论著

文章编号:1000-5404(2008)10-0976-04

产前基因检测杜氏肌营养不良

涂泽蓉[1],王 燕[2],梁志清[1],姚 宏[1],白 云[2],常 青[1] (第三军医大学:[1]西南医院妇产科,[2]基础医学部医学遗传学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 产前基因检测杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)家系胎儿。**方法** 利用性别决定基因SRY引物PCR和羊水细胞培养染色体核型分析确定3例DMD家系胎儿性别,采用mPCR技术对3个DMD家系成员外周血及胎儿羊水和脐静脉血进行DMD基因内18个外显子位点扩增,STR-PCR结合聚丙稀酰胺凝胶技术对DMD基因3′端及基因内的44、45、49、50内含子的(CA)n短串联重复序列引物进行扩增,进行家系连锁分析和产前基因诊断。**结果** 共检出4例胎儿,其中2例单胎和1例双胎之甲胎为男性,之乙胎为女性。3个DMD家系2个检出为非缺失型,1个为缺失型。4例胎儿均继承了与同代先证者相同的母源致病单体型,除1例双胎之女胎为风险基因携带者外,其余3例男胎均为DMD风险胎儿,3例患儿母亲均为杂合型。**结论** STR多态连锁分析不仅适用于常见缺失突变检测未发现缺失的DMD患者,同样适用于缺失型DMD患者的产前基因检测。

关键词: 肌营养不良症;产前基因检测;基因连锁分析

中图法分类号: R446.9;R714.55;R746.2 **文献标识码:** A

Prenatal gene diagnosis for Duchenne muscular dystrophy

TU Ze-rong[1], WANG Yan[2], LIANG Zhi-qing[1], YAO Hong[1], BAI Yun[2], CHANG Qing[1] ([1]Department of Gynaecology and Obstetrics, Southwest Hospital, [2]Department of Medical Genetics, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a basis for genetic counseling and prenatal gene diagnosis of Duchenne muscular dystrophy (DMD). **Methods** Three pregnant DMD carriers visited our department and their fetal gender was determined by sex determining gene primer polymerase chain reaction (PCR) and cell karyotyping of amniotic fluid. The genomic DNA was extracted from the peripheral blood of the family members with DMD and fetal amniotic fluid or fetal umbilical vein blood. Then multiplicitas prime PCR and polyacrylamide gel method were used to analyze the polymorphism of the (CA)n short tandem repeat (STR) in 3′ end and in the introns 44, 45, 49, 50 of DMD gene. **Results** In the 4 fetuses, two singleton fetus and one of the twins were male, the other of twins was female. Gene deletion occurred in one pedigree and non-gene deletion in the other two pedigrees. Four fetuses had the same haploid of proband inherited from their mothers. The female fetus of the twins was risk DMD gene carrier, and the other three male fetuses were DMD risk ones. The mothers of three probands were heterozygous. **Conclusion** STR polymorphism-based linkage analysis is suitable for DMD patients no matter who had not been found common deletion or not.

Key words: muscular dystrophy; prenatal diagnosis; gene linkage analysis

杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是由于肌营养不良蛋白(dystrophin)基因缺陷而致的一种X连锁隐性遗传病,其发病率约为活产男婴的1/3 500。近年研究报道,在DMD的致病基因肌营养蛋白基因的3′、5′端及基因内发现了多个(CA)n短串联重复序列(short tandem repeat, STR),其具有多态性,信息量高,杂合子频率达25%~93%。采用STR基因连锁分析,不仅适用于常见缺失突变检测未发现缺失的DMD患者,同样也适用于非缺失型DMD患者的基因诊断[1]。本实验主要采用18对外显子引物、5对内含子(CA) n STR引物和性别决定基因SRY(sex-determining-region on Y chromosome)引物,用PCR方法对3个DMD家系进行确定患者,识别携带者,判断正常及风险染色体的单体型,有效地进行了基因检测及产前基因检测,获得了满意的效果。

作者简介:涂泽蓉,女,重庆市人,硕士研究生,主治医师,主要从事遗传性疾病产前基因诊断方面的研究。电话:13896051420

通信作者:常 青,电话:(023)68765399,E-mail: CQLi99@yahoo.com.cn.

收稿日期:2007-11-23;修回日期:2008-01-11

1　对象与方法

1.1　对象

2007 年 4 -9 月本院神经内科门诊收治 3 个家系 3 例 6 ~ 12 岁 DMD 男性患儿,均有典型的临床症状(假性肌肥大、肌萎缩、Gower 征阳性),血清 CK 及同工酶 CK-MB 明显增高和肌原性肌电图改变,1 例患儿行肌肉活检证实有肌纤维变性,间质水肿。患儿及 6 名家系相关成员外周血标本由本院遗传咨询门诊提供,2 份胎儿脐血标本(家系 1 和家系 2)和 1 份胎儿羊水标本(家系 3)由本院妇产科产前诊断中心经羊膜腔穿刺术或脐静脉穿刺术获得。所获标本均按常规 DNA 提取试剂盒(天为时代公司提供)提取。3 个家系均各有 1 个 DMD 男性患儿,家系 1 现孕 30^{+6} 周,家系 2 现孕 25^{+5} 周,家系 3 已孕 25 周双胎,B 超提示双羊膜囊双胎,见图 1。3 个家系均要求产前基因诊断和遗传咨询而就诊。

1.2　方法

1.2.1　寡核苷酸引物　　18 对外显子引物序列参照文献[2,3],5 对 44CA、45CA、49CA、50CA 和 3′CA 内含子(CA)n 引物序列参照文献[1,4],均由上海生工公司合成。5 个(CA)n 引物 PCR 产物大小依次为 174 ~ 204、156 ~ 184、227 ~ 257、233 ~ 251 bp 和 119 ~ 137 bp。

1.2.2　mPCR　　18 对外显子引物分 4 组。mPCR 扩增体系为 25 μl,内含基因组 DNA 100 ng,10 × PCR 缓冲液 2.5 μl,终浓度 1.5 mmol/L $MgCl_2$,0.15 μmol/L 的每种引物,200 μmol/L dNTP 和 2 U *Taq* DNA 聚合酶(大连宝生物工程有限公司产品)。放入 PE 公司 PT-200PCR 仪中进行扩增,扩增条件为:97 ℃预变性 7 min, 94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min,35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪上观察结果。

1.2.3　STR-PCR　　5 对内含子(CA)n 引物扩增体系同1.2.2 mPCR,PE 公司 PT-200 PCR 仪进行扩增。扩增条件为:95 ℃预变性 7 min,然后 94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳证实有产物后,各取 10 μl,混合 2 μl 溴酚蓝和 2 μl SRY-B Green 荧光染料经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,在凝胶成像仪上观察结果并照相。

对 3 个家系进行基因检测及产前基因检测时,首先应用针对 SRY 基因引物进行 PCR(设有阳性对照和阴性对照),结合胎儿羊水细胞培养染色体核型分析确定胎儿性别,采用 18 对引物的 mPCR 对先症者和胎儿进行缺失型检测后,再以 44CA、45CA、49CA、50CA 和 3′ CA 5 位点对整个家系进行 STR 单体型连锁分析。

2　结果

2.1　SRY 基因及 DMD 基因缺失型检测结果

SRY 基因引物 PCR 结果提示 4 例胎儿中 3 例胎儿的 SRY 基因阳性(双胎占 1 例),双胎中另 1 胎 SRY 基因为阴性,均与胎儿染色体核型分析相符。对 3 个家系先症者和胎儿进行 18 对外显子引物 mPCR 基因缺失检测,发现家系 1 和家系 2 的先症者及胎儿均未检测出基因缺失,均为非缺失型 DMD 家系;家系 3 的先症者检测出 43 外显子缺失,但胎儿 43 外显子未检出有缺失,为缺失型 DMD 家系。

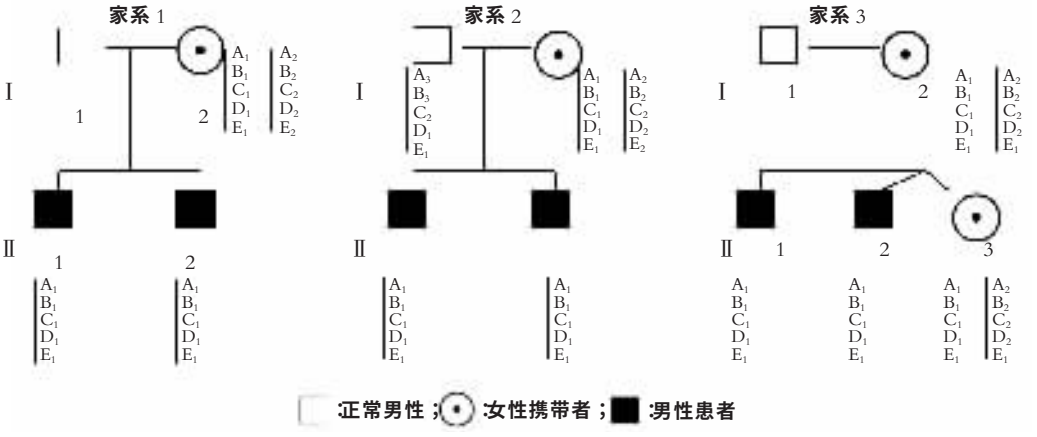
2.2　44CA、45CA、49CA、50CA 和 3′CA 5 位点 STR 单体型连锁分析结果

PCR 产物片段大小均与预期扩增基因片段长度相符。3 个家系均能提供有用的遗传连锁诊断信息,并完成了其产前基因检测。

2.2.1　家系 1 的 STR 多态性单体型连锁分析　　家系 1 的 5 位点 STR 单体型连锁分析表明,胎儿继承了与同代先证者单体型相同的母源的 X 染色体($A_1B_1C_1D_1E_1$),其母为携带者(图2,并参见图 1 中家系 1)。

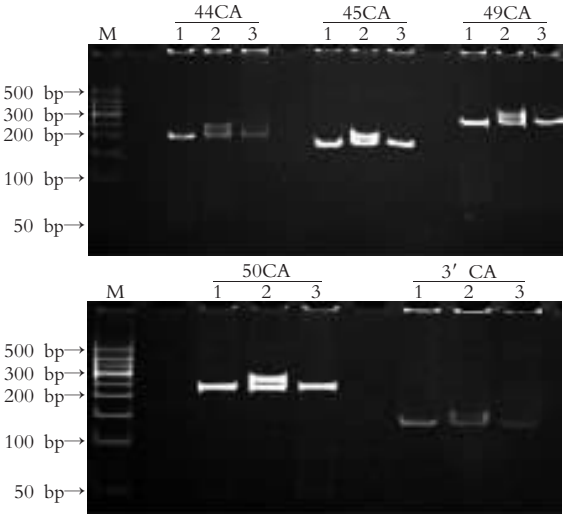
2.2.2　家系 2 的 STR 多态性单体型连锁分析　　家系 2 的 5 位点 STR 单体型连锁分析表明,胎儿继承了与同代先证者单体型相同的母源的 X 染色体($A_1B_1C_1D_1E_1$),其母为携带者(图3,并参见图 1 中家系 2)。

2.2.3　家系 3 的 STR 多态性单体型连锁分析　　家系 3 的 5 位点 STR 单体型连锁分析表明,男胎和女胎均继承了与患者单体型相同的母源的致病 X 染色体($A_1B_1C_1D_1E_1$)(图 4,并参见图 1 中家系 3),其母为携带者。



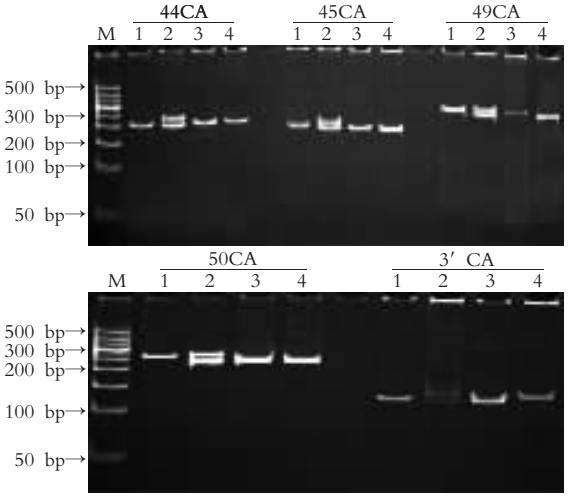
A: 44CA; B: 45CA; C: 49CA; D: 50CA; E: 3′CA

图 1　3 个家系的家系图及其 STR 多态连锁分析



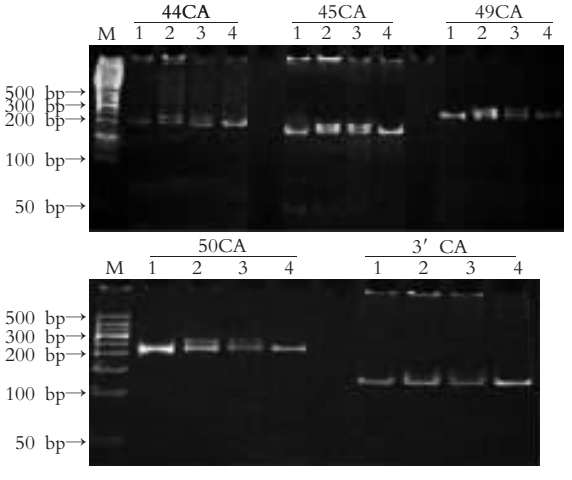
M: 标准; 1: Ⅱ1,先证者母亲; 2: Ⅰ2,同代先证者; 3: Ⅱ2,胎儿

图2 DMD 家系 1 的 STR 多态连锁分析



M:标准; 1: Ⅱ1,同代先证者; 2: Ⅰ1,先证者父亲; 3: Ⅱ2,胎儿; 4: Ⅰ2,先证者母亲

图3 DMD 家系 2 的 STR 多态连锁分析



M:标准; 1: Ⅱ1,同代先证者; 2: Ⅰ2,先证者母亲; 3: Ⅱ2,男胎; 4: Ⅱ3,女胎

图4 DMD 家系 3 的 STR 多态连锁分析

3 讨论

DMD 是一种 X 连锁隐性遗传的致死性神经肌肉性疾病,通常男性发病,女性多为杂合子携带者[5]。患者常于 3 ~5 岁发病,预后差,20 岁左右因呼吸衰竭/心力衰竭而死亡。Dystrophin 基因突变以缺失最常见,占 55% ~65%[6],重复占 5% ~10%;约 1/3 患者由新生突变引起,且可发生在不同的世代[7]。当前该病尚无有效的治疗方法,早期确诊患者,检出携带者,进行产前诊断和遗传咨询是防止患儿出生最重要的措施。

目前 DMD 基因检测方法很多,有毛细管电泳法、复合连接探针扩增(MLPA)变性梯度凝胶电泳法(DGGE)、变性高效液相色谱(DHPLC)、多重 PCR 和 STR 连锁分析等。毛细管电泳需特殊仪器,操作较繁琐。多层探针杂交技术(MAPH)是 White 等[8]设计用于检测缺失热区之外的稀发突变技术。Schouten 等[9]在 MAPH 技术的基础上作一改进,设计出 MLPA 技术用于检测缺失和重复突变,是目前检测缺失和重复突变的新方法[10]和最有应用前景的技术[11],尤其对受累者致病性突变未知的女性携带者基因突变的筛查更为重要,其操作简便、高效,DNA 用量少,但技术条件要求高,所需成本大。DHPLC[12]是一种新的基因点突变检测技术,点突变检出率可达 75%,具有高效、经济、自动化程度高的特点,需特殊设备和操作技术,所需费用高。STR-PCR 扩增产物在聚丙烯酰胺凝胶上电泳后,可分离出相差 1 ~2 bp 的扩增片段,分辨力很高,操作较繁琐,结果分析有主观性,但成本低,常规设备,只需 1 ~2 d 就能提供 DMD 家系有价值的遗传连锁信息,适合临床基因检测的要求。本研究中结合多重 PCR 方法快速明确了 DMD 家系成员身份,因此可作为临床上一种有效的 DMD 基因检测技术。

按基因缺陷的不同,DMD 可分为缺失型和非缺失型两大类。采用多重 PCR 方法可快速检测出 98% 以上的缺失型患者[5],是目前用于缺失型 DMD 检测最简便最有效的方法之一。但是,该法不能确定女性携带者的身份和对非缺失型 DMD 患者进行基因检测。目前 STR 连锁分析已是检测非缺失型 DMD 家系的首选技术之一,其信息量高,准确性强。吴有光等曾报道 DMD 基因内部 44、45、49、50 内含子的 STR 位点的多态信息量(PIC)分别为 0.864、0.892、0.907 和 0.713,这 4 个位点杂合率高,信息量大,完全适用于我国

DMD 患者 STR 家系单体连锁分析。钟昌高等[1]认为 STR 多态连锁分析适用于常见缺失突变检测未发现缺失的杜氏/贝氏肌营养不良(DMD/BMD)患者,是一种快速、有效、准确、易于普及的基因诊断方法。

本研究对该方法稍做改进,采用 18 对外显子引物进行 mPCR,确定了 2 个非缺失型 DMD 家系和 1 个缺失型 DMD 家系,为进一步明确胎儿基因状况,选用 3′CA、44CA、45CA、49CA、50CA 5 个 STR 多态位点进行家系连锁分析。结果,3 个 DMD 家系均检测到有价值的遗传连锁诊断信息,完成了产前基因检测。家系 1 及家系 2 先证者母亲的 STR 5 个位点均为杂合子,家系 3 患者母亲的 STR 4 个位点为杂合子,1 个 STR 位点为纯合子,3 个家系胎儿均继承了与先证者单体型相同的母源致病 X 染色体,严格遵循了孟德儿遗传规律。

家系 1 和家系 2 的连锁分析表明,先证者Ⅱ1 与致病基因连锁的 X 染色体单体型均为 $A_1B_1C_1D_1E_1$,其母均为风险染色体携带者($A_1B_1C_1D_1E_1/A_2B_2C_2D_2E_2$),2 位男胎均继承了单体型为 $A_1B_1C_1D_1E_1$ 的致病 X 染色体,诊断为 DMD 风险胎儿。家系 3 的连锁分析表明,患者Ⅱ1 与致病基因连锁的 X 染色体单体型为:$A_1B_1C_1D_1E_1$,男胎Ⅱ2 及女胎Ⅱ3 也均继承了与患者单体型相同的母源致病 X 染色体($A_1B_1C_1D_1E_1$),其母为风险染色体携带者($A_1B_1C_1D_1E_1/A_2B_2C_2D_2E_1$),男胎Ⅱ2 为 D-MD 风险胎儿(X 染色体单体型:$A_1B_1C_1D_1E_1$),女胎Ⅱ3 为 DMD 风险染色体携带者,有与其母相同的 X 染色体单体型($A_1B_1C_1D_1E_1/A_2B_2C_2D_2E_1$)。3 个 DMD 家系的连锁分析表明,4 例胎儿均受累,产前基因诊断为风险胎儿,建议引产终止妊娠,但孕妇拒绝引产,在院外足月分娩,新生儿外观均无异常,现仍在随访中。

本研究结果表明,无论 mPCR 能否检测出 DMD 基因常见外显子缺失突变,采用这 5 位点 STR 单体型连锁分析,均可对 DMD 家系进行产前基因检测。当然,STR 单体型连锁分析是有一定的概率性,如果能多增加 STR 的检测位点,将会明显提高遗传信息含量和可诊断率。在检测过程中,本研究将实验方法稍作改进,不用银染,以荧光染料和 PCR 产物一同上样于聚丙烯酰胺凝胶上电泳成像,同样灵敏,并且不必检测基因突变类型就能对 DMD 家系进行基因检测和产前基因检测,并取得较好效果,检测过程简单、快速、可靠,易于向基层推广。

(致谢:感谢北京协和医科大学基础医学院医学遗传学教研室黄尚志教授和第三军医大学医学遗传学教研室章波老师的热情指导与大力协助!)

参考文献:

[1] 钟昌高, 张　瞻, 李麓芸, 等. 10 个 DMD/BMD 家系的基因诊断及其中 3 个家系的产前基因诊断分析[J]. 医学临床研究, 2006, 23(9): 1352 - 1355.

[2] Chamberlain J S, Gibbs R A, Ranier J E, *et al*. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus *via* multiplex DNA amplification[J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16(23): 11141 - 11156.

[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] 黄　文, 张　成, 谢有梅, 等. 应用多个微卫星 DNA 位点进行 Duchenne/Becker 肌营养不良症携带者的检测[J]. 中华医学遗传学杂志, 2004, 21(3): 224 - 228, 265.

[5] Sbiti A, El-Kerch F, Sefiani A. Analysis of dystrophin gene deletions by multiplex PCR in Moroccan patients[J]. J Biomed Biotechnol, 2002, 2(3): 158 - 160.

[6] Czaja K, Lakomy M, Sienkiewicz W, *et al*. Distribution of neurons containing leptin receptors in the hypothalamus of the pig[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 298(3): 333 - 337.

[7] 董　敏, 李继红, 王　峰, 等. DMD 散发型病例产前诊断对策[J]. 医学研究通讯, 2005, 34(4): 19 - 21.

[8] White S, Kalf M, Liu Q, *et al*. Comprehensive detection of genomic duplications and deletions in the DMD gene, by use of multiplex amplifiable probe hybridization[J]. Am J Hum Genet, 2002, 71(2): 365 - 374.

[9] Schouten J P, McElgunn C J, Waaijer R, *et al*. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(12): e57.

[10] Gatta V, Scarciolla O, Gaspare A R, *et al*. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA)[J]. Hum Genet, 2005, 117(1): 92 - 98.

[11] Sellner L N, Taylor G R. MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions[J]. Hum Mutat, 2004, 23(5): 413 - 419.

[12] Bennett R R, den-Dunnen J, O'Brien K F, *et al*. Detection of mutations in the dystrophin gene *via* automated DHPLC screening and direct sequencing[J]. BMC Genet, 2001, 2: 17.

(编辑　邓强庭)