 *	50.00 *
Normal female	47.83 *	41.30 *	45.65 *
Patients	87.50	71.88	90.63

*: $P<0.01$, *vs* patients



1: Marker; 2, 3: Normal individual; 4, 5: Patients; 3, 5: Showing 570 bp; 2, 4: Not showing 570 bp

图 2　人 X 染色体着丝粒区 α-卫星 DNA 引物 2 rep PCR 产物凝胶电泳图

Fig 2　PCR products of X chromosome centromeric alpha satellite DNA controls using primers 2

2.3　3 个短片段与异常组、正常组的相关性分析

经逐步 logistic 回归分析显示:562、220、570 bp 3 个短片段同时出现的 3 个片段数(3P)和任 2 个片段同时出现的两个片段数(2P)均是与疾病相关的危险因素。1P 和 0P 的效应值按 $\alpha=0.05$ 的显著标准无法进入 logistic 回归模型,故被剔除。另外,性别因素的效应值按 $\alpha=0.05$ 的显著标准也无法进入 logistic 回归模型,故被剔除。

2.4　3 个短片段测序结果

将 562 bp 和 220 bp 片段分别经 A-T 克隆后测序与 1 410 bp 序列对照,570 bp 与 1 774 bp 序列对照,找到了相应的重组位点。

562 bp 重组位点为第 12 和第 5 个单体区处,序列如下:

5-AAGCCTTTTCGCTTTATCTTCACAGAAAGACGAGAGAGAAGCATTGTCAG
AAACTTCTTTGTGATGATTGCATTCAACTCACAGAGTTGAACAATCCTTTTGAT
GGAGCAGTTTTGAAACCCTCTTTCTTTGGAATCTGCAAGGGGATATGTGG——
GGCAAACGGAAGCATTCTCAG-3

220 bp 重组位点为第 1 和第 8 个单体区处,序列如下:

5-AAGCCTTTTCGCTTTATCTTCACAGAAAGACGAGAGAGAAGCATTGTCAGG
AACTTCTTTGTG——ACCTCTTTGAAGGTTTCGTTGGAAACGGGATAATCTTCACC
TAAAAGGCAAACGGAAGCATTCTCAG-3

570 bp 重组位点为第 1 和第 6 个单体区处,序列如下:

ATTCTCAGAAAGTTTTCTGCGATGACTGCATTCAACTCACAGAGTTGAACAA
TCCTTCTGATGGAGCAGTTTTGAAACCCTCAAACAGAAGCATTCTCGGAAACTAC
TTTGTGATGTTTGTATTCACCTCAC——GGGAGCTGAACATTCGTTAT

3 讨论

X 染色体全部着丝粒区 α-卫星 DNA 约含1 500个单拷贝串联重复序列，每个单拷贝串联重复序列的长度约为 2 kb，含 12 个 171 bp 单体，各单体之间的核苷酸种类约有 35 % 的差异[1,4]。如果 X 染色体着丝粒区 α-卫星 DNA 发生重组，会造成单拷贝串联重复序列长度的改变。可能会影响着丝粒蛋白的正常附着，最终导致染色体不能正常分离[5,6,7,9,10]。

Klinefelt 综合征是临床上最常见的 X 染色体非整倍体畸变类型之一，但至今对本病的发生的遗传机制了解不多[8,10]。目前国内外少见从分子水平对非整倍体畸变的 X 染色体着丝粒区 α-卫星 DNA 进行研究的报道，为此我们采用(rep) PCR (representative sampling of multiple repetitive units) PCR，等方法[1] 对 Klinefelt 综合征(47，XXY)个体及染色体正常个体的 X 染色体着丝粒区 α-卫星 DNA 串联重复序列进行分析。

Warburton 等[1,4] 曾利用本研究中的引物 2 对 Hybrid 细胞 X 染色体着丝粒 α-卫星 DNA 进行研究，他们认为串联重复序列中 171 bp 的单体数目发生变异而产生了短片段，可能是由于细胞分裂时染色单体不等交换所致。由于该引物只针对每个 2 kb 单拷贝的串联重复序列的 12 个单体中的 10 个单体进行扩增，此区域以外发生的 DNA 重组将无法检测。

本研究参照 Warburton 等设计的引物，根据人 X 染色体着丝粒区 α-卫星 DNA 文库提供的序列和引物设计原则我们设计两对引物进行(rep)PCR，其扩增区域包括了每个 2 kb 重复单位，可以对整个 X 染色体着丝粒区 α-卫星 DNA 多个重复单位同时进行扩增。

我们利用两对引物进行扩增的产物中，除了 1 774 bp 和 1 410 bp 片段外，还出现了 562、220、570 bp 片段，这些短片段的出现说明了在 X 染色体着丝粒区 a-卫星 DNA 的 2 kb 单拷贝重复序列内出现了 DNA 片段的重组，562、220、570 bp 片段重组断裂点分别位于第 12 和第 5 单体内、第 1 和第 8 单体内和第 1 和第 6 单体间。重组的断裂点集中在几个单体内的现象提示：这些位点很可能是环境的致畸因素对 X 染色体着丝粒 α-卫星 DNA 作用的敏感部位或“热点”。

我们的研究发现，Klinefelt 综合征的 X 染色体着丝粒区 α-卫星 DNA 表现出较正常人受累的比例更高，且 3 个短片段同时出现和任两个片段同时出现均是疾病相关的危险因素，且男性 3 个短片段同时出现的优势比大于任两个短片段同时出现的优势比。我们认为 X 染色体着丝粒区 α-卫星 DNA 中因重组而造成部分单拷贝中的单体缺失，随着缺失程度的增加，X 染色体发生不分离的风险可能越高。因此在临床上加强对重组 DNA 片段的检测，特别是加强 Klinefelt 综合征亲属生育前和产前外周血淋巴细胞重组片段的检测，在双亲中同时出现 570、562、220 bp 3 个短片段和任两个片段，应建议在孕期保健和产前进行羊水或绒毛的染色体诊断，主动预防 Klinefelt 综合征的发生，降低 Klinefelt 综合征的发生率。

参考文献：

[1] Warburton P E, Willard H F. PCR amplification of tandemly repeated DNA: analysis of intra- and interchromosomal sequence variation and homologous unequal crossing-over in human alpha satellite DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1992, 20(22): 6033 - 6042.

[2] 黄 蕾，夏家辉. 人类着丝粒结构及功能研究进展[J]. 国外医学遗传学分册，2000，23(1)：1 - 4.

[3] Rosandic M, Paar V, Basar I. Key-string segmentation algorithm and higher-order repeat 16mer (54 copies) in human alpha satellite DNA in chromosome 7[J]. J Theor Biol, 2003, 221(1): 29 - 37.

[4] Warburton P E, Greig G M, Haaf T, *et al*. PCR amplification of chromosome-specific alpha satellite DNA: definition of centromeric STS markers and polymorphic analysis[J]. Genomics, 1991, 11(2): 324 - 333.

[5] Lo A W, Liao G C, Rocchi M, *et al*. Extreme reduction of chromosome-specific alpha-satellite array is unusually common in human chromosome 21[J]. Genome Res, 1999, 9(10): 895 - 908.

[6] Politi V, Perini G, Trazzi S, *et al*. CENP-C binds the alpha-satellite DNA *in vivo* at specific centromere domains[J]. J Cell Sci, 2002, 115 (Pt 11): 2317 - 2327.

[7] Hsu F C, Wang C J, Chen C M, *et al*. Molecular characterization of a family of tandemly repeated DNA sequences, TR-1, in heterochromatic knobs of maize and its relatives[J]. Genetics, 2003, 164(3): 1087 - 1097.

[8] Abramsky L, Hall S, Levitan J, *et al*. What parents are told after prenatal diagnosis of a sex chromosome abnormality: interview and questionnaire study [J]. BMJ, 2001, 322(2): 463 - 466.

[9] Rudd M K, Mays R W, Schwartz S, *et al*. Human artificial chromosomes with alpha satellite-based de novo centromeres show increased frequency of nondisjunction and anaphase lag[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(21): 7689 - 7697.

[10] Okada H, Fujioka M, Tatsumi N, *et al*. Klinefelter's syndrome in the male infertility clinic[J]. Hum Reprod, 1999, 14(3): 946 - 952.

[11] Masumoto H, Nakano M , Ohzeki J. The role of CENP-B and alpha-satellite DNA: de novo assembly and epigeneticmaintenance of human centromeres[J]. Chromosome Res, 2004, 12(6): 543 - 556.

(编辑 栾 嘉)