文章编号:1000-5404(2006)24-2465-04

论著

二重二次PCR对外显子缺失型DMD患者单淋巴细胞遗传学诊断的研究

颜军昊,陈子江,秦莹莹 (山东大学山东省立医院生殖中心,济南 250021)

提 要: 目的 对已知dystrophin基因50号外显子缺失的Duchenne型肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)患者及正常对照者进行单个淋巴细胞遗传学诊断,建立该病单细胞植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)方法,为携带者夫妇进行植入前遗传学诊断以提供细胞学基础。**方法** 在解剖显微镜下获取已经确诊为dystrophin基因50号外显子缺失型DMD患者和正常对照者的单个淋巴细胞,采用dystrophin基因50号外显子引物/SRY基因引物二重二次PCR的方法进行遗传学诊断。**结果** 男性患者单个淋巴细胞中SRY基因阳性同时50号外显子阴性的比例为92%;正常男性对照中SRY基因和50号外显子均阳性的比例为91%;正常女性对照中50号外显子阳性和SRY基因阴性的比例为93%。**结论** 通过二重二次PCR能够进行dystrophin基因50号外显子缺失型DMD患者和正常对照的单个淋巴细胞遗传学诊断,为PGD技术在该病遗传学诊断中的应用打下基础。

关键词: 肌营养不良;单个淋巴细胞;遗传学诊断;二重二次PCR
中图法分类号: R446.6;R596.1;R746.204 **文献标识码:** A

Cytogenetic diagnosis on single lymphocyte of DMD patient with exon 50 deletion by two-time duplex PCR

YAN Jun-hao, CHEN Zi-jiang, QIN Ying-ying (Center for Human Reproduction, Shandong Provincial Hospital Shandong University, Jinan 250021, China)

Abstract: Objective To perform the cytogenetic diagnosis on single lymphocyte of DMD patient with dystrophin gene exon 50 deletion. **Methods** Single lymphocytes of a DMD patient with dystrophin gene exon 50 deletion and normal volunteers were picked out and prepared for two-time duplex PCR. **Results** The rate of precise positive was 92%, 91% and 93% in specimens of the patient (SRY positive, exon 50 negative), the male volunteer (SRY positive, exon 50 positive) and the female volunteer (SRY negative, exon 50 positive), respectively. **Conclusion** Two-time duplex PCR is fit for the genetic diagnosis of single lymphocyte from DMD patient with dystrophin gene exon 50 deletion.

Key words: Duchenne muscular dystrophy; single lymphocyte; genetic diagnosis; two-time duplex PCR

Duchenne型肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是一种严重的致死性X连锁隐性遗传病,是由于骨骼肌中抗肌萎缩蛋白(dystrophin,dys)缺如或功能障碍所致。发病率为1/3 500活产男婴[1],突出表现为骨骼肌进行性萎缩乏力,出生时正常,5岁左右开始发病,20岁左右因呼吸衰竭等严重并发症而死亡。鉴于本病没有有效的治疗方法,因此高效、准确的DMD致病基因诊断、携带者检测、产前诊断及正确的遗传咨询是预防本病的关键。近年来以单个细胞遗传学诊断为基础的植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)技术越来越受到重视。本研究采用单个淋巴细胞二重二次PCR方法对已经确诊为dystrophin基因50号外显子缺失的DMD患者及正常男性对照患者进行单个淋巴细胞遗传学诊断,确定单个淋巴细胞的基因型,从而为植入前遗传学诊断打下基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

患者来源于本中心遗传咨询门诊就诊者,男性,15岁。5岁时开始走路不稳,常跌倒,现不能独立行走,北京协和医院肌

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470703);山东省"提高新生儿出生质量综合技术研究"基金资助项目(SDSP2004-0720-07)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470703) and the Funds for Technical Research on Neonatal Birth Quality by Shandong Province (SDSP2004-0720-07)

作者简介: 颜军昊(1977-),男,山东省威海市人,博士,助教,主要从事生殖遗传学和生殖生物学方面的研究,发表论文19篇。电话:(0531)85187850,E-mail: yyy306@126.com
通讯作者: 陈子江,电话:(0531)87039341,E-mail:chenzijiang@hotmail.com

收稿日期: 2005-12-28;**修回日期:** 2006-04-21

肉活检确诊为"进行性肌营养不良(DMD)"。其父母获生育二胎许可,希望能生育健康婴儿,遂来我中心就诊。我们采用文献[2,3]报道的针对缺失热点的19对引物,对患者DNA进行基因诊断,确诊为dystrophin基因50号外显子缺失,遂提取患者外周血淋巴细胞和正常男性、女性对照的淋巴细胞进行单个淋巴细胞诊断实验。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取步骤 取患者EDTA抗凝外周血5 ml,采用上海申能博彩生物科技有限公司提供的Genomic DNA Purification Kit提取基因组DNA。

1.2.2 外周血淋巴细胞的分离 ①取3 ml血+3 ml生理盐水+3 ml淋巴细胞分离液,将淋巴细胞分离液置于离心管底部,血和生理盐水小心放置于分离液上,离心2 000 r/min,25 min。②离心后液体分3层,抽取中间层雾状液体,转移至另一个离心管中。加等量的生理盐水,混匀离心2 500 r/min,20 min。③去除上清,沉淀中加10 ml生理盐水再离心2 500 r/min,20 min,反复3次或3次以上。④反复离心后留沉淀,加2 ml生理盐水充分混匀。即为获得的淋巴细胞。

1.2.3 单个淋巴细胞的制备 ①提取的淋巴细胞用PBS稀释至在20倍解剖显微镜下可以分离的浓度。②用自制的毛细玻璃吸管分离吸取单个淋巴细胞转移至含有5 μl碱性裂解液[4](200 mmol/L KOH ,50 mmol/ L DTT)的200 μl薄壁离心管中。③将薄壁离心管置于65 ℃水浴锅中水浴10 min。④加5 μl中和液(900 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 300 mmol/L KCl, 200 mmol/L HCl)中和。置于-20 ℃保存备用。

1.3 PCR反应

1.3.1 DNA外显子缺失筛选PCR反应体系 TaKaRa *Taq*™ Hot Start Version购自宝生物工程(大连)有限公司。PCR仪为ABI 9700。应用常规PCR对患者DNA进行扩增。反应体系:10×PCR buffer 2 μl,dNTP(各2.5 mmol/ L)1.6 μl,TaKaRa Hot Start *Taq*酶0.5 U,引物(5 μmol/ L)2.0 μl,DNA(10 ng/μl) 2 μl,最终反应总体积为20 μl。反应条件为:采用梯度PCR,预变性95 ℃ 10 min,变性94 ℃ 30 s,退火65 ℃ 30 s,延伸72 ℃ 90 s,共5个循环;变性94 ℃ 30 s,退火60 ℃ 30 s,延伸72 ℃ 90 s,共15个循环;变性94 ℃ 30 s,退火58 ℃ 30 s,延伸72 ℃ 90 s,共15个循环,最后72 ℃ 10 min终止反应。

1.3.2 单个淋巴细胞PCR反应体系 引物序列:50号外显子:5′-CACCAAATGGATTAAGATGTTCATGAAT-3′,5′-TCTCTCTCACCCAGTCATCACTTCATAG-3′;SRY基因:5′-GTTGTCCAGTTGCACTTCGCTGCA-3′, 5′-CAGTGTGAAACGGGAGAAAACAGT-3′。

一次二重PCR体系:10×PCR buffer 2 μl,dNTP(各2.5 mmol/L)1.6 μl,TakaRa Hot Start *Taq*酶2 U,引物(SRY基因和dystrophin50号外显子)(5 μmol/L)分别为1.0 μl和2.0 μl,单个淋巴细胞液10 μl,最终反应总体积为20 μl。

二次二重PCR体系:10×PCR buffer 2 μl,dNTP(各2.5 mmol/L)1.6 μl,TakaRa Hot Start *Taq*酶1 U,Primer(SRY基因和dystrophin50号外显子)(5 μmol/L)分别为1.0 μl和2.0 μl,一次PCR产物DNA 3 μl,最终反应总体积为20 μl。

反应条件为:一次二次均采用梯度PCR,预变性95 ℃ 10 min,变性94 ℃ 30 s,退火65 ℃ 30 s,延伸72 ℃ 90 s,共5个循环;变性94 ℃ 30 s,退火60 ℃ 30 s,延伸72 ℃ 90 s,共15个循环;变性94 ℃ 30 s,退火58 ℃ 30 s,延伸72 ℃ 90 s,共15个循环,最后72℃ 10 min终止反应。

1.3.3 电泳 取PCR扩增反应产物15 μl,2%琼脂糖凝胶电泳,50 V 90 min,紫外光下显示是否出现目的条带并用AlphaImager™ 2200图像仪分析。

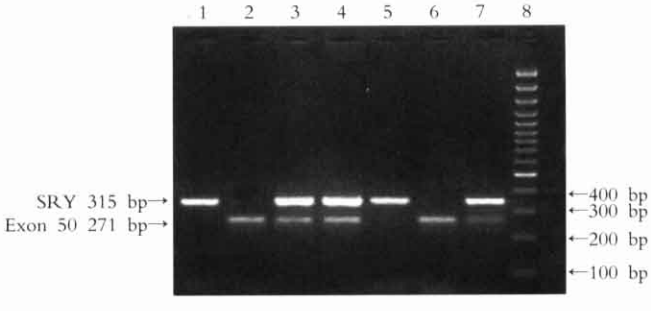
2 结果

我们应用19对dystrophin基因外显子PCR引物对患者进行缺失检测,显示患者的50号外显子出现缺失,其余外显子的扩增产物均出现阳性条带,未见缺失。阳性对照(正常男性和正常女性)的每对外显子也出现完整的扩增条带。

单个淋巴细胞扩增效率:运用单细胞二重二次PCR分别扩增了100个来自同一dystrophin基因50号外显子缺失患者的淋巴细胞和100个来自同一正常男性对照者的淋巴细胞以及100个来自同一正常女性对照者的淋巴细胞,同时设立10个阴性对照(PBS冲洗液)。患者单个淋巴细胞中SRY基因出现阳性条带同时50号外显子为阴性的比例为92%,SRY基因和50号外显子同时出现阳性条带(50号外显子假阳性)的比例为3%,二者均为阴性结果(SRY基因假阴性或者扩增失败)的比例为5%;正常男性对照中SRY基因和50号外显子同时出现阳性条带的比例为91%,出现SRY基因阳性条带而无50号外显子条带(50号外显子假阴性)结果比例为2%,出现50号外显子扩增条带而无SRY基因条带(SRY基因假阴性)结果比例为0,二者均为阴性结果(同时假阴性或者扩增失败)的比例为7%;正常女性对照中出现50号外显子扩增条带同时无SRY基因扩增条带的比例为93%,同时出现SRY基因和50号外显子扩增条带(SRY基因假阳性)的比例为3%,二者均为阴性结果(50号外显子假阴性或者扩增失败)的比例为4%。结果见表1和图1。

表1 患者和正常对照单个淋巴细胞二次二重PCR结果

标本来源	单个淋巴细胞数量	Exon 50(+) SRY(+)	Exon 50(+) SRY(-)	Exon 50(-) SRY(+)	Exon 50(-) SRY(-)
DMD患者	100	3%	0	92%	5%
正常男性	100	91%	0	2%	7%
正常女性	100	3%	93%	0	4%



1,5:患者单淋巴细胞二次二重PCR结果(只有SRY,无50号外显子片段);2,6:正常女性对照单淋巴细胞二次二重PCR结果(只有50号外显子片段);3,4,7:正常男性对照单淋巴细胞二次二重PCR结果(可见SRY和50号外显子片段);8:标准(100 bp)

图1 患者和正常对照单个淋巴细胞二次二重PCR结果

3　讨论

Duchenne 型肌营养不良症(DMD)是神经系统三大遗传病之一,其致病基因位于 Xp2.1,包含 79 个外显子和 78 个内含子,全长 2 500 kb,cDNA 为 14 kb,占整个 X 染色体长度的 1% 及整个基因组长度的 0.1%[5]。DMD 基因突变包括缺失、重复、点突变 3 种类型,其中缺失型占 60% 左右。研究表明 DMD 基因缺失主要分布于 2 个明显的热点区域,即 5′端和中央区[6]。前者累及外显子 1 ~ 11,占总缺失的 22% ~ 27%,后者累及外显子 44 ~ 53,占总缺失的 54% ~ 60%。依据这种缺失热点分布特点,Chamberlain 等[2]首先设计了 10 对引物,其检测的外显子为 4、8、12、17、19、44、45、48、51 和 46(46 号外显子是由 Beggs 补充),可检出 80% 的缺失患者;Beggs 等[3]增设了另外 9 对引物(针对 3、6、13、43、47、50、52、60、49 号外显子),这 19 对引物可检测出 98% 的缺失患者。

目前多进行产前诊断或者植入前遗传学诊断来避免 DMD 患儿的出生,为此需进行先证者基因诊断、胎儿性别判断、胎儿缺失基因筛查或基因连锁分析等步骤。常用的基因诊断方法包括[7]:对缺失型家系采用多重聚合酶链反应筛查先证者的基因变异类型,再通过分析单个卵裂球、绒毛、羊水或脐血等胎源性物质,确定胚胎或胎儿的基因型;对非缺失型家系,则对短串联重复序列(short tandem repeat, STR)的多态单体型进行连锁分析,大大提高了 DMD 的可诊断率和产前诊断的准确率[8]。对缺失型 DMD 家系进行产前基因诊断,首先需要明确胎儿的性别,如为男性胚胎则要进一步检测是否携带缺失型突变,以杜绝男性患儿的出生,这也是此类 DMD 家系进行种植前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)时所要解决的 2 个主要问题。单一性别诊断至今仍是国内临床 DMD 产前诊断的主要策略[9],但其仅判断风险胎儿性别,结果只有女胎被允许继续妊娠。显然,该法存在淘汰了部分正常男性胚胎、并可能导致女性携带者出生的缺陷。1999 年 Hussey 等[10]在单细胞水平,通过传统二重 PCR 的方法,对缺失型 DMD 进行病因诊断并应用于 PGD。利用单个淋巴细胞和单个胚胎卵裂球,检测 DMD 基因缺失热点区(外显子 17、19、44、45、48),并利用性别决定基因(SRY 基因)进行性别鉴定,提供正常基因型的男性及女性胚胎进行移植,从而在植入前水平阻断了致病基因的传递。2001 年 Ray 等[4]对 305 个 DMD/BMD 缺失外显子进行统计,缺失最常见的为 8、19、45、47 和 51 号外显子,占 71%,并根据这些外显子及性别鉴定基因设计了七重巢式 PCR,对 100 个单淋巴细胞(男性及女性各 50 个)进行扩增,总的扩增率达到 98%。该法因具有高效率,能检出大部分患者而有望用于临床 PGD。

目前国内还没有对 DMD 患者进行植入前遗传学诊断成功的报道。对于本病的植入前遗传学诊断的研究一直是科研机构关心的热点之一。本研究应用 Chamberlain 和 Beggs 2 套 PCR 反应体系,对患者 DNA 进行了 19 对引物的常规 PCR 筛选分析,结果显示其为 50 号外显子缺失型家系。遂提取其外周血淋巴细胞与正常对照共同进行单个淋巴细胞扩增实验,以寻找一个简便、快速、准确的方法进行单细胞遗传学诊断,为 PGD 的临床应用提供实验基础。

目前采用的对单个细胞遗传学诊断的方法主要采用巢式 PCR 方法,我们采用的单细胞二重二次 PCR 方法拥有与巢式 PCR 类似的理论基础,同时避免了引物种类过多出现混淆的情况,而且出现了较满意的实验结果。在实验结果中存在假阳性和假阴性以及扩增失败的情况,与以往报道的比例类似。在预实验重出现 SRY 基因偏性扩增的情况,因此在单个细胞实验时候我们采用了将 SRY 基因引物量减半,50 号外显子引物量不变的措施没有再出现这种情况。

对于单个细胞 PCR 扩增普遍存在扩增效率和假阳型和假阴性的问题,本研究中的扩增效率在 90% 左右,说明在碱性裂解液的裂解效率上还有可以提高的余地。假阳性的存在说明污染仍然存在,尽管本实验在严格无菌条件下进行,并对器械和反应管等进行了严格的消毒,操作在无菌超净台中进行,并佩戴无菌手套,仍然有少量污染的存在,这在实际操作中应该是尽量避免的。假阴性的结果可能导致对正常非缺失标本的误诊,在植入前遗传学诊断过程中会选择性去除了正常的胚胎。上述的种种问题都是在临床诊断中应尽量避免的。

参考文献:

[1] MOSTACCIULO M L, LOMBARDI A, CAMBISSA V, *et al*. Population data on benign and severe forms of x-linked muscular dystrophy [J]. Hum Genet, 1987, 75(3): 217 - 220.

[2] CHAMBERLAIN J S, GIBBS R A, RANIER J E, *et al*. Multiplex PCR for the diagnosis of Ducheme muscular dystrophy [M]// INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, *et al*. PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications. London: Academic Press, 1990: 272 - 281.

[3] BEGGS A H, KOENIG M, BOYCE F M, *et al*. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction [J]. Hum Genet, 1990, 86(1): 45 - 48.

[4] RAY P F, VEKEMANS M, MUNNICH A. Single cell multiplex PCR amplification of five dystrophin gene exons combined with gender determination [J]. Mol Hum Reprod, 2001, 7(5): 489 - 494.

[5] LEE S H, KWAK I P, CHA K E, *et al*. Preimplantation diagnosis of

non-deletion Duchenne muscular dystrophy (DMD) by linkage polymerase chain reaction analysis [J]. Mol Hum Reprod, 1998, 4 (4): 345 - 349.

[6] 杜文津. DMD基因突变检测技术的回顾与展望[J]. 国外医学:遗传学分册, 2001, 24(6): 326 - 331.

[7] 吴有光, 匡渤海, 冯 微, 等. DMD的产前基因诊断小结[J]. 江西医学院学报, 2002, 42(2): 106 - 107.

[8] 钟昌高,李麓芸,卢光琇. 应用连锁分析对杜氏/贝氏肌营养不良症家系进行快速携带者检测和产前基因诊断[J]. 湖南医科大学学报, 2002, 27 (6): 573 - 574.

[9] 胡冬贵,黄艳仪,黎 青,等. DMD基因和SRY基因单细胞三重及四重套式PCR技术的建立及其可靠性研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 1999, 7(5): 13 - 16.

[10] HUSSEY N D, DONGGUI H, FROILAND D A, *et al*. Analysis of five Duchenne muscular dystrophy exons and gender determination using conventional duplex polymerase chain reaction on single cells [J]. Mol Hum Reprod, 1999, 5(11): 1089 - 1094.

(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2006)24-2468-01

不同细胞生长因子组合对培养的内皮祖细胞集落形成及黏附能力的影响

季亢挺[1],张怀勤[2],杨鹏麟[1],李海鹰[2],杨德业[2] (温州医学院:[1]附属第二医院心血管内科,[2]附属第一医院心血管内科,温州 325000)

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是出生后机体中存在的能特异性归巢于缺血损伤部位进一步分化为血管内皮细胞的一群前体细胞。大量的研究显示,EPCs可促进血管新生[1],修复损伤内膜并可用于制备组织工程血管[2],在冠心病的防治上有巨大的潜力。EPCs进一步临床应用的前提是培养出足量、功能良好的细胞。本实验观察不同细胞生长因子组合对内皮祖细胞培养中集落形成能力、黏附能力及收获细胞数量的影响,以筛选一个高效而经济的培养体系。

1 材料与方法

1.1 人脐血EPCs培养及分组

参照文献[3]的方法,取脐血50 ml,以密度梯度离心法分离脐血单个核细胞,以$5\times10^6/cm^2$密度接种于包被有纤维连接蛋白的24孔培养皿中,每皿加入1 ml包含有20%胎牛血清、青霉素(100 U/ml)及链霉素(100 U/ml)的M199培养液,将各孔细胞按随机数字表分为对照组(未加细胞因子)、V组(加VEGF 10 ng/ml)、VE组(加入VEGF 10 ng/ml及ECGS 150 μg/ml),每组6孔,置37 ℃、5% CO_2饱和湿度培养箱中培养。3 d后,洗去未贴壁细胞,添加培养液继续培养待用。

1.2 EPCs鉴定[2,3]

贴壁细胞以0.25%胰酶消化后,制成1×10^6/ml的单个细胞悬液,加入荧光标记的CD_{34}、VE-Cadherin、VEGFR-2或AC133 10 μl(1 mg/ml),流式细胞仪分析细胞CD_{34}、VE-Cadherin、VEGFR-2及AC133的表达。

1.3 细胞集落计数

单个核细胞培养第4天,倒置显微镜下可观察到典型细胞团,以大于50个细胞的细胞团为1个集落,在培养皿上下左右中5个方位各随机取1个视野(×40)计数集落数,取均值。

1.4 黏附能力测定[4]

各组细胞培养6 d后消化,行细胞计数后以相同细胞数接种,置37 ℃培养箱中培养30 min,洗去未贴壁细胞,选取10个视野(×200),倒置显微镜下计数黏附细胞。

1.5 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 10.0统计软件,进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 EPCs鉴定

培养3 d洗去不贴壁细胞及碎片后,在倒置显微镜下可见典型细胞集落:呈白色半透明,略高于培养平面,中间为大量的圆形细胞,外周为纺锤形细胞,呈向外扩散状(图1)。培养6 d后流式细胞仪分析示细胞表达CD_{34}、VE-Cadherin、VEGFR-2及AC133,其中CD_{34}、VE-Cadherin、VEGFR-2及AC133阳性细胞比例分别为(65.09±11.89)%、(44.69±9.74)%、(30.46±9.23)%与(19.68±0.81)%。

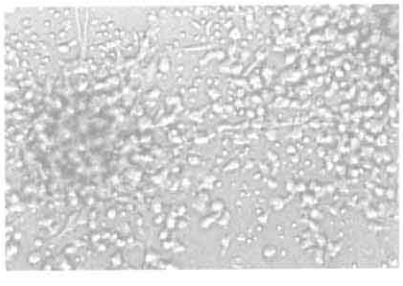


图1 VE组典型集落 (倒置显微镜×100)

2.2 不同细胞生长因子组合对EPCs功能的影响

2.2.1 不同细胞生长因子对EPCs集落形成能力的影响

与对照组相比,V组VEGF显著增加集落数,差异显著[分别为(11.53±1.72)、(5.87±0.55),$P<0.01$];VE组集落数(13.10±2.09)较V组略高,但无显著性差异($P>0.05$)。

(下转2471页)

基金项目:温州市科技基金资助项目(Y2005B031);浙江省自然科学基金资助项目(303648)
Supported by the Sci & Tech Fund of Wenzhou (Y2005B031) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (303648)

作者简介:季亢挺(1967-),男,浙江省青田县人,硕士,主治医师,主要从事冠心病防治研究方面的研究。电话:(0577)88892658

收稿日期:2005-11-15;修回日期:2006-05-20