维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0297-04

21 号染色体 STR 多态与 Down's 综合征基因诊断的研究

景春梅[1],朱 静[2],邓 兵[2],张 伟[2],何俊琳[3],王应雄[3]

(1.重庆医科大学附属儿童医院临床检验中心,重庆 400014;2.重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所,重庆 400014;
3.重庆医科大学公共卫生学院遗传优生教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨应用短串联重复序列(Short tandem repeat,STR)进行 Down's 综合征诊断的可行性,同时对 Down's 综合征患儿双亲进行分析,找寻该病的遗传规律。方法:选择 21 号染色体上 D21S11 和 D21S1414 2 个 STR 基因座,应用聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction,PCR)、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(8%)、硝酸银染色技术分别对 100 例 Down's 综合征患儿及 20 例患儿父母的基因组进行分析。结果:(1)正常人在 1 个 STR 基因座上的基因型有 2 种情况:①2 个不同等位基因构成的杂合子,凝胶电泳上表现为粗细一样的 2 条带。②2 个相同等位基因构成的纯合子,凝胶上是 2 条相同等位基因条带的重叠,其宽度和浓度约为单个等位基因条带的 2 倍。(2)Down's 综合征患儿的等位基因数目和(或)条带浓度有 3 种特征性改变:①3 个不同的等位基因,电泳图上为浓度相同的 3 条带。②3 个等位基因中的 2 个相同,电泳图上为 2 条带,其中 1 条的浓度是另外 1 条的 2 倍。③3 个相同的等位基因,电泳图上为 1 条带,这条带的浓度和宽度约为正常对照条带的 3 倍。(3)20 例 Down's 综合征双亲分析显示,Down's 综合征患儿电泳条带包含了母亲的全部电泳条带,而与父亲的电泳条带只有部分相同。结论:(1)利用 21 号染色体 STR 位点作为遗传标记,采用 PCR 扩增技术结合变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及硝酸银染色技术,可用于诊断和筛查 Down's 综合征。(2)Down's 综合征患儿与双亲比对电泳结果表明,Down's 综合征发病与父母的核型无关,多余的 1 条 21 号染色体一般来自于母亲。

【关键词】Down's 综合征;短串联重复序列;基因诊断

【中国图书分类法分类号】R596.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-17

The STR polymorphism on chromosome 21 and the diagnosis of Down' syndrome

JING Chun-mei, et al

(*Department of Clinical Laboratories Center, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To probe the possibility of using STR polymorphism on chromosome 21 to diagnose Down's syndrome. At the same time, some parents of Down's syndrome were analysed using the same mothed. To develop a rapid and accurate method for Down's syndrome diagnosis and review its pattern. *Methods*: The small tandem repeats (STR) of D21S11 and D21S1414 on chromosome 21 were analysized by polymerase chain reaction (PCR). 100 Down's syndrome samples (blood) and 20 parents' samples (blood) were analyzed with. denaturing polyacrylamide gel (8%) and Silver Nitrate staining. *Results*: (1) The normal person and two kinds of status in the genotype of a STR gene: ① Two bands of same size on the gel electrophoresis were displayed to the heterozygote of two different alleles. ②A band on gel electrophoresis was shown to the homozygote of two same allele But the width and thickness of the band were about two times of a single one. (2)There were three kinds of characteristic changes of the number and/or the bands thickness of allele for the Down's Syndrome: ①Three different alleles, with three bands of same thickness on gel electrophoresis. ②Only two of the three alleles are the same, two bands on gel electrophoresis, and one of the two bands was two times thicker than the other. ③Three alleles were the same, only one band on gel electrophoresis. The width and thickness of the band are about three times than single band of normal. (3) The analysis about parents of 20 cases Down's syndrome shows that the two bands were usually derived from mother, and another derived from father in bands of the Down's syndrome on gel electrophoresis. *Conclusions*: (1)As genetic marker with STR sites (D21S11 and D21S1414) of chromosome 21, Down's syndrome can be diagnosed by PCR, denaturing polyacrylamide gel and Silver nitrate staining analysis. (2)Genetic analysis of the parents of Down's syndrome show that onset of Down's syndrome does not have relationship with the karyotype of the parents. Besides, the extra chromosome 21 is derived from mother usually.

【Key words】Down's syndrome; Short tandem repeat; Gene diagnose

作者介绍:景春梅(1979-),女,硕士,
研究方向:分子遗传。

通讯作者:朱 静,女,副主任技师,E-mail:zhujing310@yahoo.com.cn。

基金项目:重庆市卫生局科研资助项目(01-3-008)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Down's 综合征是一种最常见的染色体病,以先天性智力低下和多发性先天畸形为主要症状。患者核型主要为(47,XX/XY,+21),产生原因是卵子或精子发生时,减数分裂中 21 号染色体不分离,形成异常卵子或精子。流产次数对 Down's 综合征发生率没有明显影响,但却与妊娠妇女年龄增加有很大的关系[1]。同时妊娠次数越多,Down's 综合征发病风险也越高。因对 Down's 综合征患儿目前尚无有效的治疗措施,所以产前诊断以便及时终止妊娠仍然是学者们研究该疾病的热点。本研究采用 PCR 技术、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及硝酸银染色技术,以 Down's 综合征患儿及其双亲 21 号染色体上 D21S11/D21S1414 这两个 STR 多态性位点作为遗传标志进行分析,探索 Down's 综合征基因诊断的新途径,并由此阐明该病的遗传规律。现报道如下。

1 对象与方法

1.1 对象

2005 年 7 月至 2006 年 12 月在重庆医科大学附属儿童医院就诊,经 G 显带分析确诊的 100 例 Down's 综合征患儿,其中男 77 例、女 23 例。98 例为完全型 Down's 综合征,2 例为嵌合型 Down's 综合征。20 例 Down's 综合征患儿双亲的染色体经 G 显带分析确认核型均为 46,XY 和 46,XX,并将他们做为正常对照。

1.2 方法

1.2.1 全血 DNA 提取 用常规酚 - 氯仿法提取基因组 DNA。

1.2.2 PCR 扩增反应 所用引物为 2 对 21 号染色体上 2 个 STR 标记的引物 D21S11 和 D21S1414。反应体系总体积 48μl,含基因组 DNA 0.1μg,dNTP100μmol/L,引物 0.5μmol/L,DNA 聚合酶 2.0U,缓冲液 5μl,最后加灭菌蒸馏水使反应体积为 48μl。反应条件为:94℃预变性 4min,然后 93℃ 40s,58℃ 40s,72℃ 1min,进行 35 个循环,最后 72℃延伸 5min。所用引物如下:

D21S11 上游引物:5'-GTGAGTCAATTCCCCAAG-3';

D21S11 下游引物:5'-GTTGTATTAGTCAATGTTCTCC-3';

D21S1414 上游引物:5'-AAATTAGTGTCTGGCACCCAGTA-3';

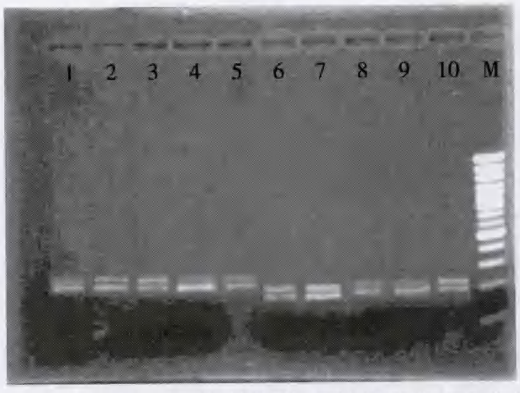
D21S1414 下游引物:5'-CAATTCCCCAAGTGAATTGCCTTC-3'。

1.2.3 PCR 产物分离 用 1.5%的琼脂糖溶液检测 PCR 扩增产物。用 8%变性聚丙烯酰胺,将待测样品与上样缓冲液按 1:4 充分变性后 40μl 上样,300V 预电泳 5min,在 25℃ 120V 条件下电泳分离 3~4h。

1.2.4 硝酸银染色及结果观察 10%甲醇与 10%冰乙酸混合溶液固定 20min,0.2%硝酸银染色 30min,2%冰乙酸终止反应 5min,照相保存。计数每例 Down's 综合征样本的等位基因数目,比较它们的浓度和宽度的差别,并与正常对照样本进行比较。

2 结 果

2.1 Down's 综合征患儿 DNA 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)



条带 1~5 为 D21S1414 扩增片段,扩增后的片段长度约为 255~285bp。条带 6~10 为 D21S11 扩增片段,扩增后的片段长度约为 175~263bp。M.100bp DNA Ladder Ⅰ。

图 1 Down's 综合征患儿 DNA 扩增产物的 1.5%琼脂糖凝胶电泳结果

由图 1 可见 2 个多态性位点均为 2 条带,且亮度较高,说明扩增出的目的片段含量高。

2.2 Down's 综合征患儿及正常对照的变性 PAGE 电泳及硝酸银染色结果(图 2)



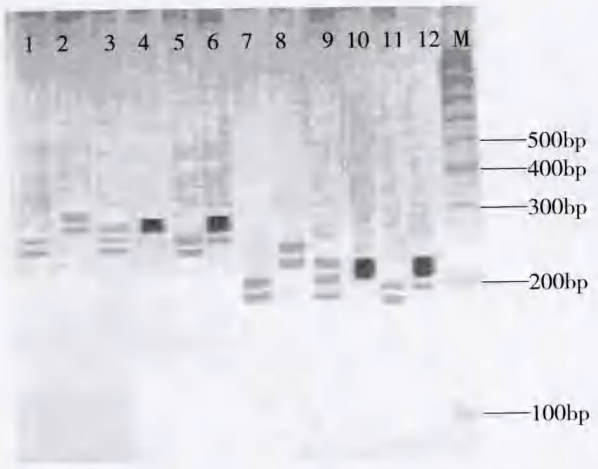
条带 1~7 为 D21S1414 的扩增片段,扩增后的片段长度约为 255~285bp。条带 8~14 为 D21S11 的扩增片段,扩增后的片段长度约为 175~263bp。M.100bp DNA Ladder Ⅰ。

图 2 Down's 综合征患儿及正常对照的变性 PAGE 电泳及银染结果

维普资讯 http://www.cqvip.com

正常人在 1 个 STR 基因座上的基因型有两种情况:一种是 2 个不同等位基因构成的杂合子,2 个等位基因的拷贝数是相同的,因此,凝胶电泳上表现为粗细一样的 2 条带(见图 2 的泳道 1 和 8 所示);另一种是 2 个相同等位基因构成的纯合子,凝胶电泳上是 2 条相同等位基因条带的重叠,其宽度和浓度约为单个等位基因带的 2 倍(见图 2 泳道 2 和 9 所示)。Down's 综合征患儿的等位基因数目和(或)条带浓度有 3 种特征性的改变。第 1 种:3 个不同的等位基因,电泳图上为浓度相同的 3 条带(见图 2 泳道 3 和 10;6 和 13 所示)。第 2 种:3 个等位基因中的 2 个相同,电泳图上为 2 条带,其中 1 条的浓度是另外 1 条的 2 倍(见图 2 泳道 4 和 11;7 和 14 所示)。第 3 种:3 个相同的等位基因,电泳图上为 1 条带,这条带的浓度和宽度约为正常对照条带的 3 倍(见图 2 泳道 5 和 12 所示)。

2.3 Down's 综合征患儿及双亲变性 PAGE 电泳及硝酸银染色结果(图 3)



条带 1~6 为两个家系的 D21S1414 的扩增片段:条带 1~3 依次为家系 1 的母、父、孩子;条带 4~6 依次为家系 2 的母、父、孩子。条带 7~12 为 D21S11 的扩增片段:条带 7~9 依次为家系 1 的母、父、孩子;条带 10~12 依次为家系 2 的母、父、孩子。M.100bp DNA Ladder Ⅰ。

图 3 Down's 综合征患儿及双亲的变性 PAGE 电泳及硝酸银染色结果

从图 3 的 1~3 条带和 7~9 条带可见,家系 1 的父母均为杂合子,凝胶电泳上表现为粗细一样的 2 条带,患儿的电泳条带为浓度相同的 3 条带(包含了母亲的 2 条带和父亲的 1 条带);从图 3 的 4~6 条带和 10~12 条带可见,家系 2 的母亲为纯合子,而父亲为杂合子,患儿的 1 条电泳带浓度为另外 1 条电泳带的 2 倍,其患儿电泳条带包含了母亲的全部条带(宽度和浓度约为单个等位基因带的 2 倍)和父亲的 2 条带(粗细一样的 2 条带中的其中 1 条)。

3 讨 论

临床上诊断 Down's 综合征主要采用染色体显带、血清学检查、超声检查和 FISH 等技术,但染色体显带技术所需时间较长,尤其在产前诊断中,羊水细胞不易培养,不适于大规模的产前普查;血清学及超声检查方法由于特异性不高,应用受到一定的限制;虽然 FISH 技术特异性高,但所需仪器和试剂成本昂贵,不利于推广。因此,各国学者都在研究快捷,简便的诊断方法。Yang 等[2,3]用实时定量 PCR 对 Down's 综合征进行产前基因诊断,也有国外学者报道了多种采用荧光标记定量 PCR 方法检测 21 号染色体上的 STR 方法,快速诊断 Down's 综合征[4~9]。Down's 综合征患者 21 号染色体含量比正常人多 1/3,所以可以利用 21 号染色体上 STR 位点,间接观察染色体的数目。STR 广泛分布于真核生物基因组中,约占人基因组的 10%,其核心序列为 2~6bp。这类基因序列多位于基因非编码区以及染色体近端粒区,其高度多态性主要来源于串联重复序列的不同,呈孟德尔共显性方式遗传。其变异范围大,杂合性高,重组率低,扩增效率高,扩增条件要求相对低。STR 基因座在 1 个个体的不同组织的基因型中都具有同一性[10],由于 21 号染色体长臂上 D21S11 和 D21S1414 这 2 个多态性位点在人群中的异质性大,杂合度高(杂合度都为 0.93[11]),提示可以利用这 2 个位点诊断 Down's 综合征,因此,本研究利用这 2 个位点成功地扩增了 Down's 综合征的片段,且其检测特异性好。STR 序列(D21S11 和 D21S1414)在不同个体中的最小差距仅为 4 个碱基,为了提高分辨率,因此本研究采用 8.0%变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分析。100 例 Down's 综合征中,诊断出了全部(98 例)完全型 Down's 综合征,未能诊断出 2 例嵌合型 Down's 综合征,可能是由于此嵌合型的 21 三体细胞比例较低所致。因此,本研究方法能识别 Down's 综合征基因型,可以诊断全部完全型Down's 综合征(完全型占 Down's 综合征的 95%),同时,对三体比例较高的嵌合型 Down's 综合征(嵌合型

维普资讯 http://www.cqvip.com

占 Down's 综合征的 1%～2%）也有重要的诊断价值，但不适于三体比例较低的嵌合体诊断，也不能用于平衡易位携带者的诊断（易位型占 Down's 综合征的 3%～4%）。

将 Down's 综合征患儿 21 号染色体上的 STR 电泳条带与其父母的 STR 电泳条带进行对比，通过带型特征确定患儿 STR 的来源。20 例患儿的电泳条带均包含了母亲的全部电泳条带，而与父亲的电泳条带只有部分相同，就整个人群中 Down's 综合征而言，推测其多数情况是来源于母亲，与 Down's 综合征的发生与其母亲生殖细胞形成时 21 号染色体不分离有关。

由此可见，本研究所采用的实验方法能较好地对 D21S11 和 D21S1414 多态性进行分析，以确定 21 号染色体的数目，方法准确、快速（整个过程 24h 内完成）、简便和费用低廉。应当注意的是仅选用 1 个 STR 作为基因诊断标记，会有少数对象不能诊断，我们建议同时选择上述 2 个 STR 标记，以提高检测的灵敏度和准确性。它对部分嵌合型 Down's 综合征的诊断存在一定漏诊，也不能用于诊断平衡易位携带者，有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Clementi M,Bianca S,Tenconi R.Re: "parity and the risk of Down's syndrome"[J]. Am J Epidemiol,2004;160(6):610.

[2] Yang YH,Nam MS,Yang ES. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 by real-time quantitative polymerase chain reaction with amplification of small tandem repeats and S100B in chromosome 21 [J]. Yonsei Med J,2005;46(2):193-197.

[3] Quaife R,Wong LF,Tan SY,et al. QF-PCR-based prenatal detection of aneuploidy in a southeast Asian population[J]. Prenat Diagn,2004;24(6):407-413.

[4] Von Eggeling F,Freytag M,Fahsold R,et al. Rapid detection of trisomy 21 by quantitative PCR[J]. Hum Genet,1993;91(6):567-570.

[5] Pertl B,Kopp S,Kroisel PM,et al. Quantitative flourescence polymerase chain reaction for the rapid prenatal detection of common aneuploidies and fetal sex[J]. Am J Obstet Gynecol,1997;177(4):899-906.

[6] Pertl B,Yau SC,Sherlock J,et al. Rapid molecular method for prenatal detection of Down's syndrome[J]. Lancet,1994;343(8907):1197-1198.

[7] Samura O,Sohda S,Johnson KL,et al. Diagnosis of trisomy 21 in fetal nucleated erythrocytes from maternal blood by use of short tandem repeat sequences[J]. Clin Chem,2001;47(9):1622-1626.

[8] Verma L,Macdonald F,Leedham P,et al. Rapid and simple prenatal DNA diagnosis of Down's syndrome[J]. Lancet,1998;352(9121):9-12.

[9] Yan J,Wu J,Li Y,et al. A novel diagnostic strategy for trisomy 21 using short tandem repeats[J]. Electrophoresis,2006;27(2):416-422.

[10] 俞冬熠，温 严，任慧颖.PCR-AFLP 技术产前诊断唐氏综合征[J]. 中国妇幼保健，2004;19(7):82-83.

[11] Sharma V,Litt M. Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus[J]. Hum Mol Genet,1992;1(1):67.

（责任编辑：关蕴良）

（上接第 276 页）

参 考 文 献

[1] Hu J,Wu H. Study on mobilization of angelica polysaccharides on peripheral blood hematopoietic stem cell in mice [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2006;37(12):1835-1838.

[2] Timeus F,Crescenzio N,Basso G,et al. Cell adhesion molecule expression in cord blood CD_{34}^{+} cells[J]. Stem Cells,1998;16(2):120-126.

[3] Stefan F,Marlon R,Alwin K,et al. Delineation of cell cycle state and correlation to adhesion molecule expression of human CD_{34}^{+} cells from steady-state bone marrow and peripheral blood mobilized following G-CSF-supported chemotherapy[J]. Stem Cells,1998;16(4):271-279.

[4] Vermeulen M,Le-Pesteur F,Gagnerault MC,et al. Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells[J]. Blood,1998;92(3):894-900.

[5] Chen T,Xue Y. Role of adhesion molecules in mobilization of hematopoietic cells[J]. Chinese Medical Journal,2003;116(2):273-277.

[6] Lee YH,Lee YA,Noh KT,et al. Homing-associated cell adhesion molecules and cell cycle status on the nucleated cells in the bone marrow,mobilized peripheral blood and cord blood[J]. J Korean Med Sci,2004;19(4):523-528.

[7] 吴 宏，姜 蓉，郑 敏，等. 人参多糖和当归多糖诱导人内皮细胞表达造血生长因子的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志，2002;22(9):687-690.

[8] 李 静，王亚平. 当归多糖对骨髓巨噬细胞的影响及其与造血调控的关系[J]. 中草药，2005;36(1):69-72.

[9] Link DC. Mechanisms on granulocyte colony-stimulating factor-induced hematopoietic progenitor-cell mobilization[J]. Semin Hematol,2000;37(1 Suppl 2):25-32.

（责任编辑：关蕴良）