论著

文章编号:1000-5404(2005)13-1374-03

变性高效液相色谱法在FALS突变位点检测中的应用

胡 俊[1],史树贵[1],李露斯[1],吴玉章[2],倪 兵[2] (第三军医大学:[1]西南医院神经内科,[2]基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 检测一个肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)家系的铜、锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn superoxide dismutase, SOD1)基因的突变位点,同时观察变性高效液相色谱法(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)的实用价值。**方法** 对PCR-SSCP检测阴性的外显子,应用DHPLC法及DNA直接测序技术,再次进行SOD1基因的突变位点检测。**结果** 经DHPLC检测,家系成员Ⅲ$_1$ SOD1基因的第4外显子有突变峰,DNA直接测序证实存在杂合子,发生了GAA→GGA错义突变,使编码的氨基酸由谷氨酸变为甘氨酸。**结论** DHPLC技术与PCR-SSCP相比有更高的敏感性,可作为大样本筛查突变位点的一种便捷可靠手段。

关键词: 家族性肌萎缩侧索硬化症;铜、锌超氧化物歧化酶;变性高效液相色谱法;突变
中图法分类号: R394-33; R446.9; R746.4 **文献标识码:** A

Denaturing high performance liquid chromatography for detection of point mutation of familial ALS

HU Jun[1], SHI Shu-gui[1], LI Lu-si[1], WU Yu-zhang[2], NI Bing[2] ([1]Department of Neurology, Southwest Hospital, [2]Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To identify the point mutation of Cu/Zn superoxide dismutase(SOD1) gene in an amyotrophic lateral sclerosis(ALS) family and observe the value of denaturing high performance liquid chromatography(DHPLC). **Methods** DHPLC and DNA sequencing were used to examine SOD1 gene of the ALS family which had not been found mutation by PCR-SSCP. **Results** DHPLC tests proved double peaks in one member(Ⅲ$_1$), Which indicated the possibility of mutation in SOD1 exon 4. DNA sequencing revealed that there was a heterozygote, with mutation of GAA to GGA in exon 4, and with a substitution of glutacid by glycine. **Conclusion** As compared with PCR-SSCP, DHPLC technique has proved to be a rapid and reliable method for screening mutation site in large samples.

Key words: familial amyotrophic lateral sclerosis; Cu/Zn superoxide dismutase; denaturing high performance liquid chromatography; mutation

我们在重庆地区发现1个常染色体显性遗传的肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)家系[1],该家系涉及4代,受累患者多达14人。我们采用PCR-SSCP方法,对该家系成员的铜、锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn superoxide dismutase, SOD1)基因的5个外显子进行突变位点的筛查,发现家系成员Ⅱ$_5$、Ⅲ$_1$、Ⅲ$_3$、Ⅲ$_{13}$、Ⅲ$_{20}$、Ⅳ$_1$、Ⅳ$_{20}$的第2外显子和家系成员Ⅲ$_1$、Ⅲ$_{11}$、Ⅲ$_{20}$第5外显子存在突变,并经过测序证实[2]。为了进一步了解该家系成员是否还存在其它类型突变,我们通过变性高效液相色谱法(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC),对采用PCR-SSCP方法未发现突变的SOD1基因第1~5外显子再次进行筛选,并对筛查到的杂合片段进行序列测定。

1 对象和方法

1.1 研究对象

1.1.1 FALS家系 受检的家系来自于重庆市潼南县,该家系的临床表型与目前已明确的突变引起的临床表型有较大不同(图1),主要表现在:①起病年龄分布范围较大,最大为43岁,最小20岁,平均30.3岁,无明显遗传早发现象;②以下运动神经元损害为主要临床表现,躯干及四肢肌肉明显萎缩,以肢体末端肌肉萎缩最显著,后期手足畸形呈"爪形手"、"弓形足";③上运动神经元损害轻微;④发病后存活期相对较长,在6例已死亡的患者中,平均病程12年。根据El Escorial ALS国际诊断标准[3]及辅助检查结果,该家系成员符合ALS诊断标准。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300116)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300116)
作者简介:胡 俊(1978-),男,湖北省襄樊市人,博士研究生,医师,主要从事神经系统疾病方面的研究。电话:(023)68754424
通讯作者:史树贵,电话:(023)68765254,E-mail: southwestneuro@163.com
收稿日期:2004-12-30;修回日期:2005-01-22

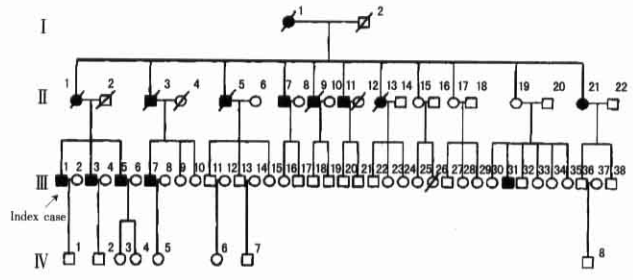


图 1　患者家系图

Fig 1　Pedigree of the case

1.1.2　对照组　　来源于我院神经内科门诊散发 ALS 男性患者 3 例,正常健康志愿者 5 名(男 3 例、女 2 例),年龄、性别与家系内 ALS 患者相匹配。

1.2　方法

1.2.1　外周血 DNA 提取　　静脉血 5 ml,采用 Roche 哺乳动物外周血 DNA 抽提试剂盒提取基因组 DNA。

1.2.2　SOD1 基因第 1 ~ 5 外显子的体外扩增　　以基因组 DNA 为模板,采用针对 SOD1 基因 5 个外显子的引物[4] 对 5 个外显子分别进行 PCR 扩增。反应体系:50 μl PCR 反应体系中加入基因组 2 μg,引物(20 μmol/L) 0.5 μl,dNTP 1 μl,10 × PCR 缓冲液 5 μl,1.25 U Probest 高保真聚合酶。

反应条件为 95 ℃变性 10 min 后进入主循环,即 94 ℃ 1 min,57 ℃退火 40 s,70 ℃ 30 s,35 个循环后,72 ℃延伸 10 min。反应结束后,取 PCR 产物 3 μl,经溴化乙锭染色,1.5%琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 扩增产物的特异性,用 PCR marker 测 PCR 产物片段大小。

1.2.3　DHPLC 检测　　首先将所有 PCR 产物纯化,然后在 Traisgenomic 公司的 WAVE-DNA 片段分析仪上进行分析。流动相的组成为,缓冲液 A:100 mmol/L 三乙基乙二氨四乙酸(triethylamineacetate, TEAA),0.1 mmol/L 乙二氨四乙酸(EDTA)(pH 7.0);缓冲液 B:25%(体积分数)乙腈(acetonitrile)(乙腈:蒸馏水 = 1:4),100 mmol/L TEAA(pH 7.0)。洗脱温度根据软件分析序列的理论分离温度,摸索出最佳的温度进行检测。

1.2.4　DNA 直接测序分析　　采用 ABIPRISM377 全自动序列分析仪对 1 例正常人、1 例散发 ALS 患者及经 DHPLC 检测有异常改变者的 SOD1 基因的 PCR 产物直接进行 DNA 序列分析。

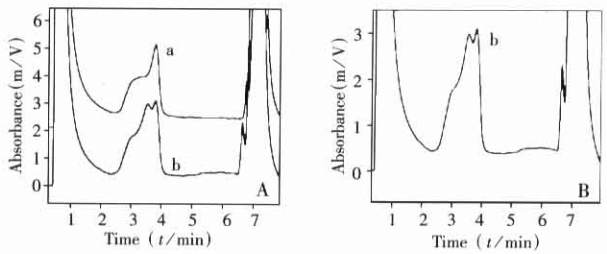
2　结果

2.1　DHPLC 检测

SOD1 基因检测结果表明,家系成员 $Ⅲ_1$ 与野生型混合时在第 4 外显子出现双峰,将家系成员 $Ⅲ_1$ 第 4 外显子单独检测亦出现双峰,提示第 4 外显子存在杂合子(图 2),家系成员和对照组的其它外显子检测均为单峰,提示无突变。

2.2　DNA 直接测序

DHPLC 检测显示家系成员 $Ⅲ_1$ SOD1 基因第 4 外显子存在杂合子,对该外显子 PCR 产物进行 DNA 直接测序分析,正向测序发现其 DNA 局部存在 GAAGAT 和 GGAGAT 两种序列,反向测序发现该外显子局部存在 CTATTC 和 CTATCC 两种序列,与正向测序结果逆向互补。前一种序列与 GeneBank 中的第 4 外显子序列一致,后一种序列发生了碱基的替换。随机送检的两个家系内成员的 SOD1 基因第 4 外显子测序结果与 GeneBank 中的第 4 外显子序列一致。



a: control; b: family member $Ⅲ_1$. A: Mixed with wild type; B: Detected alone

图 2　家系成员 $Ⅲ_1$ SOD1 基因第 4 外显子的 DHPLC 结果

Fig 2　Exon 4 of SOD1 gene in the family member $Ⅲ_1$ by DHPLC

3　讨论

家族性肌萎缩侧索硬化症(familial amyotrophic lateral sclerosis, FALS)是一种慢性进行性运动神经元变性疾病,选择性侵犯上、下运动神经元[5]。约 20% ~ 50%的 FALS 为常染色体显性遗传,基因定位于 21 号染色体长臂(21q22.1-22.2),认为是由于 SOD1 基因突变所致[6]。目前已发现的与 FALS 相关的 SOD1 基因突变类型多达 100 种以上[7],各种不同的 SOD1 基因突变可引起 FALS 患者不同的临床表型。我们在重庆地区发现的这一家系,与目前文献报道的家系具有不全相同的临床表型,因此推测该家系是 FALS 的一种新类型,可能出现新的突变 SOD1 基因。我们通过 PCR-SSCP 法研究发现,部分家系成员 SOD1 基因的第 2 外显子编码区和第 5 外显子的非编码区发生了碱基插入突变,这是一种新的 SOD1 基因突变类型,第 2 外显子编码区的突变可能是引起该家系发病的原因。

但 PCR-SSCP 方法影响因素较多,需要反复摸索条件,工作量大,且突变的检出率相对较低[8]。因此对 PCR-SSCP 方法未发现突变的家系成员 SOD1 基因其它外显子,我们采用 DHPLC 法再次进行突变位点的筛查,发现在家系成员 $Ⅲ_1$ SOD1 基因第 4 外显子在单独或与野生型混合检测时,均出现色谱峰的个数和峰的对称性改变,呈现杂合子色谱。初步考虑家系成员 $Ⅲ_1$ 在 SOD1 基因第 4 外显子上可能存在一个突变位点。此后又采用 DNA 直接测序方法,正向测序发现家系成员 $Ⅲ_1$ SOD1 基因第 4 外显子局部存在 GAAGAT 和

GGAGAT 两种序列，前一种序列与 GeneBank 中的第 4 外显子序列一致，后一种序列发生了 GAA→GGA 错义突变。反向测序发现该外显子局部存在 CTATTC 和 CTATCC 两种序列，与正向测序结果逆向互补。该突变位于 SOD1 基因第 4 外显子编码区，导致 SOD1 编码的氨基酸由谷氨酸变为甘氨酸，故此突变可能为病理突变。但我们仅在家系成员 $Ⅲ_1$ 发现了这种突变类型，在其他家系成员中未检测出 SOD1 基因第 4 外显子的突变。因此该突变可能只和家系成员 $Ⅲ_1$ 的发病有关，不是引起该家系发病的原因，同时该种突变对 SOD1 功能的影响还需进一步的研究去证实。

DHPLC 是一种新的杂合双链突变检测技术，可用于检测单个碱基置换、插入或缺失。我们利用 DHPLC 方法结合 DNA 直接测序，对 PCR-SSCP 检测阴性的外显子样本再次进行筛查，从中检测出新的未知突变点，证实了与 PCR-SSCP 方法相比，DHPLC 检测灵敏度和特异度均较高，且 DHPLC 自动程度化高，检测快速，每份标本的检测时间不超过 10 min，适合高通量（high throughout）检测，是对未知突变进行简单、快速、大批量筛查最有效的方法之一。

参考文献：

[1] 史树贵，廖 平，潘 登，等. 肌萎缩侧索硬化一家系报道[J]. 第三军医大学学报，2003，25(3)：273－274.
[2] 史树贵，李露斯，陈康宁，等. 一个肌萎缩侧索硬化家系的 SOD1 基因突变[J]. 中华医学遗传学杂志，2004，21(2)：149－152.
[3] Beghi E, Mennini T. Basic and clinical research on amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders in Italy: recent findings and achievements from a network of laboratories[J]. Neurol Sci, 2004, 25 (Suppl 2): S41－S60.
[4] Orrell R W, Marklund S L, deBelleroche J S. Familial ALS is associated with mutations in all exons of SOD1: a novel mutation in exon 3 (Gly72Ser) [J]. J Neurol Sci, 1997, 153(1): 46－49.
[5] Wiedau Pazos M, Goto J J, Rabizadah S. Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis[J]. Science, 1996, 271 (5248): 515－518.
[6] Bruijn L I, Houseweart M K, Kato S, *et al*. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1 [J]. Science, 1998, 281(5384): 1851－1854.
[7] Guegan C, Prezedborski S. Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis[J]. J Clin Invest, 2003, 111(2): 153－161.
[8] Kwok P Y, Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms[J]. Curr Issues Mol Biol, 2003, 5(2): 43－60.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)13-1376-01

保留乳房治疗乳腺癌 35 例分析

Conservative breast treatment for breast cancer patients: an analysis of 35 cases

段恒英[1]，杨家祥[2]，江歌丽[2]，唐新生[1]，刘晓渝[2]，孙世良[1]
（重庆市肿瘤医院：[1] 放疗科，[2] 乳腺中心，重庆 400030）

早期乳腺癌的保乳治疗，不但具有保留乳房外形的优点，而且避免了常规根治术后给患者造成的胸壁畸形、上肢水肿、活动受限等痛苦以及精神心理上的巨大压力。它明显地提高了患者的生存质量。在局部复发率和生存率方面，保留乳房手术与根治术相同[1,2]。

我院自 1990 年以来采用此方法治疗早期乳腺癌满 10 年病历共计 35 例，现将随访结果报告如下。

1 临床资料

35 例为Ⅰ期及部分Ⅱa 期的乳腺癌患者，均为自愿参加者。年龄：28～76 岁，中位年龄 43.8 岁。

肿瘤原发灶局部扩大切除（边缘超过正常组织 1 cm，并经冰冻切片证实为阴性）及腋下淋巴结清扫。

术后放疗：术后 2 周伤口愈合良好再行放射治疗。本组病人中 20 例采用高剂量率 ^{192}Ir 行局部插植补量放疗以外，其余患者均行 X 线和电子线外照射放疗。外照射的方法根据术后病理、原发肿瘤大小及部位而定。放疗后均持用相同的化疗方案

2 结果

本组经 10 年以上随访，死亡 5 例，其中 1 例肝转移、2 例骨转移、1 例局部复发伴肺转移、1 例死于脑血管意外。生存率 86%（30/35）。局部复发率占本组 2.8%（1/35）。乳房的美容效果除 7 例稍差外均属满意，满意率为 80%（28/35）。全组无区域淋巴结复发。

（下转 1384 页）

作者简介：段恒英（1963－），女，重庆市人，主治医师，主要从事肿瘤诊断与治疗方面的研究。电话：(023)65303082
收稿日期：2005-05-02；修回日期：2005-06-03