

臺灣一位 Hurler 型黏多醣儲積症(MPS IH) 患者的 IDUA 基因突變分析及記述

鄧燕妮 李桂楨 王作仁 胡務亮

國立臺灣師範大學生物學系

臺大醫院小兒部

本研究的目的是檢視臺灣一位 Hurler 型黏多醣儲積症(MPS IH)患者的 α -L-iduronidase (IDUA) 基因突變。首先利用和 IDUA 基因序列互補的寡核苷酸引子及聚合酶鏈反應(PCR)，放大包含此基因各表現子片段；經洋菜膠體電泳檢查後，進行單股核酸構形多型性(SSCP)分析，以初步篩檢突變。再進一步將異常大小或構形的表現子片段選殖定序，以檢測患者的基因突變。結果發現患者為表現子 9 的異型合子突變，其對偶基因 1 上第 1447-1473 cDNA 序列發生缺失(1447del27)，造成 9 個胺基酸的缺失及第 453 個胺基酸由絲胺酸(Ser)轉變為精胺酸(Arg)；對偶基因 2 上的第 1474 個 cDNA 序列則發生 15 個核苷酸的插入(1474ins15)，造成 5 個胺基酸的插入。進一步構築僅含上述突變點的 IDUA cDNA 重組質體，並經 lipofection 的方式轉移入 COS-7 細胞中表現後，含 1447del27、1474ins15 變異的 IDUA 重組質體轉移細胞所表現的酵素活性僅為野生型之 0.1%、0.3%。北方吸漬(northern blot)分析顯示，含 1447del27、1474ins15 變異的重組質體轉移細胞所表現的 IDUA mRNA 量，分別為野生型之 24%、49%。西方吸漬(western blot)分析顯示，重組質體轉移細胞所表現的突變的 IDUA 蛋白質，在 IDUA 多株抗體偵測的底限之下。本實驗結果顯示，此病人在表現子 9 的缺失及插入突變，影響 IDUA 酵素活性，造成患者臨床上嚴重的性狀。

關鍵詞：Hurler 型黏多醣儲積症、IDUA、基因突變

前言

黏多醣儲積症 (mucopolysaccharidosis, 簡稱 MPS) 為一群遺傳性代謝障礙疾病，由於溶小體水解酵素的缺失，導致無法正常代謝的黏多醣在細胞中儲積，影響細胞功能，並隨著尿液排出。臨床上，黏多醣儲積症依據所缺失的溶小體酵素種類可分為六型，體染色體隱性遺傳的第一型黏多醣儲積症 (MPS I) 是由於 α -L-iduronidase (IDUA) 酵素活性缺失，導致 heparan sulfate 及 dermatan sulfate 儲積，造成包括外表上明顯改變等廣泛影響。MPS I 患者表現的臨床症狀差異很大，Hurler 型的患者症狀嚴重，出生一歲左右即出現肝臟、脾臟、骨骼、角膜等病變且重度智能障礙，患者常因呼吸道感染及心臟病變，於幼年時即死亡；Scheie 型的患者症狀輕微，

智能可能正常，存活情況和常人無異；Hurler/Scheie 型的患者，則表現中間的症狀(Neufeld and Muenzer, 1989)。目前臨床的診斷以檢測尿液中 heparan sulfate、dermatan sulfate 的含量及白血球中 IDUA 酵素活性等為主，治療則以骨髓移植(Whitley et al., 1986; Hopwood et al., 1993)為主。近年來亦朝向酵素替換治療(Shull et al., 1994; Kakkis et al., 1996)的方向發展。

已被分離並定序的 IDUA 基因全長約 19 kb，由 14 個表現子(exon)組合成 2.1 kb 長的 cDNA (Scott et al., 1991, 1992)。國外學者針對歐美、中東等地 MPS I 患者所作的 IDUA 基因突變分析研究，顯示 IDUA 基因突變的高度異質性(heterogeneity)變化。除了二

種常見的 W402X 和 Q70X 突變外，尚包括多種點突變、缺失、插入及裁接突變等(瀏覽於 Scott et al., 1995)。國人的 MPS I 患者的突變分析亦顯示出 IDUA 基因突變的異質性(Lee-Chen and Wang, 1997; Chin et al., 1998; Lee-Chen et al., 1999)。此等突變分析研究可反應出患者基因型和外表型的關係，提供臨床上治療的參考。

本研究是以聚合酶鏈反應(PCR)、單股核酸構形多型性(SSCP)分析及 DNA 定序法，來檢測臺灣一位

Hurler 型黏多糖儲積症(MPS IH)患者的分子致因。結果發現患者為異型合子的突變，其二個對偶基因的表現子 9 上分別發生 1447del27 和 1474ins15 的突變。含突變點的 IDUA cDNA 重組質體，在轉移細胞中表現的 IDUA 酵素活性，僅為野生型 cDNA 基因之 0.1%、0.3%。此病人在表現子 9 的缺失及插入突變，降低了 IDUA 酵素活性，造成患者臨床上嚴重的症狀。

材料與方法

聚合酶鏈反應(PCR)

取 200-500 ng 由患者纖維母細胞萃取的基因組 DNA，加入 2.5 μ l 10 \times 緩衝液、2 μ l dNTP (2.5 mM)、0.5 μ l 引子(100 ng/ μ l)、0.25 U DNA 聚合酶(Promega)，調整體積為 25 μ l，經由熱循環儀(OmniGene, HYBAID)進行 PCR 反應。各反應所用的引子對、煉合溫度、反應條件及放大片段長度均列於表一。

單股核酸構形多型性(SSCP)分析

上述 PCR 放大產物，取 2 μ l 以 1.4%洋菜膠體電泳檢查。大於 300 bp 的 PCR 產物，以適當限制酶(表一)切割成約 100-300 bp 片段，以進行 SSCP 分析：取 3 μ l(約 50-200 ng)的 PCR 產物，加入同體積的 formamide buffer (95% formamide, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol)，均勻混合、95 $^{\circ}$ C 變性(denature)5 分鐘後，置於冰上迅速冷卻 5 分鐘；取 5 μ l 置於 12.5%的聚丙烯醯膠體(GeneGel Excel, Pharmacia Biotech)，於 8 $^{\circ}$ C、600 V、25 mM、15 W 進行電泳 1.5 小時；電泳完畢後，經銀染色偵測單股 DNA。

DNA 序列分析

異常大小或構形的表現子片段，以 1.4%洋菜膠體電泳分離、純化(JETsorb, GENOMED)後，置入 pGEM-T Easy 載體(Promega)中。篩選 4~6 個純系大量製備後，以自動 DNA 序列分析儀(A. L. F. DNA SequencerTM, Pharmacia)，進行雙去氧核糖鏈停止法(dideoxy sequencing)(Sanger et al., 1977)定核苷酸序列。

IDUA cDNA 重組質體的構築

包含患者表現子 9 突變的純系，以限制酶 *Pst*I 及 *Sma*I 切下含上述 DNA 定序發現的缺失(1447del27)或插入(1474ins15)突變的片段，置換 pcDNA3-IDUA 重組質體(Wang, 1996)中相對應的片段，以構築 pcDNA3-IDUA/1447del27、pcDNA3-IDUA/1474ins15 重組質體。所構築的重組質體以限制酶切割確認之。

重組質體的轉移與 IDUA 活性的測定

培養 COS-7 細胞(American Type Culture Collection)於含 10%胎牛血清(FCS, ICN)、100 U/ml penicillin (Sigma)之 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, ICN)培養液中。接種 10⁵個 COS-7 細胞至 60 mm 培養盤。24 小時後，取 2 μ g DNA 的 pcDNA3、pcDNA3-IDUA、pcDNA3-IDUA/1447del27 或 pcDNA3-IDUA/1474ins15，以 lipofection 的方式

表一 PCR 反應條件及放大片段長度

放大表現子	引子對名稱及位置 ^a	煉合溫度(°C)	反應條件	限制酶 ^b	放大長度(bp)
1	ID58(496-519)	66	2.5 mM MgCl ₂		245
	ID65(740-717)		10% DMSO		
2	ID25(1231-1254)	65	1.5 mM MgCl ₂		258
	ID23(1488-1465)		3% formamide		
3-4	ID35(391-415)	68	1.5 mM MgCl ₂	<i>Hinfl</i>	200*,279*
	ID43(869-845)		3% formamide		
5	ID55(1239-1263)	68	1.5 mM MgCl ₂		211
	ID56(1449-1425)		3% formamide		
6	ID65(1447-1470)	65	1.5 mM MgCl ₂		301
	ID105(1747-1724)		3% formamide		
7	ID106(1759-1782)	70	1.0 mM MgCl ₂		272
	ID73(2030-2007)		10% DMSO		
8	ID85(2053-2076)	65	1.5 mM MgCl ₂	<i>FspI</i>	118*,206*
	ID83(2376-2353)		3% formamide		
9	ID90(2434-2457)	63	1.5 mM MgCl ₂	<i>AluI</i>	124*,247*
	ID109(2804-2781)		3% formamide		
10	ID110(2781-2804)	66	1.0 Mm MgCl ₂		298
	ID112(3078-3055)				
11-12	ID115(3128-3141)	67	1.0 Mm MgCl ₂	<i>SmaI</i>	152*,219*
	ID123(3498-3475)				
13-14	ID135(3797-3820)	65	1.5 Mm MgCl ₂	<i>Hinfl</i>	156*,302*
	ID143(4254-4231)		3% formamide		

^a 放大表現子的引子對位置係根據 Scott et al. (1992).

^b PCR 產物經限制酶切割成長度 100-300 bp 片段*, 以進行 SSCP 分析。

(LipofectAMINE, GIBCO) 轉移入 COS-7 細胞 (Hawley-Nelson et al., 1993)。45 小時後收集 COS-7 細胞, 以連續五次的液態氮急速冰凍、冰上解凍的方法打破細胞, 製備細胞萃取液。定量蛋白質(Protein Assay Dye Reagent, Bio-Rad)後, 取含 2 μ g 總蛋白質的細胞萃取液, 加入受質 4-methylumbelliferyl- α -L-iduronide (Sigma), 測定 IDUA 酵素的活性 (Hopwood et al., 1979)。

北方吸漬法分析 IDUA mRNA 的表現

利用 acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 方法(Chomczynski and Sacchi, 1987), 抽取重組質體轉移細胞的 RNA。取 10-15 μ g RNA, 以添加 2.2 M formaldehyde 的 1% 洋菜膠體電泳分離 (80 V、1.5 小時) 後, 轉移至尼龍膜(BioTrans, ICN) 上。轉移的 RNA 經 UV 光照射固定於膜上後, 以 DIG

標記之 IDUA 或 NEO 探針, 於 42°C 雜合箱中雜合 20 小時。雜合後的尼龍膜, 經清洗後進行呈色反應 (Sambrook et al., 1989)。呈色的尼龍膜再以膠體影像分析系統(ImageMaster VDS, Pharmacia), 比較各轉移細胞的 IDUA mRNA 相對表現量。

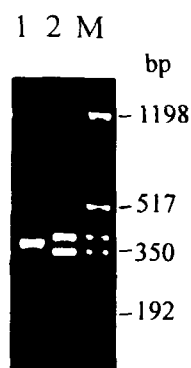
西方吸漬法分析 IDUA 蛋白質的表現

取 5 μ g 總蛋白質, 以含 SDS 的 4% stacking-8% separating 聚丙烯醯膠體電泳分離(120 V、1.5 小時) 後, 轉移(45 V、0.5 小時)到硝化纖維(nitrocellulose) 膜上(X Cell II™ Blot Module, NOVEX)。轉移的 IDUA 蛋白質與 IDUA 一級抗體(Tang, 1998)及二級抗體複合物 (goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate, BM) 結合後, 進行呈色反應(Sambrook et al., 1989)。

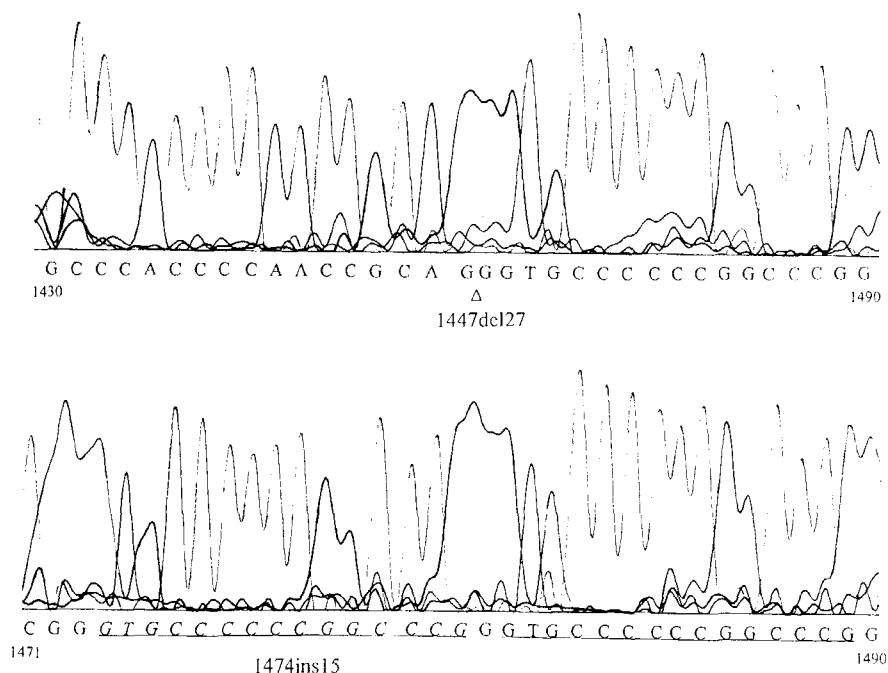
結果

患者的 IDUA 基因突變分析

PCR 放大的 IDUA 表現子 1-8 及 10-14 片段，無論是洋菜膠體電泳或 SSCP 分析，均無異常現象 (data not shown)。而包含表現子 9 的片段，在洋菜膠體電泳分析時出現異常的二個片段 (圖一)。此二個異常片段經選殖定序列後，發現缺失(1447del27)及插入(1474ins15)的改變。即患者為表現子 9 的異型合子突變，其對偶基因 1 上缺失第 1447-1473 的 27 個鹽基的 cDNA 序列；對偶基因 2 上則於第 1474 個 cDNA 位置插入了源自於第 1475-1489 cDNA 序列的 15 個鹽基 (圖二)。



圖一 包含 IDUA 基因表現子 9 的 PCR 放大片段的 1.4% 洋菜膠體電泳照片。Lane 1 為正常人 DNA 樣品所放大的 371 bp 片段；lane 2 為患者 DNA 樣品所放大的異常片段。



圖二 患者 IDUA 基因表現子 9 的定序結果。(上) 1447del27，即缺失第 1447-1473 的 27 個鹽基的 cDNA 序列。(下) 1474ins15，即第 1474 的 cDNA 位置插入 15 個鹽基 (斜體字型底部劃橫線者)，此 15 個鹽基係源自於第 1475-1489 cDNA 序列 (正體字型底部劃橫線者)。

突變對 IDUA 酵素活性的影響

將野生型及含 1447del27、1474ins15 變異之 IDUA cDNA 重組質體，分別轉移入 COS-7 細胞中表現後，製備細胞液測定各轉移細胞的 IDUA 酵素活性。扣除 pcDNA3 載體轉移細胞的背景數值後，1447del27、1474ins15 轉移細胞株所測得的酵素活性，僅為野生型重組質體轉移細胞的 0.1%、0.3% (表二)。

表二 變異對 IDUA 酵素活性的影響

轉移質體	α -L-iduronidase 活性 ^a (nmol/mg protein/h)	正常% ^b
pcDNA3	6.69	0.0
pcDNA3-IDUA	146.22	100.0
pcDNA3-IDUA/1447del27	6.83	0.1
pcDNA3-IDUA/1474ins15	7.11	0.3

^a IDUA 酵素活性為二次實驗之平均值。IDUA cDNA PCR 分析顯示，各重組質體的轉移效率無顯著差異(data not shown)。

^b 扣除 pcDNA3 背景值後的計算結果。

突變對 IDUA mRNA 表現量的影響

圖三顯示北方吸漬法檢測各轉移細胞的 IDUA mRNA 表現量，並以同位於 pcDNA3 載體的 NEO 基因的 mRNA 表現量作為內在對照(internal control)，計算出各轉移細胞的 IDUA mRNA 的相對表現量。含 1447del27、1474ins15 突變的重組質體轉移細胞所表現的 mRNA 分別為野生型之 24%、49%。

突變對 IDUA 蛋白質表現量的影響

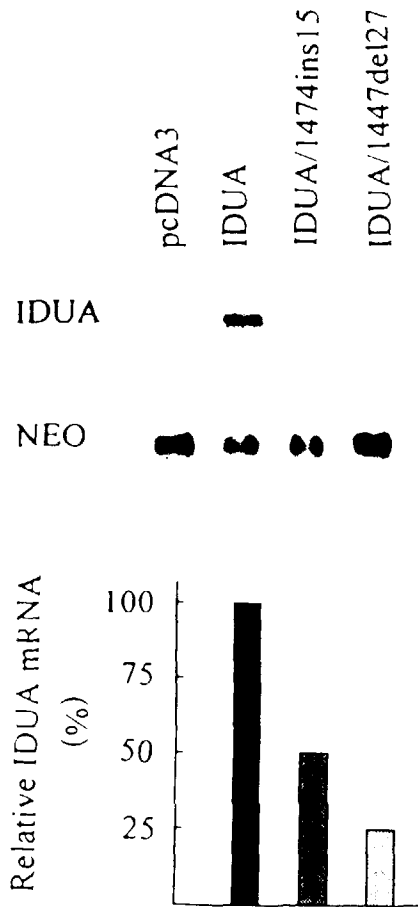
圖四顯示西方吸漬法檢測各轉移細胞的 IDUA 蛋白質的表現量。在硝化纖維膜上，各轉移細胞皆可偵測到與抗體非專一性結合的 55 kDa 蛋白質。此外，野生型質體轉移細胞可偵測到 70-74、65、49 kDa 等分子量的人類 IDUA 蛋白質(lane 2)。含 1447del27、1474ins15 突變的重組質體轉移細胞，則無法偵測到人類 IDUA 蛋白質(lanes 3 and 4)。

討論

本研究的患者臨床上屬嚴重的 Hurler 型黏多醣儲積症，其症狀於出生十個月時被診斷出，一歲八個月時死於黏多醣儲積所引發的併發症。患者的皮膚纖維母細胞的 β -D-glucuronidase 溶小體酵素活性與正常人無顯著差異，IDUA 酵素活性則相當低，不到正常人的 1% (data not shown)。本研究以 PCR、SSCP 及 DNA 定序的技術，來檢測患者的 IDUA 基因突變。結果發現患者為表現子 9 的異型合子突變，在對偶基因 1 上有 1447del27 的變異，即缺失第 1447-1473 的 cDNA 序列；對偶基因 2 上有 1474ins15 的變異，即第 1474 個 cDNA 位置插入了 15 個鹽基的重複序列 (圖二)。1447del27 的變異會造成第 454-462 個胺基酸的缺失及第 453 個胺基酸由絲胺酸改變為精胺酸；1474ins15 的變異造成第 463 個胺基酸位置插入 5 個新的胺基酸。含突變 1447del27、

1474ins15 的 IDUA mRNA，較野生型的 mRNA 稍不穩定，其表現量分別為野生型的 24%、49% (圖三)。由於患者雙親的 DNA 樣品無法取得，故無法檢測此二突變係遺傳自雙親或為 *de novo* 突變。患者二個對偶基因的缺失和插入位置非常接近，顯示此區域在 DNA 複製時，易發生錯誤。

在前人對基因缺失突變的研究(Krawczak and Cooper, 1991)中，發現缺失突變易發生於基因中特殊的反向重複序列(inverted repeats)區域。如包含 1447del27 變異的 cDNA 序列的二級結構預測模式(圖五)所示，在缺失的部位可形成不完整的迴文結構(imperfect palindrome)，此不完整的迴文結構，有較大的機會被切除(excision)，DNA 複製、修補後即產生缺失突變。



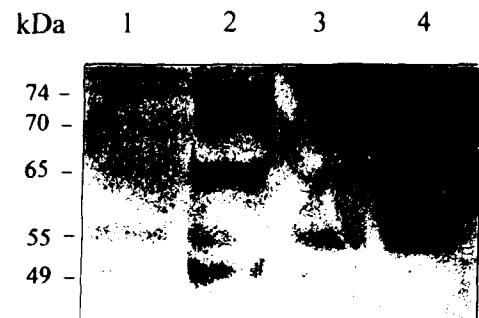
圖三 (上)pcDNA3 載體、pcDNA3-IDUA、pcDNA3-IDUA/1474ins15 及 pcDNA3-IDUA/1447del27 重組質體轉移細胞的北方吸漬分析，以 IDUA 及 NEO 探針雜合呈色結果。(下) 各轉移細胞之 IDUA mRNA 相對表現量的定量分析。

1474ins15 的變異，係源自於第 1475-1489 cDNA 序列的 15 個鹽基的重複置入。一般而言，插入性突變常為 DNA 序列的同向重複(direct repeats)置入(Nalbantoglu et al., 1988)。Phear 等人(1989)對中國倉鼠 *aprt* 基因突變的研究中，提出 DNA 聚合酶進行 DNA 複製時的些許滑動現象(slippage)，易造成同向重複序列的插入性突變。

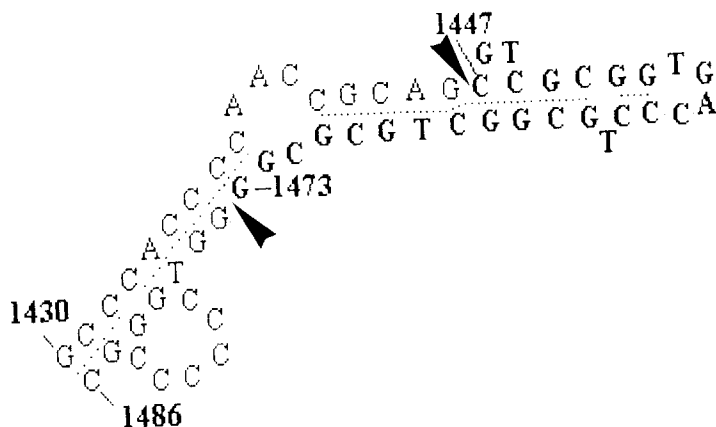
IDUA 蛋白質成熟過程中，經切除第 1-26 個胺基酸的訊息胜肽(signal peptide)及轉譯後修飾，以分

子量 74 kDa 的前驅蛋白形式離開高爾基體，進入溶小體。在溶小體內，此前趨蛋白被蛋白水解酵素陸續切除 N 端片段，成為具有活性的 65 kDa 蛋白質(包含第 107-653 個胺基酸)及不具有活性的 49 kDa 蛋白質(包含第 252-653 個胺基酸)(Scott et al., 1991)。本研究的西方轉漬分析結果顯示，野生型質體轉移細胞株可偵測到 70-74、65、49 kDa 等分子量的人類 IDUA 蛋白質，含 1447del27、1474ins15 突變的重組質體轉移細胞株，則無法偵測到人類 IDUA 蛋白質(圖四)。患者的缺失或插入突變，可能造成轉譯(translation)的障礙，或使 IDUA 蛋白質極不穩定而快速的被分解，因此 IDUA 多株抗體無法偵測到其存在。

總言之，在本研究中，我們檢視了臺灣一位 Hurler 型黏多醣儲積症患者的分子致因。此患者的缺失及插入突變，影響了 IDUA 蛋白質的合成或穩定性。由於缺乏具有活性的 IDUA 酵素，患者無法正常代謝細胞內的酸性黏多醣，進而影響細胞功能，導致臨床上嚴重的症狀。



圖四 pcDNA3 載體(lane 1)、pcDNA3-IDUA (lane 2)、pcDNA3-IDUA/1474ins15 (lane 3) 及 pcDNA3-IDUA/1447del27 (lane 4)重組質體轉移細胞的西方吸漬分析，以 IDUA 多株抗體雜合呈色，檢測 IDUA 蛋白質的表現量。



圖五 IDUA cDNA 序列 1430-1486 區域的二級結構預測模式。部分股內的配對可形成不完整的迴文結構。缺失的鹽基(1447-1473)以粗體字表示；互補的鹽基間以虛點標示。箭頭標示的位置為斷裂的部位。

參考文獻

- 王政光(1996)：人類 IDUA 基因：突變及多型性對酵素活性的影響。台北市：國立臺灣師範大學碩士論文（未出版）。
- 湯怡芬(1998)：突變及多型性的 IDUA 酵素之分子生物學研究。台北市：國立臺灣師範大學碩士論文（未出版）。
- 秦義雯、李桂楨和林炫沛(1998)：臺灣一個第一型黏多糖儲積症(MPS I)患者致病基因的分子遺傳學研究。師大生物學報, 33, 37-45.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Analytical Biochemistry* 163, 156-159.
- Hawley-Nelson, P., Ciccarone, V., Gebeyehu, G., Jessee, J., & Felgner, P. L. (1993). *LipofectAMINE reagent: a new, higher efficiency polycationic transfection reagent*. *Focus* 15, 73-79.
- Hopwood, J. J., Muller, V., Smithson, A., & Baggett, N. (1979). *A fluorometric assay using 4-methylumbelliferyl- α -L-iduronide for the estimation of α -L-iduronidase activity and the detection of Hurler and Scheie syndromes*. *Clinica Chimica Acta* 92, 257-265.
- Hopwood, J. J., Vellodi, A., Scott, H. S., Morris, C. P., Litjens, T., Clements, P. R., Brooks, D. A., Cooper, A., & Wraith, J. E. (1993). *Long-term clinical progress in bone marrow transplanted mucopolysaccharidosis type I patients with a defined genotype*. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 16, 1024-1033.
- Kakkis, E. D., McEntee, M. F., Schmidtchen, A., Neufeld, E. F., Ward, D. A., Gompf, R. E., Kania, S., Bedolla, C., Chien, S.-L., & Shull, R. M. (1996). *Long-term and high-dose trails of enzyme replacement therapy in the canine model of mucopolysaccharidosis I*. *Biochemical & Molecular Medicine* 58, 156-167.
- Krawczak, M., & Cooper, D. N. (1991). *Gene deletions causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of local DNA sequence environment*. *Human Genetics* 86, 425-441.
- Lee-Chen, G. J., & Wang, T. R. (1997). *Mucopolysaccharidosis type I: identification of novel mutations that cause Hurler/Scheie syndrome in Chinese families*. *Journal of Medical Genetics* 34, 939-941.
- Lee-Chen, G. J., Lin, S. P., Tang, Y. F., & Chin, Y. W. (1999). *Mucopolysaccharidosis type I: characterization of novel mutations affecting α -L-iduronidase activity*. *Clinical Genetics*, 56, 66-70.
- Nalbantoglu, J., Miles, C., & Meuth, M. (1988). *Insertion of unique and repetitive DNA fragments into the aprt locus of hamster cells*. *Journal of Molecular Biology* 200, 449-459.
- Neufeld, E. F., & Muenzer, J. (1989). *The mucopolysaccharidoses*. In C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, & D. Valle (Eds.), *The metabolic basis of inherited diseases* (pp. 1565-1587). 6th ed. New York: McGraw-Hill.
- Phear, G., Armstrong, W., & Meuth, M. (1989). *Molecular basis*

- of spontaneous mutation at the aprt locus of hamster cells. Journal of Molecular Biology* 209, 577-582.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (Eds.) (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.
- Scott, H. S., Bunge, S., Gal, A., Clarke, L. A., Morris, C. P., & Hopwood, J. J. (1995). *Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical, and biological implications. Human Mutation* 6, 288-302.
- Scott, H. S., Anson, D. S., Orsborn, A. M., Nelson, P. V., Clements, P. R., Morris, C. P., & Hopwood, J. J. (1991). *Human α -L-iduronidase: cDNA isolation and expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 9695-9699.
- Scott, H. S., Guo, X. H., Hopwood, J. J., & Morris, C. P. (1992). *Structure and sequence of the human α -L-iduronidase gene. Genomics* 13, 1311-1313.
- Shull, R. M., Kakkis, E. D., McEntee, M. F., Kania, S. A., Jonas, A. J., & Neufeld, E. F. (1994). *Enzyme replacement in a canine model of Hurler syndrome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 12937-12941.
- Whitley, C. B., Ramsay, N. K. C., Kersey, J. H., & Krivit, W. (1986). *Bone marrow transplantation for Hurler syndrome: assessment of metabolic correction. Birth Defects* 22, 7-24.

誌謝

感謝高雄榮民總醫院邱寶琴醫師提供病例，臺大醫院小兒遺傳室蔣書娟小姐指導皮膚纖維母細胞的培養。本研究承行政院國家科學委員會提供經費(NSC87-2311-B-003-015)，謹此致謝。

收稿日期：88年3月1日
修正日期：88年3月31日
接受日期：88年3月31日

Characterization of Novel Mutation of IDUA Gene in a Chinese Patient with Hurler Syndrome

Yen-Ni Teng Guey-Jen Lee-Chen

Department of Biology, National Taiwan Normal University

Tso-Ren Wang Wuh-Liang Hwu

Department of Medical Genetics and Pediatrics
National Taiwan University Hospital

Abstract

DNA screening for α -L-iduronidase (IDUA) gene mutation was performed in a Chinese patient with Hurler syndrome (MPS IH). The exon-containing genomic DNA segments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and subjected to agarose gel electrophoresis and single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. Aberrant PCR products or SSCP bands were cloned and sequenced to study the molecular lesions. The patient has 1447del27 (Ser₄₅₃→Arg in addition to in frame deletion of codons 454-462) in one allele and 1474ins15 (in frame insertion of 5 unrelated amino acids at codon 463) in the other allele. Expression of recombinant IDUA cDNA containing 1447del27 or 1474ins15 mutation showed traced amounts of α -L-iduronidase activity compared to that of normal cDNA upon transfection into COS-7 cells. By northern blot analysis, 24% 1447del27 mRNA and 49% 1474ins15 mRNA were detected. Both 1447del27 and 1474ins15 mutations affect either synthesis or stability of IDUA protein by western blot analysis. The data suggest that the 1447del27 and 1474ins15 mutations result in the severe Hurler phenotype of the patient.

Keywords: Hurler syndrome, α -L-iduronidase, gene mutation