维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)08-0942-05

基因缺失与 DMD 的关系研究及携带者筛查

曹俊娟,柳 青

(重庆医科大学附属第一医院临床研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:为了解国内 Duchenne 型肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy,DMD)患者基因缺失的分布特点;探讨 STR 位点多态性对 DMD 基因携带者的连锁分析。方法:根据 DMD 基因中外显子缺失的多发位点,在内标引物参照下,建立一个多重 PCR 体系对 40 例 DMD 患者进行多位点检测,同时用 4 个 STR 多态位点进行连锁分析。结果:40 例患者中有 32 例为基因缺失,缺失率为 80%。在本研究中,所选外显子 45、48、51 缺失率较高,分别占检出人数的 56%、56%、16%。通过 STR 多态位点连锁分析检测出 6 名 DMD 患者母亲均为携带者。结论:本实验所选外显子对确定中国地区 DMD 患者的基因突变位点具有重要的临床参考价值,应用 PCR—STR 技术进行连锁分析可对 DMD 携带者进行筛查。

【关键词】基因缺失;STR 多态性连锁分析;携带者检测

【中国图书分类法分类号】R746.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-15

The relative research between gene deletion with DMD and carrier screening

CAO Jun-juan, et al

(*Department of Clinical Research Center, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To understand the distributional characteristics of dystrophin gene deletion in Chinese population and to search the linkage analysis of STR polymorphisms for DMD gene carriers. *Methods*: Contrasted with internal standard primer, A multiple PCR system was established according to the multiple sites of DMD exon deletion. The multiple exon deletions were examined in 40 DMD patients; At the same time, 6 suspected carriers were detected using the linkage analysis of STR polymorphisms. *Results*: The thirty-tow of the 40 DMD patients were identified as having gene deletion, In this study, 56%, 56%, 16%DMD patients could be detected in exon 45、48、51 gene deletion, so the three pairs primers could be used as best combination for detecting the gene deletion; six female relatives were diagnosed as carriers of the genes. *Conclusion*: It is important clinical value of allocating gene mutation sites in Chinese population according to the choosen exons and It is an effective approach to applying the linkage analysis of STR polymorphisms to detect carrier.

【Key words】 Gene deletion; STR polymorphic linkage analysis; Carrier detection

Duchenne 型肌营养不良症是神经肌肉系统最常见的一种 X 连锁隐性遗传病,发病率占活产男婴的 1/3 500。DMD 基因较大且复杂,突变类型多样。但最多见的突变是基因内部的缺失,占 DMD 的 60%~70%。目前多采用多重 PCR 技术针对不同外显子的基因缺失进行检测。据国内外研究报道 dystrophin 基因缺失在不同民族有不同的分布特点[1-5]。近年来,在 DMD 基因 3',5'端及基因内非编译区发现了多个(CA)n 短串联重复序列(Short tandem repeat, STR)多态性。采用 STR 多态位点的单体型连锁分析,适用于部分缺失型及非缺失型 DMD 家系分析,为 DMD 基因携带者筛查提供了有效的检测途径。本文拟采用多重 PCR 技术,分析中国地区 DMD 患者的基因突变特点,同时用 STR 多态位点的单体型连锁分析进行携带者检测,对了解中国地区 DMD 患者及携带者基因缺失情况,揭示其基因突变与 DMD 的发生机制具有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

作者介绍:曹俊娟(1979-),女,硕士,研究方向:遗传性疾病的基因诊断。

通讯作者:柳 青,女,教授,E-mail:q6688@sina.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

①DMD 患者:均为来自本院神经内科门诊或住院的 40 例 DMD 男性患者。据其肌酶谱,肌电图和肌肉活检等均可确诊,两两之间无血缘关系。

②正常对照组:52 例男性均来自本院健康体检正常者。无 DMD 家族史,血清 CK 及 LDH 检查值在正常范围。

③可疑携带者:6 例,为上述部分 DMD 患者的母亲。

1.2 寡核苷酸引物及 DNA 标准

5 对检测缺失型 DMD 的引物序列(外显子 8、17、45、48、51 引物)参考文献[9]。Y 染色体性别决定基因 SRY 的引物序列如下:

F:5'-ACGGGAGAAAACAGTAAAGGCAA-3';R:5'-CTGCAATTCTTCGGCAGCATCTTC-3';扩增产物为 287bp。4 个 STR 多态位点(STR44、STR45、STR49、STR50)引物序列参考文献[7](具体见表 1)。

DNA marker:100bpDNA,pBR322DNA/*Hae* Ⅲ 和 pBR322DNA/*Msp* Ⅰ

1.3 方法

1.3.1 DNA 样品制备 取外周血 3~5ml EDTA 抗凝,用饱和盐析法提取外周血 DNA。

1.3.2 PCR 扩增 用多重 PCR 技术扩增 DMD 患者:外显子 8、17、45、48、51 引物扩增目的片段,SRY 引物扩增片段作内标对照。分为 A、B 两体系同时扩增,反应终体积为 25μl,其中 A 体系扩增 ex8、48、51、SRY;B 体系扩增 ex17、45、SRY。其扩增条件及参数为:50~100ng 基因组 DNA;脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)200μmol/L;上下游引物各 10pmol;10×缓冲液 2.5μl。先置于 96℃预变性 5min 后加入 1U Taq DNA 聚合酶及 12μl 石蜡油,再依次按 94℃ 45s,55℃60s,72℃ 60s,循环 35 周,最后在 72℃下延伸 5min。每次扩增均同时设空白和正常对照。缺失的外显子再以单一引物 PCR 扩增验证 1 次。

取 PCR 扩增产物 6μl 加 6×凝胶电泳加样缓冲液 2μl 混匀后,行 2%琼脂糖(含 0.5mg/ml EB)凝胶电泳,90V 电压下电泳 30min,在紫外光分析仪下摄影并保存分析。

用 PCR-STR 方法分析 DMD 基因携带者:dystrophin 基因内部 4 个 STR 位点引物扩增条件及参数如下:反应终体积为 30μl,含 50~100ng 基因组 DNA,13pmol 的每种引物,10×缓冲液 3μl,1.3μl $MgCl_2$(25mmol/L),0.5μl DMSO(二甲基亚砜),1μl BSA(小牛血清白蛋白 1%),2.4μl dNTP(2.5mmol/L)。先置于 94℃下 5min 后加入 1U Taq DNA 聚合酶及 15μl 石蜡油,再依次按 94℃ 30s,58℃ 30s,72℃ 60s,共 32 次循环,最后在 72℃下再延伸 7min。

取 5μl PCR 扩增产物加 1μl 6×载样缓冲液混匀后行 2%琼脂糖凝胶电泳,以检测扩增效果及估计产物产量。然后再取 10μl 产物与适量上样缓冲液混匀后用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。用 pBR322DNA/*Hae*Ⅲ和 pBR322DNA/*Msp* Ⅰ双 DNA 标准测定扩增产物的片段长度 bp 数,凝胶厚约 1mm,当二甲苯青 FF 泳动到 1/2 板长时停止。取出凝胶浸入含 0.5mg/ml EB 溶液中,15~30min 后取出水洗紫外仪下观察结果。

2 结 果

2.1 利用多重 PCR 技术对 DMD 患者的检测结果

用外显子 8、17、45、48、51 引物扩增 52 名健康对照者,其扩增效率达 100%,均出现目的片段,说明本实验中的引物特异性较高。

用外显子 8、17、45、48、51 引物扩增 40 名患者,发现 40 名无血缘关系的 DMD 患者中 32 例至少有 1 个外显子缺失,总缺失率为 80%。累及中央缺失热区的缺失 32 例,占检出病例的 100%。在本试验中,8、17 号外显子的缺失检出率为 0,即扩增均出现目的片段。45、48、51 号外显子各自的总缺失检出率分别为 45%、45%、12.5%,分别占 5 对引物检出人数的 56%、56%、16%。3 对引物组合即:45、48、51 号组合缺失检出率最高,检出人数占 5 对引物检出人数的 100%,2 对引物的最佳组合为 45、48

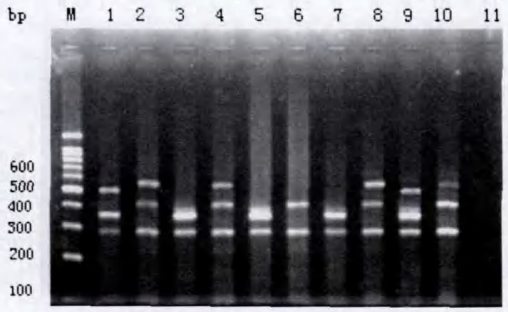
表 1 DMD 基因 5 对引物及 4 个 STR 多态位点引物序列

引物名称	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')
ex8	GGCCTCATTCTCATGTTCTAATTAG	GTCCTTTACACACTTTACCTGTTGAG
ex17	GACTTTCGATGTTGAGATTACTTTCCC	AAGCTTGAGATGCTCTCACCTTTTCC
ex45	AAACATGGAACATCCTTGTGGGGAC	CATTCCTATTAGATCTGTCGCCCTAC
ex48	TTGAATACATTGGTTAAATCCCAACATG	CCTGAATAAAGTCTTCCTTACCACAC
ex51	GAAATTGGCTCTTTAGCTTGTGTTTC	GGAGAGTAAAGTGATTGGTGGAAAATC
STR 44	TCCAACATTGGAAATCACATTTCAA	TCATCACAAATAGATGTTTCACAG
STR 45	GAGGCTATAATTCTTTAACTTTGGC	CTCTTTCCCTCTTTATTCATGTTAC
STR 49	CGTTTACCAGCTCAAAATCTCAAC	CATATGATACGATTCGTGTTTTGC
STR 50	AAGGTTCCTCCAGTAACAGATTTGG	TATGCTACATAGTATGTCCTCAGAC

维普资讯 http://www.cqvip.com

号,检出人数占 5 对引物检出人数的 90%。

PCR 产物的电泳图谱(ex8、17、45、48、51、SRY 引物的扩增片段依次为 360bp、416bp、547bp、506bp、388bp、287bp)(见图 1)。



M.PCR marker (100bp/梯度);1~2,3~4,5~6,7~8.4 位患者的 A、B 两体系扩增结果;9~10.正常对照者扩增结果;11.空白对照。

从图示可见:4 位患者依次缺失 51,48,45/48,48 号外显子。

注:1 无 388bp 片段带(缺乏 51 号外显子);
3 无 506bp 片段带(缺乏 48 号外显子);
5 无 506bp 片段带(缺乏 48 号外显子);
6 无 547bp 片段带(缺乏 45 号外显子);
7 无 506bp 片段带(缺乏 48 号外显子)。

图 1 利用多重 PCR 对缺失型患者检测结果的电泳图

2.2 用 STR 位点多态性连锁分析 DMD 基因携带者

应用 STR44、STR45、STR49、STR50 4 个 STR 多态位点对 6 个 DMD 患者(其中 5 个患者为缺失型,1 个患者为非缺失型)及其母亲进行了连锁分析。结果 6 位母亲均为 DMD 携带者。

2.2.1 图 2 所示患者为非缺失型 DMD 患者,患儿的 4 个 STR 位点组成的单体链来自其母的 1 条染色单体,故其母为 DMD 携带者。

2.2.2 图 3 为患者经多重 PCR 检测为外显子 48 缺失型突变,利用 STR 多态性连锁分析,我们发现患者也存在 STR49 的缺失,其母基因中有 1 条单体链与患儿单体型相同,故也为携带者。

3 讨 论

Duchenne 型肌营养不良症中以基因缺失为主要突变特征,以往的研究表明,通过多重 PCR 技术,Chamberlain 等[6]应用 9 对引物可检测出 80%的缺失患者;Beggs 等又增设 9 对引物,发现这 18 对引物可检测到 98%的缺失。而我们根据 dystrophin 基因的缺失热点及国内相关文献报道设计了两组多重 PCR。研究结果显示,本实验检测到 80%的缺失,主要累及中央热区,其中 45、48、51 号外显子检出率相当于检测全部外显子的检测结果,这恰好验证了国内外报道的 dystrophin 基因缺失分布在不同民族有不同的特点。因此我们认为本实验中所选外显子对中国地区 DMD 患者的基因突变位点检测有重要的临床参考价值,即在国内如果受条件限制,可以考虑用 5 对引物来替代 18 对引物检测或先行 5 对引物检测。对于条件较差的医院可以根据本研究

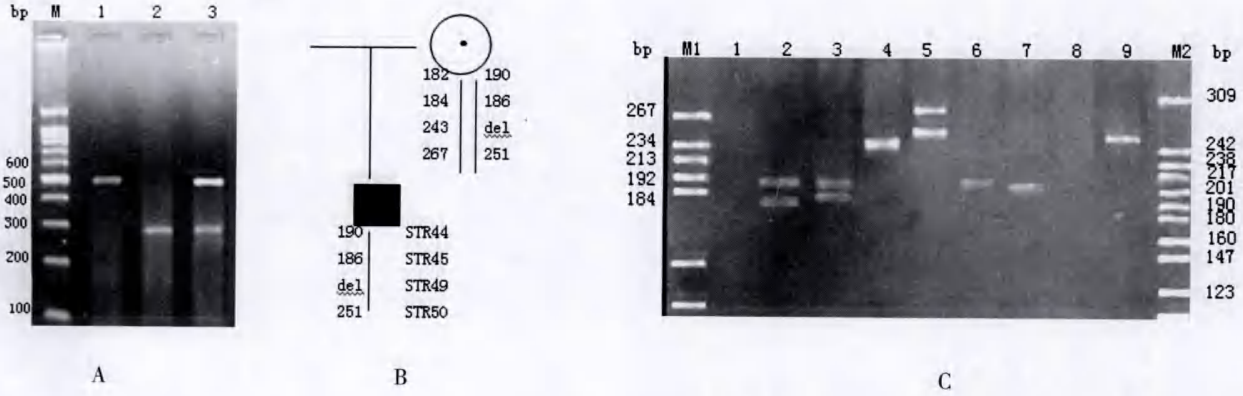


A B

A. 为母子的系谱;B. 为 PAGE 电泳图: M1. 分子量标准 pBR322DNA/*Hae*Ⅲ;M2. 分子量标准 pBR322DNA/*Msp* Ⅰ;1~4,5~8 分别为母亲,患儿的 STR44,STR45,STR49,STR50 的多态片段。

图 2 DMD 基因携带者 STR 位点多态性连锁分析

维普资讯 http://www.cqvip.com



A B C

A. 外显子 48 缺失的电泳图 M.DNA 标准;1.母亲 ex48 引物扩增片段;2.患儿仅 SRY,缺失 ex48 扩增产物;3.正常男性对照者;B. 母子的系谱图 del 表示缺失; C. PAGE 电泳图 M1.分子量标准 pBR322DNA/*Hae* Ⅲ;M2.分子量标准 pBR322DNA/*Msp* Ⅰ;1.空白对照;2~5,6~9 分别为母亲,患儿的 STR44,STR45,STR49,STR50的多态片段。

图 3 基因携带者的 STR 位点多态性连锁分析

统计的引物最佳组合,行 45、48、51 号外显子的三重PCR 扩增,可筛选出大部分的 DMD 患者,这对于全国范围内 DMD 的筛选,尤其是结合其他方法进行大范围的产前筛选时,不失为一种可取的选择。

在本实验研究中,我们针对 5 对引物分两组进行扩增,主要考虑到不同引物的熔解温度不同,引物间可相互作用,影响扩增率。如果优势扩增某对引物会导致误诊,所以需不断摸索平衡多对引物的量,使某对引物都获扩增,而且太多对引物无疑增加了人力、物力、财力,更重要的是有可能影响准确性。

4 个 STR 多态位点单体型连锁分析,因各位点多态信息量高,可较准确检出 DMD 携带者,但若基因缺失外显子 45 至外显子 49/50 片段时,携带者的一条染色体亦可能缺失 STR45 和 STR49 信息量最高的两个位点,且 PCR 扩增过程中可能产生滑动合成,这可能给结果分析带来一定困难。故在本文中 STR 的多态片段长度在 pBR322DNA/*Hae* Ⅲ 和 pBR322DNA/*Msp* Ⅰ 的双 DNA 标准下较易筛出,且重复试验有利精确定位,当然最终片段长度的确定应进行序列分析,DMD 家系的连锁分析一般不会受 bp 数小误差所影响,其携带者检出也较高。

Clemens 等[7]在 DMD 基因缺失高发区 44、45、49、50 号内含子中的(CA)n 重复序列上进行扩增并作 DMD 家系连锁分析,发现这些位点杂合率在 72%~93%;许顺斌等发现上述 4 种 STR 在中国人中的等位基因片段有 4~11 种,多态信息含量达 0.718~0.872。由于上述内含子中的(CA)n 均位于基因缺失突变高发区,尚可利用它们进行基因缺失型检测。如本文针对缺失型患者的家系携带者检测时就筛查出也存在 STR49 的缺失。

由于 STR-PCR 原理仍基于连锁分析,基因内重组可能导致误诊。为了降低假阳性和假阴性频率,可选择多个位于 DMD 基因不同部位的 STR 位点组成 DMD 基因多重 STR-PCR 单体型连锁分析技术,该技术可发现基因内存在的单交换或双交换事件,因此可提供更多遗传信息。Schwartz 等把多重 PCR 和荧光标记引入 DMD 基因 STR-PCR 分析中,利用荧光引物同时扩增分布于 DMD 基因全长的 4 个 STR 位点(STR5'、STR45、STR49、STR3')。达到了同时考查有无基因内重组的目的,另外带型荧光强度分析自动化,避免了常规分析中肉眼观察所造成的误差[8]。

还需要指出的是对于检测缺失型 DMD 家系中的携带者,常常出现种系镶嵌现象[9,10],即生有一个或一个以上患儿并有其他亲属患病的肯定携带者,经过缺失检测并不能诊断出携带者,除患者可能为新的突变外,我们认为不能排除种系镶嵌的可能。种系镶嵌是近年在携带者检出中较为常见的问题,Bakker 等[11]认为查不到相应缺失突变的母亲两次以上将 DMD 基因传给后代(儿子或女儿)的现象可能为种系镶嵌。这种情况为 DMD 的遗传咨询提出了一个重要的问题,即对生过 1 个 DMD 患儿,而携带者检出为阴性的女性,再生 DMD 患儿的风险有多少。Bakker 等[11]根据"新突变"DMD 家系基因分析结果估计为 14%。目前我国独生子女占大多数,因此在 DMD 的遗传咨询及基因携带者的诊断中,对只生过 1 个 DMD 患儿的母亲,排除携带者的可能

维普资讯 http://www.cqvip.com

要考虑到种系镶嵌的问题[12],最为谨慎的方法是进行产前诊断。

利用 PCR 扩增多态性等位基因,对筛查 DMD 家系携带者,检测基因缺失,降低基因内重组以及探讨种系镶嵌、新生突变等罕见遗传事件[13]均可起到意想不到的效果。因此,应用 PCR—STR 技术进行连锁分析已成为 DMD 家系检测携带者的首选技术。

本文采用的多重 PCR 技术,分析了中国地区 DMD 患者的基因突变特点,同时用 STR 多态位点的单体型连锁分析进行携带者检测,对了解中国地区 DMD 患者及携带者基因缺失情况,揭示其基因突变与 DMD 的发生机制具有重要的现实意义。

参 考 文 献

[1] Basak J,Dasgupta UB,Banerjee TK,et al. Analysis of dystrophin gene deletions by multi plex PCR in eastern India[J]. Neurol India,2006;54(3):310-311.

[2] Aziza S,Fatiha EK,Abdelaziz S,et al. Analysis of dystrophin gene deletions by multiplex PCR in moroccan patients[J]. JBB,2002;2(3):158-160.

[3] Mallikarjuna RG,Hussain T,Geetha DN,et al. Dystrophin gene deletions in South Indian Duchenne muscular dystrophy patients[J]. Indian J Med Sci,2003;57(1):1-6.

[4] Ivan FL,Kent KL,Tony MT,et al. A different spectrum of DM D gene mutations in local Chinese patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy[J]. Chinese Medical Journal,2006;119(13):1079-1087.

[5] Un KK,Jae JC,Sook HL,et al.Molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy by polymerase chain reaction and microsatellite analysis[J]. Molecules and Cells,2002;13(3):385-388.

[6] Chamberlain JS,Gibbs RA,Ranier JE,et al. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In PCR protocols a guide to methods and applications' Innis MA,Gelfand DH,Sninsky JJ,eds[M]. New York:Academic press,1990.272-281.

[7] Clemens PR,Fenwick RG,Chamherlein JS,et al. Carriers detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy famillies using dinucleotide repeat polymorphisms[J]. Am J Hum Genet,1991;49:951-960.

[8] 杜文津,万 琪. 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.

[9] Mukherjee M,Chaturvedi LS,Srivastava S,et al. De novo mutations in sporadic deletional Duchenne muscular dystrophy (DMD) cases[J]. Exp Mol Med,2003;35(2):113-117.

[10] Ferreiro V,Szijan I,Giliberto F,et al. Detection of germline mosaicism in two Duchenne muscular dystrophy families using polymorphic dinucleotide(CA) n repeat loci within the dystrophin gene[J]. Mol Diagn,2004;8(2):115-121.

[11] Bakker E,VeenemaH,Den DJ,et al. Germinal mosaicism increase the recurrence risk for "new"Duchenne muscular dystropy mutations[J]. Med Genet,1989;26(8):533.

[12] 刘咏梅,封志纯,方振伟.应用 PCR 技术检测假肥大型肌营养不良[J]. 第一军医大学学报,2002;22(8):731-733.

[13] Ferreiro V,Giliberto F,Francipane L,et al. The role of polymorphic short tandem(CA) n repeat loci segregation analysis in the detection of Duchenne muscular dystrophy carriers and prenatal diagnosis[J]. Mol Diagn,2005;9(2):67-80.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 941 页)

-frequencytissue ablation in the treatment of liver metastases[J].Radiology,1997;202(10):205-210.

[4] Bilchik AJ,Wood TF,Allegra D,et al. Cryosurgical ablation and radiofrequency ablation for unresectable hepatic malignant neoplasm: A proposed algorithm[J]. Arch Surg,2000;135(7):657-662.

[5] *Buscarini L,Buscarini E,Di Stasi M,et al. Percutaneous radiofrequency thermal ablation combined with transcatheter arterial embolization in the treatment of large hepatocellular carcinoma*[J]. Ultraschall Med,1999;20(2):47-53.

[6] 林世寅,冯 健. 热疗可杀灭肿瘤的原理及效力[J]. 世界医疗器械,2003;9(8):58-60.

[7] 赵华栋,包国强,马庆久,等.射频消融治疗兔肝脏肿瘤的实验研究[J]. 肝胆外科杂志,2006;14(4):301-303.

[8] 陈 翔,王洪林,李 坚,等.射频联合化疗药物治疗兔肝 VX_2 肿瘤模型的实验研究[J]. 重庆医科大学学报,2006;31(1):74-77.

[9] Pantazis P,Han ZY,Wyche J. Schedule-dependent efficiency of thermochemotherapy in Vitro with etoposide and heating at 43 degreese[J]. Anticancer Res,1999;19(7):995-998.

[10] Ohtsubo T,Saito H,Hoda I,et al. Effects of sequence and temperature of hyperthermia and peplomycin on human pharyngeal carcinoma KB cells in Uitro[J]. Neoplasma,1996;43(3):179-183.

[11] Kerr JFR,Winterford CM,Harmon BV.Apoptosis:its significance in cancer and cancer therapy[J]. Cancer,1994;73(8):2013-2026.

[12] *Chen WX,Jing LJ. Differentiation between apoptosis and necrosis*[J]. Zhonghua Xibao Shengwuxue Zazhi(Chin J Cell Biol),1998;20(2):58-63.

[13] Gramantieri L,Trere D,Chieco P,et al. In human hepatocellular carcinoma in cirrhosis proliferating cell nuclear antigen(PCNA)is involved in cell proliferation and cooperates with P21 in DNA repair [J]. J Hepatol,2003;39(6):997-1003.

[14] 范云霞,黄常志. 热休克蛋白 70 与肿瘤[J]. 国外医学·肿瘤学分册,2000;27(4):196.

[15] Murthy R,honavar S G,Naik M,et al. Thermochemothempy in hereditary retinoblastoma[J]. Br J Ophthalmol,2003;87(11):1432.

(责任编辑:关蕴良)