

5例原发性痛风患者 HPRT 基因的克隆和序列分析*

周 勤, 薛爱群, 陈东红, 魏祥东, 叶长明

(中山大学生物工程中心//基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 原发性痛风是先天性嘌呤代谢缺陷症, 与嘌呤代谢相关酶次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT, EC 2.4.2.8)、磷酸核糖焦磷酸合成酶(PRS)等缺陷有关。克隆了正常中国人和4个中国原发性痛风家族5位患者的 HPRT 基因, 序列分析表明, 正常中国人及 Case5 患者的 HPRT 编码区序列与报道的序列(GeneBank 登录号 M26434)完全一致, 而在3个中国痛风家族4位患者的 HPRT 基因编码区中共发现11个新突变, 包括3个同义突变、1个无义突变和7个错义突变。这是关于中国大陆原发性痛风患者 HPRT 基因突变的首次报道。

关键词: 原发性痛风; 次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因; 突变

中图分类号: R596.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 02-0090-03

痛风是一种嘌呤代谢紊乱综合症, 主要是因体内嘌呤生成过多导致代谢终产物尿酸在体内堆积所致, 临床上主要表现为高尿酸血症、发作性关节炎、关节变形、肾脏损害、痛风结节等。痛风分为原发性痛风和继发性痛风, 原发性痛风是指由于先天性代谢缺陷所致的痛风, 其遗传方式因病因不同而异。次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)和磷酸核糖焦磷酸合成酶(PRS)缺陷引起的痛风按X染色体连锁隐性遗传, 葡萄糖-6-磷酸酶活力缺乏按常染色体隐性遗传, 而谷胱甘肽还原酶的变异则按常染色体显性遗传, 有些病因未明的高尿酸血症可能是常染色体多基因显性遗传^[1]。

近年来, 对痛风的研究热点逐渐集中到 HPRT 和 PRS 的突变研究上, 已报道了271个病例 HPRT 基因的218个突变位点^[2-6]。中国内地痛风患者 HPRT 基因突变情况未见报道。我们从1999年开始痛风的分子生物学研究, 首先克隆分析了1个原发性痛风家族的 PRS1 和 PRS2 基因, 但发现克隆的 PRS1 有多处无义突变, 认为是假基因, 而 PRS2 与正常人及国外报道的序列完全一致, 看来该家族痛风的病因不是 PRS 突变引起^[7]。本文报道5例原发性痛风患者 HPRT 基因的克隆和序列分析结果。

1 材料与方法

1.1 材 料

正常人外周血样品, 取自本实验室2个健康自愿者, 痛风患者血样取自广州铁路医院就诊的病人

(均有家族史, 疑为原发性痛风患者)。

PCR 引物。根据 GeneBank 序列(M26434)和 Yamada 等^[8]的研究设计8对引物, 由上海生物工程公司合成。8对引物分别位于 mRNA 非编码区和内含子中, 以扩增相应的9个外显子及部分内含子序列, 其中第7、8外显子由1对引物扩增。

Taq DNA 聚合酶、pGEM-T Easy 载体、PCR 产物回收和质粒提取试剂盒购自 Promega 公司; 限制性内切酶均购自华美生物工程公司。

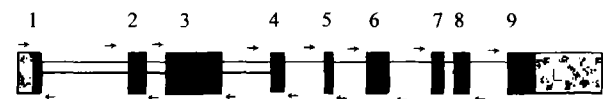


图1 人 HPRT 基因结构和设计引物所在位置

Fig.1 Structure of HPRT gene and locations of the PCR primers
(黑框为外显子, 划双线为内含子, 两端为 mRNA 非编码区, 箭头所示8对引物)

1.2 方 法

PCR 及其产物的克隆。按常规方法制备人外周血样品 DNA。PCR 反应体系为基因组 DNA 100 ng, 2U Taq DNA 聚合酶, 20 pmol 引物, 5 μ L 10 $\times$ Buffer, 8 μ L 1.25 mol/L dNTP, 反应体积 50 μ L。扩增产物回收按试剂盒说明书进行。将回收的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化 *E. coli* TOP¹⁰ 菌株。从含有 IPTG/X-gal 的氨苄青霉素的平板上挑选白色菌落, 按常规方法提取质粒。

重组克隆鉴定和克隆片段分析。按常规方法提

* 收稿日期: 2002-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770354)

作者简介: 周勤(1971年生), 女, 硕士, 工程师; 通讯联系人: 叶长明; E-mail: lsbr10@zsu.edu.cn

质粒, 采用 *EcoR* I 单酶切和双酶切法进行鉴定。将经酶切电泳鉴定后的重组质粒在本室或送至上海基康生物工程公司测定克隆片段序列, 并用 DNAsis 软件和 Genebank 之 Blast 工具进行序列同源性分析。

2 结果与讨论

2.1 PCR 扩增产物

正常中国人和五例痛风患者基因组 DNA 经 PCR 扩增均得到 8 条与设计大小相当的 DNA 片段, 见图 2。

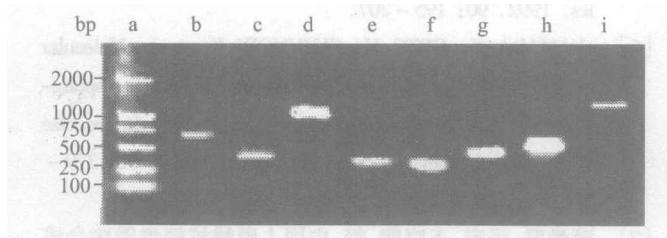


图 2 正常中国人和痛风患者 HPRT 基因外显子扩增结果

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR products

a: DNA 相对分子质量标准;
b: exon1; c: exon2; d: exon3; e: exon4;
f: exon5; g: exon6; h: exon7/8; i: exon9

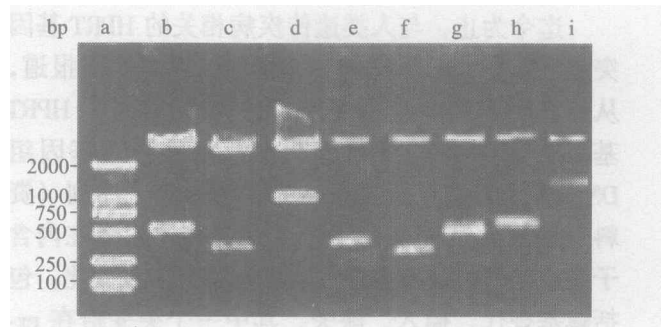


图 3 重组质粒 *EcoR* I 酶切鉴定电泳结果

Fig.3 *EcoR* I digestions and agarose gel electrophoresis

a: DNA 相对分子质量标准; b: pEXON1;
c: pEXON2; d: pEXON3; e: pEXON4;
f: pEXON5; g: pEXON6; h: pEXON7/8; i: pEXON9

2.2 序列分析

DNA 测序表明, 正常中国人和痛风患者的 HPRT 基因 9 个外显子的 8 个扩增片段 (外显子 7、8 在一个片段上), 长度分别为 627, 388, 1 059, 334, 282, 441, 499, 1 215 bp, 与设计相符。正常中国人和 Case5 患者 HPRT 基因外显子编码区序列与国外正常人的同源性为 100%, 而来自另 3 个痛风家族的 4 位患者 HPRT 基因外显子编码区序列突变情况各不相同。结果总结如表 1。

表 1 中国人原发性痛风患者 HPRT 基因突变情况

Tab.1 Mutations of HPRT gene in Chinese primary gout patients

病例	碱基突变类型和位点	氨基酸变异	酶二级结构变化
Case1	C ₂₈₇ →T ₂₈₇	T ₉₃ →I ₉₃	α-螺旋增加
	C ₆₂₂ →T ₆₂₂	无	
Case2	T ₄₉₁ →C ₄₉₁	L ₁₆₂ →P ₁₆₂	α-螺旋增加 卷曲螺旋增加
	A ₅₀₂ →G ₅₀₂	T ₁₆₈ →A ₁₆₈	
	G ₅₅₃ →C ₅₅₃ /A ₅₅₄ →C ₅₅₄	D ₁₈₅ →P ₁₉₂	
	G ₅₇₄ →A ₅₇₄	A ₁₉₂ →T ₁₈₅	
	A ₆₅₄ →C ₆₅₄	无	
Case3	T ₃₅₄ →C ₃₅₄	无	α-螺旋减少
	A ₆₄₉ →T ₆₄₉	L ₂₁₇ →终止密码	
Case4	T ₆₄₆ →C ₆₄₆	Y ₂₁₆ →H ₂₁₆	α-螺旋减少

从表 1 可知, 在所测 4 个痛风家族的 5 例患者中, 3 个家族 4 例患者在编码区共发生了 11 处突变, 均为碱基替代突变, 其中 3 个同义突变, 1 个是无义突变, 8 错义突变, 这些与国外报道的突变不同^[3], 与来自中国台湾所报道的 HPRT 基因突变也不同^[2]。第 3 家族 Case3 (母亲) 和 Case4 (儿子) 在外显子 9 上有不同的突变, 母亲可能是个杂合子, 在两条 X 染色体上可能均有不同的突变发生, 并将其中带突变的染色体遗传给儿子, 符合痛风伴 X 染色体隐性遗传规律。

痛风家族 4 的患者 (Case5) HPRT 基因无任何突变发生, 说明此患者病因并非由于 HPRT 基因突变, 而可能是由于其他基因突变。

为了保证所测各外显子片段序列的正确性, 避免由于 PCR 扩增、紫外检测、测序本身所引发的碱基错配, 真实反映患者基因突变情况, 对每例病人每个外显子都是随机取 2 个重组克隆进行测序, 同时采取 PCR 产物直接测序与之相对照, 测序结果一致, 说明从痛风患者中获得有点突变是真实的。

迄今为止,与人类遗传疾病相关的 HPRT 基因突变有来自 271 个病例的 218 种不同突变被报道,从外显子 1 到 9 都有突变发生^[3,4],说明了 HPRT 基因突变的多态性和复杂性。在我们对基因组 DNA 进行扩增时,还获得了部分内含子序列(资料未显示),不论正常中国人还是痛风患者在内含子区域与国外所发表序列相比都有多位点变化,包括碱基替代、插入、缺失,其中一个突变恰在 exon9 之 5'剪接位点 G 之后,即由 A₄₁₅₀₄→G₄₁₅₀₄,可能对 RNA 的剪接、转录、翻译有影响,这在以前有过类似报道^[8]。HPRT 基因突变的性质、位点与疾病型、种群的内在联系尚不能得出。如果我们积累了足够数量的突变数据,归纳出一些规律性的突变,将为痛风的基因诊断提供方便。在目前情况下,采取 PCR 或 RT-PCR、DNA 测序、酶活分析等分子生物学检测与临床观察相结合对原发性痛风进行诊断,是较为可靠的选择。

参考文献:

- [1] WORTAMANN R L. Effective management of gout: an analogy[J]. Am J Med, 1998, 105: 513-514.
- [2] CHANG S J, CHANG J G, CHEN C J, et al. Identification of a new single nucleotide substitution on the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene (HPRT) from a Taiwanese aboriginal family with severe gout[J]. J Rheumatol, 1999, 26: 1802-1807.
- [3] JINNAH H A, GREGORIO L D, HARRIS J C, et al. The spectrum of inherited mutations causing HPRT deficiency: 75 new cases and a review of 196 previously reported cases[J]. Mutation Research, 2000, 463: 309-226.
- [4] NYHAN W L. The recognition of Lesch-Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism[J]. J Inher Metab Dis, 1997, 20: 171-178.
- [5] SCULLEY D G, DAWSON P A, EMMERSON B T, et al. A review of the molecular basis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency[J]. Human Genetics, 1992, 90: 195-207.
- [6] YAMADA Y, GOTO H, SUZUMORI K, et al. Molecular analysis of five independent Japanese mutant genes responsible for hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency[J]. Human Genetics, 1992, 90: 379-384.
- [7] 薛爱群,张宏,王晓卿,等.中国人磷酸核糖焦磷酸合成酶 1 假基因的克隆与测序[J].中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(3):135-136.
- [8] O'NEILL P J, ROGAN P K, CARIELLO N, et al. Mutations that alter RNA splicing of the human HPRT gene: a review of the spectrum[J]. Mutation Research, 1998, 411: 179-214.

Cloning and Sequencing of Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase Gene from 5 Cases of Primary Gout Patients

ZHOU Qin, XUE Ai-qun, CHEN Dong-hong, WEI Xiang-dong, YE Chang-ming
(Biotechnology Research Center//Key Laboratory of Gene Engineering of
Ministry of Education, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Primary gout is a form of the disease that is mainly attributable to an inborn error metabolism, characterized by hyperuricemia, acute arthritis and associated with partial deficiency of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT, EC 2.4.2.8). Exons were amplified and sequenced from the genomic DNA of 2 normal Chinese and 5 cases of primary gout patients. There are no differences in the coding region of HPRT gene among normal Chinese, Case 5 patient and foreigners documented. Eleven novel point mutations in the coding region of HPRT gene were identified respectively in 4 cases of patients. In this paper we firstly report HPRT gene mutations in primary gout patients of the mainland of China.

Key words: primary gout; hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT); mutation