

• 临床检验研究论著 •

脆性 X 综合征致病基因 FMR1 一个新型隐匿外显子发现及其鉴定*

郭小艳,富显果[#],严爱贞,廖娟,张朵,柯龙凤,兰风华[△]

(南京军区福州总医院临床遗传与实验医学科,福建福州 350025)

摘要:目的 分析脆性 X 智力障碍 1 基因(FMR1 基因)可变剪接表达类型。方法 采用克隆-测序技术,从 RNA 途径分析入 FMR1 基因的可变剪接表达。结果 构建健康人外周血 cDNA 53 个 T 克隆,测序结果显示 4 个 T 克隆均有 140 bp 大小的插入片段(NG_007529;21452-21591),为 FMR1 内含子 9 的一部分,生物信息学比对显示该片段上下游具有 4 个经典的剪接信号,可能为新的隐匿外显子。巢式 PCR 显示健康人多种组织 cDNA 中普遍存在该片段。杂种小基因剪接试验显示该片段可通过可变剪接,与上游的外显子 9 和下游的外显子 10 同时出现在体外培养真核细胞的成熟 mRNA 中。结论 该研究发现人 FMR1 基因的新型隐匿外显子,丰富了人 FMR1 基因可变剪接的内容,也为进一步研究可变剪接与脆性 X 综合征发病机制之间的关系和脆性 X 智力障碍 1 蛋白的功能奠定了基础。

关键词:FMR1 基因; 可变剪接; 脆性 X 综合征; 生物信息学; 杂种小基因接剪实验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)01-0006-03

Identification of a novel cryptic exon in intron 9 region of FMR1 gene among fragile X syndrome*

Guo Xiaoyan, Fu Xiangguo[#], Yan Aizhen, Liao Juan, Zhang Duo, Ke Longfeng, Lan Fenghua[△]

(Department of Clinical Genetics and Experimental Medicine, Fuzhou General Hospital, Fuzhou, Fujian 350025, China)

Abstract: **Objective** To analyze the expression of alternative splicing in fragile X mental retardation 1 gene(FMR1 gene). **Methods** Clone-sequencing technology was used for the analysis of expression of human FMR1 gene. **Results** 53 T clones of peripheral blood cDNA of healthy subjects were constructed, among which 4 clones were confirmed to be with a 140 bp fragment, which was a part of intron 9(NG_007529;21452-21591) in FMR1 gene. Bioinformatics analysis indicated that there were four canonical splicing signals surrounding the 140 bp fragment, enabling it to be a novel cryptic exon. Nested PCR showed that this fragment was also present in the cDNA libraries of various tissues of healthy individual. Hybrid minigene splicing assay confirmed that the cytological behavior of the fragment was in complete agreement with an alternative exon. The inclusion of this alternative exon into the mature mRNA of human FMR1 would lead to the shift of reading frame downstream exon 9 and the appearance of premature stop codon 11 bases downstream exon 9. **Conclusion** The identification of this novel alternative exon could demonstrate that more complexity might exist in the alternative splicing of human FMR1 and shed new light on the function of fragile X mental retardation 1 protein, as well as the pathogenesis of fragile X syndrome.

Key words: FMR1 gene; alternative splicing; fragile X syndrome; bioinformatics; hybrid minigene splicing assay

脆性 X 综合征(FXS)是常见遗传性智力障碍性疾病,位于染色体 Xq27.3 处的脆性 X 智力障碍 1 基因(FMR1)与 FXS 密切相关,其所编码的脆性 X 智力障碍蛋白(FMRP)为选择性、多功能的 RNA 结合蛋白^[1-4]。FMR1 基因存在复杂的可变剪接,主要涉及外显子 12、14 的去留及外显子 15、17 不同剪接受位的选择,形成多种具有不同 RNA 结合能力及亚细胞定位的 FMRP 异构体,使其具有不同的功能^[5-7]。如缺乏外显子 14 的 FMRP 异构体只出现在细胞核而非细胞质中,即外显子 14 跳跃将导致相应蛋白的亚细胞定位发生改变^[7]。在已鉴定的人 FMRP 异构体中,大多保留可与 RNA 结合的 KH1 和 KH2 结构域^[7]。笔者新发现一个隐匿外显子,可导致相应产物缺乏完整 KH2 及其下游的部分功能性结构域。本研究有助于进一步阐明 FMR1 可变剪接与 FMRP 功能的关系,并为 FXS 发病机制研究提供了新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料 HeLa 细胞株为本实验室保存。全血 RNA 提取试剂盒(德国 Qiagen),SuperScriptTM 逆转录试剂盒、pcDNA

3.1/Hygro(+)载体、Trizol 和 LipofectamineTM2000(美国 Invitrogen),pGEM T-easy 载体系统试剂盒(美国 Promega),限制性内切酶 NheI 和 XhoI(英国 NEB),含去内毒素质粒抽提纯化试剂盒(美国 Omega),高糖 DMEM、胎牛血清和胰蛋白酶-EDTA(美国 Gibco),DNA 胶回收试剂盒(上海生物工程公司)。健康人脑组织、胎盘组织、子宫组织、甲状腺组织和全血淋巴细胞 cDNA 文库(美国 Clontech)。

1.2 FMR1 基因 T 克隆-测序 取 1 份健康人外周血 cDNA,依据 GenBank 公布的人 FMR1 mRNA(NM_002024)全长序列,设计针对 FMR1 基因编码区全长序列的引物 PI-F 和 RT-4 (PI-F: 5'-TCGAGCGCCCCGAGCCACCTCT-3'; RT-4: 5'-TGCCCTGTGCCATCTTGCTACTATTT-3')。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳、胶回收、纯化后以 T4 DNA 连接酶 4℃连接过夜,连接产物转化 XL1-Blue 感受态细胞,置于四环素和氨苄西林阳性 LB 固体培养基,筛选阳性菌落至 3 mL 新鲜的含抗菌药物 LB 液体培养基中振荡培养过夜,菌液送上海 Invitrogen 公司抽提质粒并测序。

* 基金项目:福建省科技计划重点资助项目(2010Y0045)。作者简介:郭小艳,检验技师,主要从事遗传病分子诊断研究;富显果,男,主管检验技师,主要从事遗传病分子诊断研究。[#] 共同第一作者。[△] 通讯作者,E-mail:fhlan009@qq.com。

1.3 140 bp 片段的生物信息学分析 在 NCBI EST 数据库针对 140 bp 片段进行检索以获得相关片段信息,采用 Alternative Splicing Database(ASD)^[8]、Human Splicing Finder(HSF, <http://www.umd.be/HSF/>)、BDGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)^[9]及 ASPicDB(<http://t.caspar.it/ASPicDB/index.php>)^[10]软件对经 T 克隆-测序发现的 140 bp 片段进行剪接信号分析,预测可能的 FMR1 可变剪接受体。

1.4 140 bp 片段的巢式 PCR 鉴定 依据 GenBank 公布的人 FMR1 DNA 序列(NC000023),设计第 1 轮引物(E9: 5'-GAGAGGATCAGGATGCAGTGA-3'; E10: 5'-GGCATAAT TTCCTCTTCTTGTGGA-3')和第 2 轮引物(9-F: 5'-GAACT-TAGTAGGGTTGAAGATC-3'; 9-R: 5'-TATTACTTTGCG ATGGTGAT-3')(图 1 见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。以 6 份健康人外周血及 5 种组织 cDNA 文库为第 1 轮 PCR 模板,扩增 FMR1 基因新型隐匿外显子,PCR 反应总体积为 25 μ L,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s 循环 30 次,72 $^{\circ}$ C 7 min。第 2 轮 PCR 模板为第 1 轮 PCR 产物,其余条件与第 1 轮相同。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析后,送上海 Invitrogen 公司进行测序。第 1 轮扩增产物片段预期大小为 205 bp(不含 140 bp 片段)或 345 bp(含 140 bp 片段)。第 2 轮扩增产物片段预期大小为 162 bp。

1.5 140 bp 片段杂种小基因剪接试验 杂种小基因剪接试验是鉴定可变剪接及其影响因素的经典实验^[11]。首先扩增 FMR1 基因的一部分,上游引物(5'-GT-CAGCTAGCGCTAGAAGCTTCTCGAATTTGC-3',下划线为 NheI 酶切位点)位于外显子 9 靠近内含子 9 的部分,下游引物(5'-CGATCTCGAGCACAATCTCCTGAATCAGCTTTC-3',下划线为 XhoI 酶切位点)位于外显子 10 靠近内含子 9 的部分,片段长 3 862 bp,包括内含子 9、部分外显子 9 和部分外显子 10,此片段即“小基因”。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳、胶回收、内切酶 NheI/XhoI 酶切后,与线性 pcDNATM3.1/Hygro(+)载体进行连接反应;连接产物转化大肠埃希菌 DH5 α 菌株;扩增重组菌,提取重组质粒,用 NheI/XhoI 双酶切鉴定后,送上海 Invitrogen 公司测序;用序列正确的重组质粒瞬时转染 HeLa 细胞,48 h 后收集细胞、提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,以此为模板再进行巢式 PCR 鉴定。巢式 PCR 引物为 T7 和 BGH(第 1 轮)、9-F 和 BGH(第 2 轮),T7 序列为:5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'; BGH 序列为 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'。预期扩增产物大小为 195 bp(重组质粒,第 1 轮,不含 140 bp 片段)、177 bp(空载体,第 1 轮)、254 bp(重组质粒,第 2 轮,含 140 bp 片段)。

2 结 果

2.1 T 克隆-测序结果 共挑取 53 个 T 克隆,有 4 个在 FMR1 基因外显子 9、10 之间成功插入 140 bp 大小片段,其序列与内含子 9(NG_007529;21452-21591)的部分序列完全一致,且因其插入改变了原有开放阅读框,在外显子 9 序列后第 11 位碱基处引入终止密码子(图 2 见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

2.2 140 bp 片段生物信息学分析 EST 数据库检索结果显示,来自人睾丸组织的 EST 中有 1 个含该 140 bp 片段(DB078562 TESTI4),在相应 mRNA 中也位于外显子 9、10 之间。采用 ASD 软件对 140 bp 片段进行剪接信号分析,表明该片段两端具有经典的剪接位点:3'剪接受位(ag)和 5'剪接供位(gt),符合 GT-GA 法则,其上游还有分支点序列(BPS,-ttct-

tAt-)和多聚嘧啶序列(PPT,5'-TTCATTTTAATTATCTC-3')(图 3 见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”),说明此片段具备成为可变剪接受体的基本条件。HSF 软件预测结果显示,140 bp 片段 5'剪接供体共识值(CV)为 82.12、3'剪接受体为 86.9,外显子 9 的 5'剪接供体 CV 为 98.02、3'剪接受体为 81.84,外显子 10 的 5'剪接供体 CV 为 89.44、3'剪接受体为 85.02。其中 CV 高于 80 者具有较强剪接信号,CV 为 70~80 的剪接位点剪接信号较弱,少部分剪接位点的 CV 为 65~70^[12]。BDGP 预测结果显示,外显子 9 的 5'剪接供体、3'剪接受体 CV 为 1.0、0.93,外显子 10 的 5'剪接供体、3'剪接受体 CV 为 0.99、0.99,140 bp 片段 5'剪接供体、3'剪接受体 CV 为 0.95、0.90。ASPicDB 预测到 35 种 FMR1 基因转录产物,其中 8 种转录产物(FMR1. tr²/3/4/10/11/12/14/20)含 140 bp 大小片段。

2.3 正常组织 cDNA 巢式 PCR 6 份健康人外周血和 5 种 cDNA 文库第 1 轮 PCR 产物电泳图中均可见 205 bp 条带(图 4A、B 见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”),未见 345 bp 产物;第 2 轮 PCR 产物电泳图均可见 162 bp 条带(图 4C、D 见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。将上述两轮 PCR 产物送上海 Invitrogen 公司测序,结果表明第 2 轮 PCR 产物均存在 140 bp 片段。

2.4 杂种小基因剪接试验 以瞬时转染 HeLa 细胞总 RNA 逆转录合成的 cDNA 为模板进行巢式 PCR,第 1 轮 PCR 主要产物大小约为 200 bp(不含 140 bp 片段),与预期相符;第 2 轮 PCR 主要产物大小在 300 bp 与 200 bp 之间,与预期大小(254 bp)相符。测序结果显示,第 1 轮 PCR 产物不含 140 bp 片段,只含外显子 9 和部分外显子 10 片段;第 2 轮 PCR 产物除包括外显子 9 和部分外显子 10 片段外,中间还插入了 140 bp 片段。

3 讨 论

有研究表明,92%~94% 的人体基因在其 mRNA 前体的加工成熟过程中存在可变剪接^[13]。可变剪接意味着 1 个基因有 1 种以上成熟 mRNA 产物,可编码 1 个以上的多肽链;同一个基因编码的不同多肽链可具有相关的、不同的、甚至相反的功能,如此可丰富基因组的内涵,增加蛋白质组的多样性。因此,可变剪接是基因表达的重要调控环节,具有极其重要的生物学意义,与某些疾病(如肿瘤)的发生、发展也有一定的关系^[14]。可变剪接最常见的类型是外显子跳跃,被“跳跃”外显子又称可变外显子或盒式外显子,而出现在所有剪接异构体上的外显子称为组成性外显子。其他剪接类型包括:可变剪接受位、可变剪接供位、内含子保留、互斥外显子、多重启动子、多重多聚腺苷位点等^[15-17]。

Verkerk 等^[2]首先在 FMR1 基因中发现了 1 个可变外显子(外显子 12)和 3 个可变剪接受位(第 15 外显子 2 个、第 17 外显子 1 个),推测可形成 12 种(2 $\times$ 3 $\times$ 2)剪接受体。Ashley 等^[3]通过分析人和小鼠 FMR1 基因可变剪接,也推测 FMR1 基因有 12 个剪接受体,但没有发现 Verkerk 等^[2]确定的第 17 外显子可变剪接受位,却发现 1 个可变剪接受外显子(外显子 14),同时还发现人与小鼠的剪接方式相同,缺失外显子 14 的剪接受体所编码的多肽具有不同的羧基端。Eichler 等^[18]则不仅肯定了第 17 外显子 1 个可变剪接受位的存在,还指出第 10 外显子也存在 1 个可变剪接受位。Sittler 等^[7]在总结前人研究的基础上,推测 FMR1 基因共有 24 种(2 $\times$ 2 $\times$ 3 $\times$ 2)剪接受体(外显子 14 被剪接时,优先使用外显子 15 第 3 个剪接受位,

故实际只有 20 种),涉及 2 个可变外显子(外显子 12、14)和 3 个可变剪接受位(第 15 外显子 2 个、第 17 外显子 1 个)^[7]。丁剑涛等^[19]鉴定出第 17 外显子第 3 个可变剪接受位,使 FMR1 基因可能的剪接产物增加到 36 种($2 \times 2 \times 3 \times 3$)^[19]。

FMRP 广泛表达于人体各种组织,以大脑和睾丸含量最高^[20]。FMRP 作为 RNA 结合蛋白,穿梭于细胞核和细胞质,有 3 个主要的功能区域:4 个 RNA 结合区(包括 KH1、KH2 结构域及 RGG 框、位于 N 端的 RNA 结合区)、核定位信号(NLS)、核输出信号(NES)。KH1、KH2 结构域由外显子 8、9 和 10 编码,RGG 框由外显子 15、16 编码,NES 由外显子 14 编码。FMRP 通过以上功能区与 mRNA 选择性结合,调节其转录、转运和代谢,对大脑神经元的发育和树突可塑性具有重要作用^[21]。

笔者通过对健康人外周血 FMR1 基因编码区全长进行测序,意外发现部分产物的外显子 9 和 10 之间插入了 1 个来自于内含子 9、长 140 bp 的片段。生物信息学分析表明,该片段具备作为外显子的基本条件,并在人睾丸组织 EST 数据库中找到了该片段。巢式 PCR 证实,该片段普遍存在于健康人多种组织 FMR1 基因成熟的转录产物中。在杂种小基因剪接试验中,该片段可通过可变剪接,与上游的外显子 9 和下游的外显子 10 同时出现在体外培养的哺乳细胞成熟的 mRNA 中。以上结果证明,人 FMR1 基因内含子 9 中的 1 个 140 bp 片段是该基因的新的可变剪接外显子。

在人 FMR1 基因完整的、成熟 mRNA 中,140 bp 可变剪接外显子的插入改变了外显子 9 以后的开放阅读框,并在其后的第 11 位碱基处引入终止密码子,导致相应异构体变成缺乏完整 KH2 结构域及 NES、RGG 盒的截短 FMRP。FMRP 中 KH2 结构域、RGG 框及 NES 的丢失将明显影响其结合相关 mRNA 的能力及 FMRP 的定位。既往研究曾报道 1 例 CGG 重复数正常的重症 FXS 患者,其 FMR1 基因编码 KH2 结构域存在 1 个错义突变(Ile367Asn),从侧面证明 KH2 结构域对 FMRP 功能的发挥至关重要^[22-23]。至于该 140 bp 可变剪接外显子的插入如何影响 FMRP 功能、是否与 FXS 发病有关,尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Garber KB, Visootsak J, Warren ST. Fragile X syndrome[J]. Eur J Hum Genet, 2008, 16(5): 666-672.
- [2] Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome[J]. Cell, 1991, 65(5): 905-914.
- [3] Ashley CT Jr, Wilkinson KD, Reines D, et al. FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding[J]. Science, 1993, 262(5133): 563-566.
- [4] Zalfa F, Bagni C. Molecular insights into mental retardation: multiple functions for the fragile X mental retardation protein[J]. Curr Issues Mol Biol, 2004, 6(2): 73-88.
- [5] Ashley CT, Sutcliffe JS, Kunst CB, et al. Human and murine FMR-1: alternative splicing and translation initiation downstream of the CGG-repeat[J]. Nature Genet, 1993, 4(3): 244-251.
- [6] Verkerk AJMH, Graaff ED, Boule KD, et al. Alternative splicing in the fragile X gene FMR1[J]. Hum Mol Genet, 1993, 2(4): 399-404.
- [7] Sittler A, Devys D, Weber C, et al. Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of FMR1 protein isoforms[J]. Hum Mol Genet, 1996, 5(1): 95-102.
- [8] Thanaraj TA, Stamm S, Clark F, et al. ASD: the alternative splicing database[J]. Nucleic Acids Res, 2004-01-01[2012-11-02], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC308764/>.
- [9] Bellen HJ, Levis RW, Liao G, et al. The BDGP gene disruption project[J]. Genetics, 2004, 167(2): 761-781.
- [10] Castrignano T, D'Antonio M, Anselmo A, et al. ASPicDB: a database resource for alternative splicing analysis[J]. Bioinformatics, 2008, 24(10): 1300-1304.
- [11] Pagani F, Buratti E, Stuaní C, et al. Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a non-evolutionary conserved intronic element[J]. J Biol Chem, 2000, 275(28): 21041-21047.
- [12] Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, et al. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(9): 67-69.
- [13] Wang ET, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes[J]. Nature, 2008, 456(7221): 470-476.
- [14] Cooper TA, Wan L, Dreyfuss G. RNA and disease[J]. Cell, 2009, 136(4): 777-793.
- [15] Kim E, Goren A, Ast G. Alternative splicing: current perspectives[J]. BioEssays, 2007, 30(1): 38-47.
- [16] Matlin AJ, Clark F, Smith CWJ. Understanding alternative splicing: towards a cellular code[J]. Nature Reviews Mol Cell Biol, 2005, 6(5): 386-398.
- [17] 张利绒, 罗辽复, 邢永强, 等. 人类基因组中可变和组成性剪接位点的预测[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(10): 1188-1194.
- [18] Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, et al. Fine structure of human FMR1 gene[J]. Hum Mol Genet, 1993, 2(8): 1147-1153.
- [19] 丁剑涛, 黄涛, 李兰英, 等. FMR1 基因在人胚胎组织中的选择剪接表达[J]. 中国医学科学院学报, 1997, 19(4): 241-246.
- [20] Devys D, Lutz Y, Rouyer N, et al. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation[J]. Nat Genet, 1993, 4(4): 335-340.
- [21] Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, et al. The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein[J]. Cell, 1993, 74(2): 291-298.
- [22] De Boule K, Verkerk AJMH, Reyniers E, et al. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation[J]. Nat Genet, 1993, 3(1): 31-35.
- [23] Siomi H, Choi M, Siomi MC, et al. Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome[J]. Cell, 1994, 77(1): 33-39.

(收稿日期: 2012-07-28)