

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

自體顯性多囊腎病的基因異常分析及其和臨床表現型的相
關

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2314-B-002-194-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院一般醫學科

計畫主持人：朱宗信

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 26 日

中文摘要

自體顯性多囊腎病中 85 % 為 PKD1 基因異常，15 % 為 PKD2 基因異常。PKD1 基因很大，有 46 個 exon，且在其染色體上有此基因 exon1-33 的 repeats (似偽基因)，益增分析的困難度。近年來變性高效能液相色層分析已被應用在一些複雜基因的篩選分析。本計畫目的乃探討自體顯性多囊腎病的 PKD1 基因異常及其和臨床表現型的相關。

本計畫所用的方法為 (1) 收集自體顯性多囊腎病患者並整理臨床資料 (2) 抽血並萃取 DNA (3) 作 long range PCR 以克服有 repeats 的困難 (4) 製備 DHPLC amplicon (5) 製備 gradient 並跑 DHPLC (6) 片段溶解溫度分析及改善 DHPLC 條件 (7) DNA 定序找出基因異常部位。

結果顯示 106 位病人中 80% 有高氮血症，診斷時平均 Cr 為 3.3mg/dL，進入末期腎病需透析時平均為 55 歲。基因檢測的部份已完成前幾個步驟，即將有完整的結果。此後病人基因診斷後，可及早偵測及預防腎功能惡化，延緩病人進入透析。基因診斷自體顯性多囊腎病方法建立後，以後可能用於產前篩檢，減少此種病人；或運用於基因治療上。

關鍵詞：自體顯性多囊腎病、PKD1 基因、變性高效能液相色層分析、表現型

英文摘要

Eighty five percent autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) patients have PKD1 gene defect ; the remaining 15 % has PKD2 gene defect. The PKD1 transcript is large, encoded by 46 exons, and embedded in a complex duplicated genomic area. The exon 1 to exon 33 of PKD1 is reiterated at least five times on the same chromosome. Recently, a new semi-automated method has been introduced for mutation analysis in human gene, denaturing high performance liquid chromatography(DHPLC). The purpose of this study is mutation analysis of ADPKD and its correlation to phenotype.

The methods included (1) recruit ADPKD patients and collect clinical data, (2) draw blood and extract DNA,(3)do long range PCR,(4)prepare DHPLC amplicon, (5) prepare gradient and run DHPLC , (6) Fragment melting profile analysis and optimization of DHPLC conditions, (7) DNA sequencing.

The results showed that 80% of 106 ADPKD patients had azotemia and the mean Cr was 3.3mg/dL. The mean age in patients entering end stage renal disease was 55 years old. For gene analysis, several steps have been finished. We will complete the work and gain entire results soon. If we find the correlation of genotype and

phenotype, we may early diagnose the ADPKD patient and use some methods to delay the progression of renal failure. If we establish the genetic diagnosis of ADPKD, it maybe used in prenatal diagnosis, even gene therapy in future.

Key words : autosomal dominant polycystic kidney disease, PKD1 gene, denaturing high performance liquid chromatography, phenotype

前言及文獻探討

多囊腎病可分為自體顯性多囊腎病 (ADPKD) 及自體隱性多囊腎病。自體顯性多囊腎病主要於成人發病，國外報告發生率可達千分之一，是常見的遺傳病【1、2】。多年來，大家對此疾病到底是何基因異常所引起一直在探究，近年來已知有兩個基因確定有關，分別是 PKD1 及 PKD2，且其分子序列已被查出【3~6】。ADPKD 中 85%病人為 PKD1 基因異常，而 15%為 PKD2 基因異常。兩種基因異常的多囊腎病其臨床表現類似，但 PKD2 基因異常病人的臨床表現一般較 PKD1 異常的病人晚 15 年。PKD1 異常的病人進入末期腎病需透析的中位年齡為 53 歲，而 PKD2 異常的病人則為 69 歲【7】。

事實上 ADPKD 的基因研究有些困難，以 PKD1 為例，它是一個相當大的基因，超過 50Kb，有 46 個 exon，其 mRNA 14Kb，合成的蛋白質 polycystin 1 有 4302 個氨基酸，分子量為 460 Kd【2、8】最特殊的是在 PKD1 基因所在的第 16 對染色體上有部分 PKD1 基因 (exon 1-33) 的 repeat，此亦造成研究上的困難，有人用 long PCR 克服此困難【9~11】。另外 PKD1 基因異常並無好發點，每個病例基因異常的部位皆不同，因此需做整段基因的掃描才可查到異常【9、12、13】。最近變性高效能液相色層分析 (denaturing high performance liquid chromatography) 已被應用在一些複雜基因的篩選，其原理乃是一片段中有一對核苷酸不配對，則在 DHPLC 會先出來【14~16】，國內如台大醫院亦用 DHPLC 作一些遺傳疾病如家族性乳癌，家族性大腸癌的診斷【17、18】。

研究目的

探討自體顯性多囊腎病的 PKD1 基因異常及其和臨床嚴重度等的相關性。

研究方法

概要言之，首先收集 80 至 100 位多囊腎病的病人臨床資料並抽血，製備成 DNA，再用 long PCR 克服 PKD1 有 repeats 的困難，之後以 PCR 的方法，將 PKD1 基因的 exon 作成 64 個 amplicon，再以 DHPLC 跑看有否 mismatch，之後再以 DNA 核苷酸定序確定之。

- (1) 第一步為收集病患，並整理臨床資料。每位病人並收集臨床資料，包括性別、年齡、診斷時的年齡、透析時的年齡、各臨床症狀或併發症（腰腹痛、血尿、高血壓、高氮血症）的有無、腎功能、血色素、超音波的報告等。
- (2) 第二步為抽血並萃取 DNA，所用為標準的 Phenol-chloroform 步驟。首先取離心管加入 Ficoll，再加入血後離心，將二層介面中的 PBMC 抽出後，再以 PBSA 清洗後再離心，將 PBMC 存於 -80。要抽 DNA 時，則取 PBMC 先加入 RBC Lysis Buffer，震盪 10 分後以 14000rpm 高速離心 4~5 分，再加入 Cell Lysis Buffer 及 proteinase K，在 55~60 水浴過夜，再沸騰 10 分，置於冰上冷卻再離心，將上清液移至新管子，所得到的 DNA 存於 -20。
- (3) 第三步為 long-PCR。由於前述 PKD1 基因有部分 (exon 1-33) 在同一個染色體 repeat，因此先選定真正基因及其後的 repeats 之間的小差異，用五個 long-PCR 斷片加強真正基因。所用的 primer 如下：

Fragment	Primers (5'~3')	Annealing temperatures	Position (nt)	Size (bp)	Exons
Gen 1	CgC AgC CTT ACC ATC CAC CT TCA TCg CCC CTT CCT AAg CA	64	2033 ~ 4310	2278	1
Gen 2-12	CCA gCT CTC TgT CTA CTC ACC TCC gCA TC CCA Cgg TTA CgT TgT AgT TCA Cgg TgA Cg	68	17,647 ~ 26,372	8726	2-12
Gen 13-15	Tgg Agg gAg ggA CgC CAA TC gTC AAC gTg ggC CTC CAA gT	70	26,246 ~ 30,631	4386	13-15
Gen 15-21	AgC gCA ACT ACT Tgg Agg CCC gCA ggg TgA gCA ggT ggg gCC ATC CTA	68	30,603 ~ 33,980	3378	15-21
Gen 22-34	CCg TgT AgA gAg gAg ggC gTg TgC AAg gA TCg gCA Agg ACC TgC Tgg ATC Agg TCT TC	70	36,883 ~ 44,383	7501	22-34

PCR 的反應包括 60ng genomic DNA、5pmol primer、200 μ M dNTPs、1mM Mg (OAc) 及 buffer。用 93 3 分後加入 1U rTth DNA polymerase 進行 35 周期，每個周期為 93 1 分；68 1 分；72 6 分。Exon 1 由於含有較多的 GC 使用不同的作法：120ng genomic DNA、8pmol primer、200 μ M dNTPs、2.5mM MgCl₂；加熱 100 5 分，冷卻到 95 後加入 DMSO buffer，Taq extender，Amplitaq 後進行 15 周期，每周期包括 90 1

分；64 1分；72 3分。之後再用前面的方法做 20 周期，最後用 72 10分鐘。

(4) 第四步為 DHPLC amplicon 的製備

將 PKD1 所有 46 個 exon 及前後各 20 個核甘酸包括在內，分成 64 組，每組為 150 至 450bp，用 amplitaq 及含 DMSO buffer 以 PCR 反應。所用的 primer 請參閱原計畫。Amplicon heteroduplexes 的製備反應如下：將 PCR 產物置於 95 3分鐘，再以每秒 0.1 速率冷卻至 65 ，再於 65 30分，之後以每秒 0.1 速率冷卻至 37 ，再置於 37 10分。

(5) 第 5 步為 DHPLC 及 gradient 之製備

所用為 Wave system 之 DHPLC。將 200 至 500ng PCR 產物置於 buffer C，打入色層分析的 column (DNA Sep Column)。用 5 % triethyloammonium acetate (TEAA, buffer A) 和 25 % acetonitrile + 5 % TEAA (buffer B) 形成一線性 gradient，使流速為 0.9mL/min。每次 DHPLC 跑時包括 DNA loading 步驟、線性分離 gradient、清洗步驟 (75 % acetonitrile) 及平衡步驟。如 PCR 用到 DMSO，則清洗及平衡步驟所需時間要拉長。對 PKD1 amplicon 全部跑的時間共須 9.4 分。

(6) 片段溶解溫度分析及 DHPLC 條件的改善

片段溶解溫度以 Wavemaker 軟體分析之，並參考別人之前的資料【20】。每一 amplicon 跑 DHPLC 的條件則是依預測溶解溫度及加減各 1 及 2 度收集每一片段跑出的圖樣分析後再調成更適當。當某個樣本之 amplicon 跑 DHPLC 的圖樣與其他樣本跑的圖樣不同時，則此樣本在此段基因上有異常，須再作 DNA 定序確定之。

(7) DNA 定序

跑 DHPLC 圖樣異常的樣本用 Big-Dye Terminator Kit 作直接 DNA 定序。其方法為 PCR 產物用 polyethylene glycol 8000 (PEG) 及乙酸沈澱純化後再溶於水，取 30 至 180ng 加入各 primer (3.2pmol) 及 DMSO (1 μ l) 作定序反應，再以 ABI 373 定序機器分析之。定序後與正常基因 DNA 不同處即為基因異常處。

結果與討論

共收集 106 例自體顯性多囊腎病，皆符合超音波診斷要件【19】。其中男性 69 人，占 65%。診斷時平均歲數為 51 歲。診斷時平均 Cr 3.3mg/dL。進入末期腎病須透析時平均歲數為 55 歲。其中血液透析占 87%，腹膜透析占 9%，移植占 4%。透析前 Hct 平均為 24.3%。

這些病例的臨床表現和文獻相比較請參見表 1【1】。二者之間並無明顯的

差異。

表 1 自體顯性多囊腎病的臨床表現

臨床狀況	台大	文獻
腰痛	32%	50%(19-78)
腹痛		65%(60-75)
血尿	40%	35%(13-56)
感染	31%	19-68%
尿石症	30%	20%
高血壓	31%	13-82%
高氮血症	80%	25-100%
肝囊泡	58%	66%
顱內血管瘤	0%	9%

基因檢測的部份，如前所預測的 long range PCR 是一個困難點。的確遭遇到一些困難，目前已找到一些方法來克服，如順利的話，其他步驟皆可順利進行，得到完整的成果。Rossetti 等人所做的研究顯示用 DHPLC 方法於 45 位自體顯性多囊腎病人中找出 29 位基因異常，其中 26 個為 PKD1，而 3 個為 PKD2【20】。由此可知 DHPLC 對自體顯性多囊腎病人是一個不錯的檢測工具。

參考文獻

1. Gabow PA, Grantham JJ: Polycystic kidney disease. In: Disease of the Kidney Schrier RW, Gottschalk CW eds Boston, Little and Brown,1997: 521-560
2. Calvet JP, Grantham JJ: The genetics and physiology of polycystic kidney disease. Semin Nephrol 2001; 21:107-123
3. Consortium EPKD: The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. Cell 1994; 77:881-894
4. Hughes J, Ward CJ, Peral B, et al: The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. Nat Genet 1995; 10:151-160
5. International Polycystic Kidney Disease Consortium: polycystic kidney disease: The complete structure of the PKD1 gene and its protein. Cell 1995; 81:289-298
6. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, et al: PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. Science 1996; 272:1339-1342
7. Hateboer N, van Duk MA, Bogdanova N, et al: Comparison of phenotypes of

- polycystic kidney disease type 1 and 2. *Lancet* 1999; 353:103-107
8. Watnick T, Germino GG: Molecular basis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Semin Nephrol* 1999; 19:327-343
 9. Rossetti S, Strmecki L, Gamble V, et al: Mutation analysis of the entire PKD1 gene: Genetic and diagnostic implications. *Am J Hum Genet* 2001; 68:46-63
 10. Thomas R, McConnell R, Whittaker J, et al: Identification of mutations in the repeated part of the autosomal dominant polycystic kidney disease type 1 gene, PKD1, by long-range PCR. *Am J Hum Genet* 1999; 65:39-49
 11. Phakdeekitcharoen B, Watnick TJ, Ahn C, et al: Thirteen novel mutations of the replicated region of PKD1 in an Asian population. *Kidney Int* 2000; 58:1400-1412
 12. Phakdeekitcharoen B, Watnick T, Germino GG: Mutation analysis of the entire replicated portion of PKD1 using genomic DNA samples. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:995-963
 13. Igarashi P, Somlo S: Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:2384-2398
 14. Oefner PJ, Underhill PA: DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Curr Prot Hum Genet* 1998; 7:10.11-10.12
 15. Jones AC, Austin J, Hansen N, et al: Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clin Chem* 1999; 45:1133-1140
 16. Xiao W, Oefner PJ: Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* 2001; 17:439-47
 17. Su YN: Clinical use of BRCA1/BRCA2 gene analysis in breast cancer patient. *Formosan J Med* 2002; 6:706-713
 18. Wei SC, Wong JM, Shieh MJ, Wang JY: Gene analysis of colorectal cancer. *Formosan J Med* 2002; 6:721-726
 19. Ravine D, Gibson RN, Walker RG, et al: Evaluation of ultrasonographic diagnostic criteria for autosomal dominant polycystic kidney disease 1. *Lancet* 1994; 343:824-7
 20. Rossetti S, Chauveau D, Walker D, et al: A complete mutation screen of the ADPKD genes by DHPLC. *Kidney Int* 2002; 61:1588-1599

計畫結果自評部分

臨床部分已照原計畫施行並得到結果。基因檢測部分因 long range PCR 碰到一些困難，致有延遲，現已找到方法克服此困難，即將得到完整結果。