维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)04 - 0556 - 05

Klinefelter 综合征及双亲 X 染色体着丝粒区 α - 卫星 DNA 变异研究

李 恬,翁亚光,王应雄,何俊琳,刘学庆,陈雪梅

(重庆医科大学遗传优生教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:本文从 DNA 分子水平对 Klinifelter 综合征患者及双亲 X 染色体着丝粒区域的 α - 卫星 DNA 变异进行研究,探讨 Klinefelter 综合征患者 X 染色体不分离形成的原因。方法:采用(representative sampling of multiple repetitive units ,rep) PCR 方法,通过设计适当的引物,对 - 卫星 DNA 多个拷贝串联重复序列同时进行扩增,检测患者、双亲和正常人重复序列中变异发生。结果:(1)扩增产物中分别出现 1774bp、570bp(由缺失产生)片段和 1410bp、583bp(由缺失产生)、220bp(由缺失产生)片段,(2)患者组 570bp 和 583bp 产生率高于正常组,χ^2 统计有显著性意义($P<0.05$)。(3)患者与患者双亲比较差异不显著。结论:Klinefelter 综合征患者及双亲的 X 染色体着丝粒区 α - 卫星 DNA 表现出较正常人具更多的变异。提示通过孕前或产前对双亲外周血 X 染色体着丝粒区域的 α - 卫星 DNA 变异分析,对 Klinefelter 综合征发生风险进行估计,为产前绒毛或羊水染色体检查提供重要的依据。

【关键词】非整倍体;Klinefelt 综合征;α - 卫星 DNA;着丝粒

【中国图书分类法分类号】R596 【文献标识码】A 【收稿日期】2004 - 11 - 23

X chromosome centromeric alpha satellite DNA variation in Klinefelter's syndrome patients and their parents

LI Tian, et al

(*Department of Genetic, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the variation of X chromosome centromeric Alpha Satellite DNA in Klinefelter's syndrome patients, their parents and normal individuals and to discuss the mechanism of Klinefelter's syndrome X chromosome nondisjunction. *Methods*: The multi - copies of a 2Kb tandem repeat unit on X chromosome of centromeric Alpha Satellite DNA were simultaneously amplified with reasonable primers by (representative sampling of multiple repetitive units, rep)PCR, and the mechanism of X chromosome aneuploidy resulted by abnormal structure of centromere was investigated. *Results*: 1774bp, 570bp and 1410bp, 583bp, 220 bp (three short fragments are resulted by deletion in alpha satellite DNA) were detected in Klinefelter's syndrome patients, their parents and normal karyotype controls. There were 1774bp and 1410bp DNA fragments in all of samples. The relative frequencies of 570bp and 583 bp were significantly higher in Klinefelter's syndrome patients than in normal karyotype controls, the 220bp was not found significantly different in the three groups. *Conclusion*: Deletion in the region of Alpha Satellite DNA is present at centromeres of all human X chromosome, while Klinefelter's syndrome patients and their parents show higher frequency than normal individuals. These results imply that analysis of deletion on X - specific αsatellite of the parents during the pre - pregnancy and pregnancy plays a important role either in estimating the risk of repruducing Klinefelter's syndrome or in providing the guideline for prenatal chromosome diagnosis of villus and amniotic fluid.

【Key words】Aneuploidy; Klinefelter's syndrome; Alpha Satellite DNA; Centromere

在细胞分裂过程中,染色体着丝粒是纺锤丝与染色体连接的重要部位,染色体着丝粒的功能将直接影响染色体的正常分离。人类染色体着丝粒包括着丝粒 DNA 和着丝粒蛋白两个重要成分。X 染色体非整倍体畸变引起的染色体病在群体中的发病率高达 1/300。目前,国内外尚未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 研究的报道,为此采用(representative sampling of mul-

作者介绍:李 恬(1978 -),女,硕士研究生,主要研究方向:医学遗传学。

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30371485);重庆市教委资助项目(渝科教 2000 - 12)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

tiple repetitive units ,rep)PCR 等方法[1]对 Klinefelter 综合征(47,XXY)患者、患者双亲、正常双亲的 X 染色体着丝粒区 α－卫星 DNA 串联重复序列变异的程度和特点进行了研究。

1 材料和方法

1.1 实验取材和模板 DNA 的制备

患者组为 32 例年龄为 20～39 岁之间的 Klinefelter 综合征患者。双亲组为患者双亲 96 例,正常组为无亲缘关系,已生育正常后代,染色体核型正常,年龄与患者双亲相近的正常女性、男性个体各 48 例(分别收取外周血各 2ml,6∶1 体积加入 3.2%柠檬酸三钠抗凝 ,然后取 200ul 用上海生工提供的基因组 DNA 抽提试剂盒按说明书所示方法快速提取基因组 DNA,并用紫外分光光度计测 OD_{260}值,调节 OD_{260}值使其为 0.53±0.04(A260/A280 均为 1.8～1.9),－20℃保存备用。

1.2 第一次 repPCR

1.2.1 引物的设计和合成 参照 Warburton P. E. 等设计[1]和 X 染色体 α－卫星 DNA 序列(GeneBank: X02418. 1 GI; 36361)变化的特点,筛选和设计了两对引物,X 染色体 α－卫星 DNA 序列应扩增出 1410bp 和 1774bp 片段,如有 DNA 片段丢失或增加,将会有其它长度的 DNA 片段出现。引物由上海生工公司合成。引物 1:1A:5′－aag cct ttt cct tta tct tca ca －3′

1B:5′－ctg aga atg ctt ccg ttt gcc －3′(1410bp)

引物 2:2A:5′－att ctc aga aag ttt tct gc －3′

2B:5′－ata acg aat gtt cag ctc cc 3′(1774bp)

每对引物可分别对各个拷贝的特定片段(1－12 组成一个拷贝)同时进行扩增(此即 repPCR),可检测该拷贝的变异情况(见图 1)。

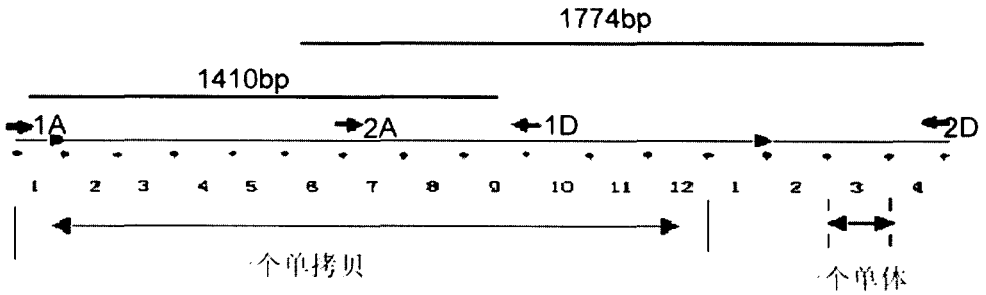


图 1 X 染色体 α 卫星 DNA 结构示意图

1.2.2 (rep)PCR 反应体系 每个样本分别进行 2 个独立的 PCR 反应,各含 1 对引物。

200μlPCR 离心管内:67μl 灭菌重蒸水 + PCR 缓冲液 10μl + $MgCl_2$8μl + dNTP 2μl + Taq 酶 1μl + 引物 1A2μl、1B2μl 或 2A2μl、2B2μl,稍离心后平分成两管,每管再加模板 4μl,稍离心后即得 50μlPCR 反应体系。

各组份在 50μlPCR 反应体系中的终浓度分别为:

dNTP 200μmol/L/每个 Mg^{2+} 2mmol/L

Taq 酶 2.5U 引物 0.5μmol/L/每个

模板 0.05μg/μl

(上海生工提供的 10xPCR buffer 的组成:100mmol/L KCl,80mmol/L$(NH_4)_2SO_4$,100mM Tris－HCl,pH＝9.0,NP－40.)

1.2.3 (rep)PCR 反应参数 引物 1 变性 94℃ 5min;变性 94℃ 50s,复性 60℃ 1min,延伸 72℃ 2min,30 个循环;延伸 72℃ 7min。

引物 2 变性 94℃ 5min;变性 94℃ 50s,复性 58℃ 1min,延伸 72℃ 2min,30 个循环;延伸 72℃7min。

PCR 反应在美国 PE 公司 9700 型扩增仪上完成。

1.2.4 电泳检测 从每个反应管中各取扩增产物 10μl,用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳,4V/cm,50min,电泳缓冲液 0.5×TBE。琼脂糖为 BBI 公司产品(上海生工货号为 AB0014)。Marker 采用 MBI 的 GeneRulerTM 100bp DNA Ladder Plus (0.5mg DNA/ml,1ug marker 含 133ng 的 500bp 片段),电泳时均取 1.0μl。电泳结束后在 BIO－RAD 凝胶成像系统中分析并记录、保存试验结果。

1.3 从凝胶中提取 DNA

将引物 1 扩增出的非原始目的片段(即非 1410bp 片段)对应的凝胶条带切下,再从凝胶中提取 DNA(胶回收试剂盒由上海华舜提供)。

将引物 2 扩增出的非 1774bp 片段对应的凝胶条带切下,同上提取 DNA。

各组均按上述方法提取对应的 DNA 片段,以便第二次 repPCR 时对照。

1.4 第二次 repPCR

将上述提取的 DNA 用相应的引物再次做 repPCR(方法同上),同一模板再用另一引物做 repPCR,以作对照,防止出现假阳性,验证其是否为特异非目的片段。

1.5 实验结果分析

各组样本的实验结果,利用 BIO－RAD 凝胶成像系统及分析软件对 DNA 片段进行分析;如有特异非目的片段,计数

维普资讯 http://www.cqvip.com

发生次数,统计对比各组的 X 染色体着丝粒区 α-卫星 DNA 发生变异的程度及变化规律等。

2 结 果

用两对引物对患者组、双亲组以及正常组进行(rep)PCR,均出现 1410bp 和 1774bp,同时各组不同程度的出现由不等交换而出现的 562bp、220bp 和 570bp 片段。各片段经测序并与 Gene Bank 序列进行比较分析,已证实为 X 染色体着丝粒 α 卫星 DNA(另文讨论)。

(1)各组标本均出现 1410bp 和 1774bp 的扩增片段(见图 2)。

(2)引物 1 除了扩增出 1410bp 片段,还扩增出 562 bp 片段和 220bp 片段(见图 3),分别提取片段作为模板,用引物 1 再做 PCR,未发现 1410bp 片段,只扩增出相应的模板片段。同样的提取模板用引物 2 无法得到任何片段,说明 562bp 和 220bp 片段也是引物 1 扩增的目的片段。其中 562 bp 片段的产生率患者组与患者双亲组无显著差异,但显著高于正常双亲组、220 片段在三组间无显著差异。详见表 1、2。

表 1 患者组、双亲组和正常组 562bp 片段的产生率比较

分 组	产 生	未产生	合 计	P(%)
正常组	46	50	96	47.92
双亲组	40	24	64	62.50
患者组	26	6	32	81.25*

* 表示与正常组比较有显著性差异,χ^2:10.84,$P<0.05$

表 2 患者组、双亲组和正常组 220bp 片段的产生率比较

分 组	产 生	未产生	合 计	P(%)
正常组	50	46	96	52.08
双亲组	32	32	64	50.00
患者组	22	10	32	68.75

表 3 患者组、双亲组和正常组 570bp 片段的产生率比较

分 组	产 生	未产生	合 计	P(%)
正常组	44	52	96	45.83
双亲组	38	26	64	59.38
患者组	25	7	32	78.13*

* 表示与正常组比较有显著性差异,χ^2:10.07 ,$P<0.05$

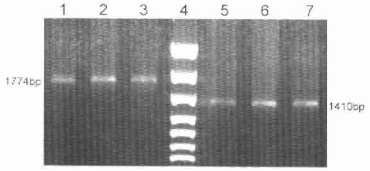


图 2 引物 1 和引物 2PCR 扩增产物电泳图

4 为 Marker;1、5 为患者;2、6 为患者双亲;3、7 为正常组;1410bp、1774bp 片段分别为引物 1 和引物 2 扩增产物

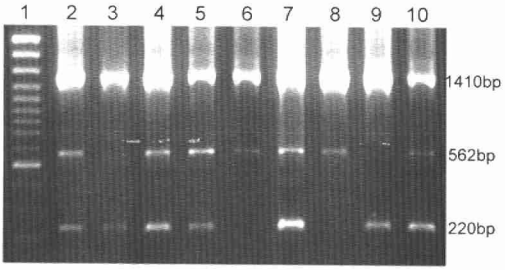


图 3 患者和双亲引物 1PCR 产物电泳图

1 为 Marker;4、5、10 为患者,均有 1410bp、562bp 和 220bp 片段;2 和 3 分别为 4 的父亲和母亲;6 和 7 分别为 5 的父亲和母亲;8 和 9 分别为 10 的父亲和母亲;患者双亲均出现 1410bp 片段,不同程度出现 562bp 和 220bp 片段

维普资讯 http://www.cqvip.com

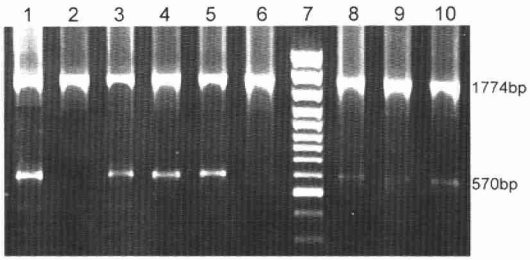


图 4 患者和双亲引物 2PCR 产物电泳图

1、4、8 为患者;2、3 分别为 1 的父母;5、6 分别为 4 的父母;9、10 分别为 8 的父母;7 为 Mark

(3)引物 2 还扩增出 570bp 片段(见图 4)。再提取该片段作为模板,用引物 2 再次做 PCR,未发现 1774bp 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,说明 570bp 片段也是引物 2 扩增的目的片段。并且 570bp 片段的产生率患者组显著高于正常双亲组,但患者组与患者双亲组间无显著差异。见表 3:

3 讨 论

染色体不分离或丢失的机制目前尚不清楚。染色体着丝粒是与染色体移动密切相关的一个重要结构,着丝粒蛋白与着丝粒 DNA 正常附着,着丝粒才能正常行使其功能。着丝粒 DNA 主要为异染色质,其中 α-卫星 DNA 是目前发现的唯一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 171bpDNA 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,一个拷贝的串联重复序列中 171bp 单体的数目以及 171bp 单体片段的核苷酸组成也不同(见图 1)。因此,可利用不同染色体着丝粒区域的 α-卫星 DNA 序列的差异,分别对不同的染色体着丝粒 DNA 结构变异进行研究。

X 染色体全部着丝粒区 α-卫星 DNA 约含 1500 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 2kb,含 12 个 171bp 单体,分别编号为 1~12 单体,各单体之间约有 35%的核苷酸序列的差异[1,4,10]。如果着丝粒 DNA 发生缺失,会造成单拷贝串联重复序列长度的改变。α-卫星 DNA 的变异可能会影响着丝粒蛋白的正常附着,从而造成着丝粒丧失正常的功能,最终导致染色体不能正常分离,引起染色体非整倍体畸变[3,5]。

我室曾对染色体着丝粒形态的变异与非整倍体形成进行了系列研究证实两者间具有一定的关系[11,12]。因此,从着丝粒 DNA 分子水平进一步探讨染色体着丝粒结构变异具有十分重要的意义。

正常的 X 染色体着丝粒 α-卫星 DNA 的一个拷贝含 12 个 171bp 片段单体,长度约 2kb 碱基,可用染色体特异的 PCR 引物扩增出来[6]。Warburton P.E. 等曾利用引物 2 进行 Hybrid 细胞进行研究,该细胞中只有一条 X 染色体,既有 2kb 重复单位(正常情况),可扩增出 1774bp 片段;同时该细胞还有 3kb 重复单位(作者认为由于不等交换所致),可扩增出 1774bp 和 570bp 片段,其中的 570bp 片段已通过基因测序并与 3 kb 序列和 2 kb 的基因序列比较得到不等交换的位置,此外他们还对 λ25、λ72(两个 λ 克隆,均只含有 2kb 重复单位)进行了检测,只能扩增出 1774 片段[1,6-9]。但由于该引物只针对每个 2kb 重复单位的 12 个单体中的 10 个单体进行扩增,此区域以外发生的缺失将无法检测。

本研究参照 Warburton P.E. 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设计 2 对引物进行(rep)PCR,其扩增区域包括了每个 2kb 重复单位,可以对整个 X 染色体着丝粒区 α-卫星 DNA1500 拷贝同时进行扩增。利用我们设计的引物 1 首次发现了 562bp 和 220bp 的 2 个变异片段,在两对引物进行扩增的产物中,共发现了三种变异的短片段,由此可推测在人

维普资讯 http://www.cqvip.com

类 X 染色体着丝粒区 α－卫星 DNA 中至少存在三种以上的变异片段。

变异短片段的出现说明了在 X 染色体着丝粒区 α－卫星 DNA 的 2kb 重复单位内出现了部分单体的缺失，并且通过对 2kb 重复单位设计两对引物的方法足以检测、研究整个 α－卫星 DNA 的变异情况。利用该方法，根据不同染色体着丝粒 α－卫星 DNA 的特点设计不同种类和数量的引物进行研究，为开展着丝粒 DNA 分子水平研究提供了重要的方法。本文对三种变异片段出现的特点和规律与 Klinefelt 综合征的关系进行了分析。

562bp、570bp 片段的产生率异常组均高于正常组，统计分析差异有显著性意义。研究显示：(1)异常组在该区域中缺失的频率较高，并出现三个断裂重组的热点部位；(2)患者双亲组的变异程度在统计分析中与正常双亲组和患者组尽管统计分析无显著差异，但确表现出高于正常双亲组、低于患者组的趋势，即表现为正常双亲组、患者双亲组、患者组依此有一个逐渐增高的趋势，患者的变异片段的出现既有双亲体细胞中变异片段通过生殖细胞传递下来的因素，也有在双亲生殖细胞形成过程中生殖细胞发生新变异的因素；(3)双亲中一方同时具有 583bp、570bp 片段的个体或双亲中分别具有其中一种变异片段，子代发生染色体不能正常分离的风险较高。因此对双亲 562bp、570bp 片段的检测，对评价后代发生染色体不能正常分离的风险具有重要意义，可作为对其胚胎进行产前染色体诊断的重要依据。

我们认为缺失片段造成着丝粒区 α－卫星 DNA 异常，从而着丝粒蛋白结合异常和(或)纺锤丝蛋白作用异常等等，最终引起着丝粒结构或(和)功能异常，患者出现的变异片段既可以是双亲遗传的累计，也可以是生殖细胞减数分裂染色体着丝粒 α－卫星 DNA 新的变异所致。加强婚前、孕前、产前咨询者及患者其他亲属外周血白细胞特异性片段进行检测，对妊娠 X 染色体非整倍体异常胎儿的风险进行估计，将为是否需要进行绒毛、羊水的染色体产前诊断提供重要依据。

参 考 文 献

[1] Peter E. Warburton, Huntington F. Willard. PCR amplification of tandemly repeated DNA: analysis of intra－and inter-chromosomal sequence variation and homologous unequal crossing－over in human alpha satellite DNA[J]. Nucl. 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] Jeppesen P., Mitchell A., Turner B., et al. Antibodies to defined histone epitopes reveal variations in chromatin conformation and underacetylation of centric heterochromatin in human metaphase chromosomes[J]. Chromosoma, 1992; 101(5－6): 322－332.

[4] Thomas P. Yang, Suzanne K. Hansen, Barbara A. Hamkalo, et al. Characterization of a cloned repetitive DNA sequence concentrated on the human X chromosome[J]. Genetics, 1982; 79:6593－6597.

[5] Anthony W. L. Lo, Gregory C. C. Liao, K. H. Andy Choo, et al. Extreme reduction of chromosome－specific a－satellite array is unusually common in human chromosome 21[J]. Genome Research, 1999; 9:895－908.

[6] Warburton P. E., Greig G. M., Willard H. F., 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.

[7] Waye J. S., Willard H. F.. Chromosome－specific alpha satellite DNA: nucleotide sequence analysis of the 2.0 kilobase-pair repeat from the human X chromosome[J]. Nucleic－Acids－Res, 1985; 13(8):2731－2743.

[8] Willard H. F., Waye J. S., England S. B., et al. Detection of restriction fragment length polymorphisms at the centromeres of human chromosomes by using chromosome－specific alpha satellite DNA probes: implications for development of centromere－based genetic linkage maps[J]. Proc－Natl－Acad－Sci－U－S－A., 1986; 83(15):5611－5615.

[9] Yang T. P., Hansen S. K., Hamkalo B. A., et al. Characterization of a cloned repetitive DNA sequence concentrated on the human X chromosome[J]. Proc－Natl－Acad－Sci－U－S－A, 1982; 79(21):6593－6597.

[10] Mahtane M. M., Willard H. F.. Pulsed－field gel analysis of a－satellite DNA at the human X chromosome centromere high－frequency polymorphisms and arry size estimate[J]. Genomics, 1990; 7:607－613.

[11] 翁亚光，王应雄，何俊琳，等. 正常人各年龄组染色体着丝粒点研究[J]. 遗传，1995;17(3):3－6.

[12] 王应雄，翁亚光，刘学庆，等. 21 三体患者及其双亲染色体着丝粒点研究[J]. 中华医学遗传学杂志，1994;11(4):239.