

三种单基因遗传病的产前分子诊断

徐盈 张建芳* 郭芬芬 黎昱 燕凤 徐慧 任菊霞 宋婷婷

王德堂 辛晓燕 陈必良

(第四军医大学西京医院 妇产科, 陕西 西安 710032)

【摘要】 目的 探讨脊髓性肌萎缩症(SMA)、苯丙酮尿症(PKU)和先天性软骨发育不全(ACH)产前基因诊断的高效的临床检测方法。**方法** 根据不同单基因病的基因突变类型,本研究应用 DHPLC 技术对 1 例 SMA 阳性家族史的胎儿绒毛样本进行 SMN1 基因 7 号外显子缺失检测,选择正常人及 SMA 患者作对照。通过直接测序法分别对 PKU 家系和 ACH 家系的患者、表型正常的个体及其胎儿进行 PAH 致病基因和 FGFR3 基因第 10 外显子进行检测。**结果** SMA 阳性家系中,胎儿未检测到 SMN1 基因 7 号外显子的纯合缺失,建议继续妊娠,结果顺利产出 1 名正常儿。PKU 阳性家系通过检测发现患者在 PAH 基因上确实存在无义突变, c. 781C>T(p. Arg261Ter)和错义突变 c. 842C>T(p. Pro281Leu),均为杂合子。但是胎儿与患者母亲的突变类型一致,为携带者,不发病,建议继续妊娠。软骨发育不全患者送检标本 FGFR3 基因外显子 10 发现 1 处序列异常,为 c. 1138G>A,导致编码氨基酸改变 Gly380Arg,但其胎儿羊水标本检测 FGFR3 基因外显子 10 未发现序列异常。**结论** 根据单基因病不同的基因突变类型,选择合适的方法可快速、准确地实现单基因病产前基因的诊断,尽早避免单基因病患儿的出生。

【关键词】 单基因病;产前分子诊断;脊髓性肌萎缩症;苯丙酮尿症;先天性软骨发育不全

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To investigate methods for prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy (SMA), PKU and achondroplasia (ACH). **Method** Different test methods are applied based on different mutational pattern. The chorionic villus of 1 fetus with SMA positive family history was collected. The exon 7 of telomeric survival motor neuron (SMN1) gene was detected by DHPLC. Normal member and SMA patient were selected as controls. The hot mutation in exon 10 of FGFR3 gene and PAH gene were detected by DNA sequencing in patients, normal phenotype individuals and pregnancy fetus. **Results** Homozygous deletion of the SMN1 exon7 wasn't detected in pregnancy fetus. The pedigree diagnosed as negative continued to pregnancy, and gave birth to a normal baby. c. 781C>T (p. Arg261Ter) and c. 842C>T (p. Pro281Leu) mutations of PAH gene were detected in patient with PKU positive family history. Fortunately, Sequencing analysis revealed the fetus shows the mutation of PAH gene as same as his mother c. 842C>T (p. Pro281Leu). The pedigree diagnosed as carrier continued to pregnancy. The mother of the fetus diagnosed as achondroplasia had G1138A mutation, but the fetus had normal nucleotide at nucleotide 1138 in exon 10 of FGFR3, therefore were excluded from achondroplasia. **Conclusions** The application of different test methods is efficient and practical ways in different monogenic disease.

【Key words】 monogenic disease; prenatal molecular diagnosis; spinal muscular atrophy; PKU; achondroplasia

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2014.04.011

基金项目:陕西省科技统筹创新工程(2012KTCL03-09)

* 通讯作者:张建芳, E-mail: zhangjf@fmmu.edu.cn

目前,遗传病与心血管病、癌症一起成为严重危害人类健康和致死率最高的前三名疾病,也是我国出生缺陷的重要原因之一^[1]。其中单基因病是遗传病中最主要的一个类型,它是指由于单个基因异常导致且以孟德尔方式遗传的疾病。根据 WHO 统计显示^[2],全球出生人口单基因病累计发病率高达 10/1000。尽管单个单基因疾病非常罕见,但所有单基因病累计占婴儿死亡率约为 20%,儿科住院率达 10%。脊髓性肌萎缩症(SMA)、苯丙酮尿症(PKU)和先天性软骨发育不全(ACH)是高发率、高致畸率的遗传病,这些单基因遗传病不仅影响着患儿及其后代的生存质量,而且已经成为影响人们正常生活的社会问题,进行这些单基因遗传病的产前诊断是防止患儿出生的强有力的手段。

单基因病的检测方法很多,产前基因诊断存在高风险性、时间紧迫性等缺点,因此准确、高效的一线检测手段迫切需要。导致单基因病发生的主要原因有基因的缺失、重复、点突变等,因此,在临床检测中需要根据不同单基因病的基因突变类型,建立可靠高效的方法。通过文献检索发现^[3-5],SMN1 第 7、8 号外显子在 98.6%的 SMA 患者中有纯合缺失或截断,是儿童型 SMA 发病的主要原因;而 PAH 基因的突变是导致苯丙酮尿症(PKU)发生的主要致病基因;先天性软骨发育不全的致病基因 FGFR3 存在一个突变热区是 FGFR3 基因第 10 号外显子的 1138 位核苷酸。根据这 3 种不同的基因突变类型,本研究分别应用 DHPLC 技术和直接测序法对具有脊髓性肌萎缩症、苯丙酮尿症和先天性软骨发育不全患者家庭中孕妇绒毛或者羊水样本进行产前分子诊断,以期达到避免 SMA、PKU 和 ACH 患儿出生的目的。

1 材料与方法

1.1 基本资料

1.1.1 孕 10 周,第二胎,已育 1 男孩,8 月时表现为四肢肌力,肌张力较差,不能活动,勉强可以坐。

1.1.2 孕 21 周,第二胎,已育 1 男孩,临床诊断为苯丙酮尿症。

1.1.3 孕 18 周,第一胎,孕妇为软骨发育不全

患者。

1.2 方法

1.2.1 样本的采集 外周血采集:用一次性无菌注射器取受试者静脉血 4 ml,于紫色收集管(EDTA 抗凝)内,4℃保存备用。胎儿样本的采集:孕妇排空膀胱,平卧位,无菌消毒条件下,在 B 超定位下经腹部行绒毛或者羊水穿刺术,采集胎儿样本。

1.2.2 DNA 提取 采用天根公司全血 DNA 提取试剂盒提取绒毛、羊水和外周血 DNA,采用分光光度计和 0.8%的琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 浓度检测,-20℃保存备用。

1.2.3 基因检测方法

1.2.3.1 脊髓性肌萎缩症的基因检测^[6] PCR 反应液体系:2 μl dNTP(0.25 mM),1 μl 引物(F-R)(10p),0.5 μl Mg(0.25 mM),0.18 μl Qiagen 热启动 Taq E(5U/μl),1 μl DNA 模板,其余用 ddH₂O 补足到 5 μl。正向引物 SMN1 F:5'-TGTCTTGT-GAAACAAAATGCT-3';反向引物 SMN1 R:5'-AAAAGTCTGCTGGTCTGCCTA-3'。

SMN1 基因外显子 7 缺失筛查 PCR 反应程序:预变性 95℃ 10 分钟;变性 95℃ 15 秒;退火 60℃ 60 秒,延伸 60℃ 60 秒(循环 40 次);最后延伸 60℃ 10 分钟。PCR 扩增产物检测后,以正常个体的样本为参照,取 PCR 产物 5 μl,先采用美国环球基因公司 DHPLC 分析仪对 SMN1 基因外显子 7 缺失筛查,分析柱温度为 54℃,片段长度 426bp,自动加样,洗脱,检测 SMN1 外显子缺失和基因拷贝数检测。DHPLC 峰值可通过 WAVE MAKER 软件自动测量每个外显子产物峰的高度。计算公式[(样本组求出检测峰/参照峰)÷(正常对照组求出检测峰/参照)]校正后比值后约等于 1.0,则检测的基因外显子正常(双拷贝);如得到的数值约等于 0.5,则显示检测的基因外显子存在杂合性缺失;如得到的数值大于 2.0,则显示检测的基因外显子拷贝数存在异常重复。

1.2.3.2 苯丙酮尿症检测^[7] 设计苯丙酮尿症的致病基因 PAH 基因的外显子及其侧翼序列的引物,PAH 基因检测 PCR 反应程序:预变性 95℃ 5 分钟;变性 95℃ 35 秒;退火 56℃ 35 秒,延伸

72 ℃35 秒(循环 29 次);最后延伸 72 ℃10 分钟。PCR 扩增产物送上海生工直接测序。

1.2.3.3 先天性软骨发育不全的检测过程 FG-FR3 基因外显子 10 引物序列参考文献^[8],由上海生工公司合成,PCR 反应程序:预变性 95 ℃5 分钟;变性 95 ℃30 秒;退火 61 ℃30 秒,延伸 72 ℃30 秒(循环 32 次);最后延伸 72 ℃10 分钟。

2 结果

经 DHPLC 技术检测结果发现患者 SMN1 基

因 exon7 纯合缺失,拷贝数为 0,其父母亲均为 SMA 致病基因携带者,SMN1 基因的 exon7 拷贝数为 1,可推测出患者的致病基因分别遗传自父亲和母亲。明确突变位点后,对胎儿绒毛组织进行检测,STR 遗传位点分析显示无母体细胞污染。胎儿的 SMN1 基因第 7 外显子未见缺失,拷贝数为 2,根据 SMN 基因缺失频率分析表明胎儿 90%以上是正常儿,建议其继续妊娠,胎儿已经出生,发育正常,取外周血重复诊断,结果与产前诊断结果一致(图 1)。

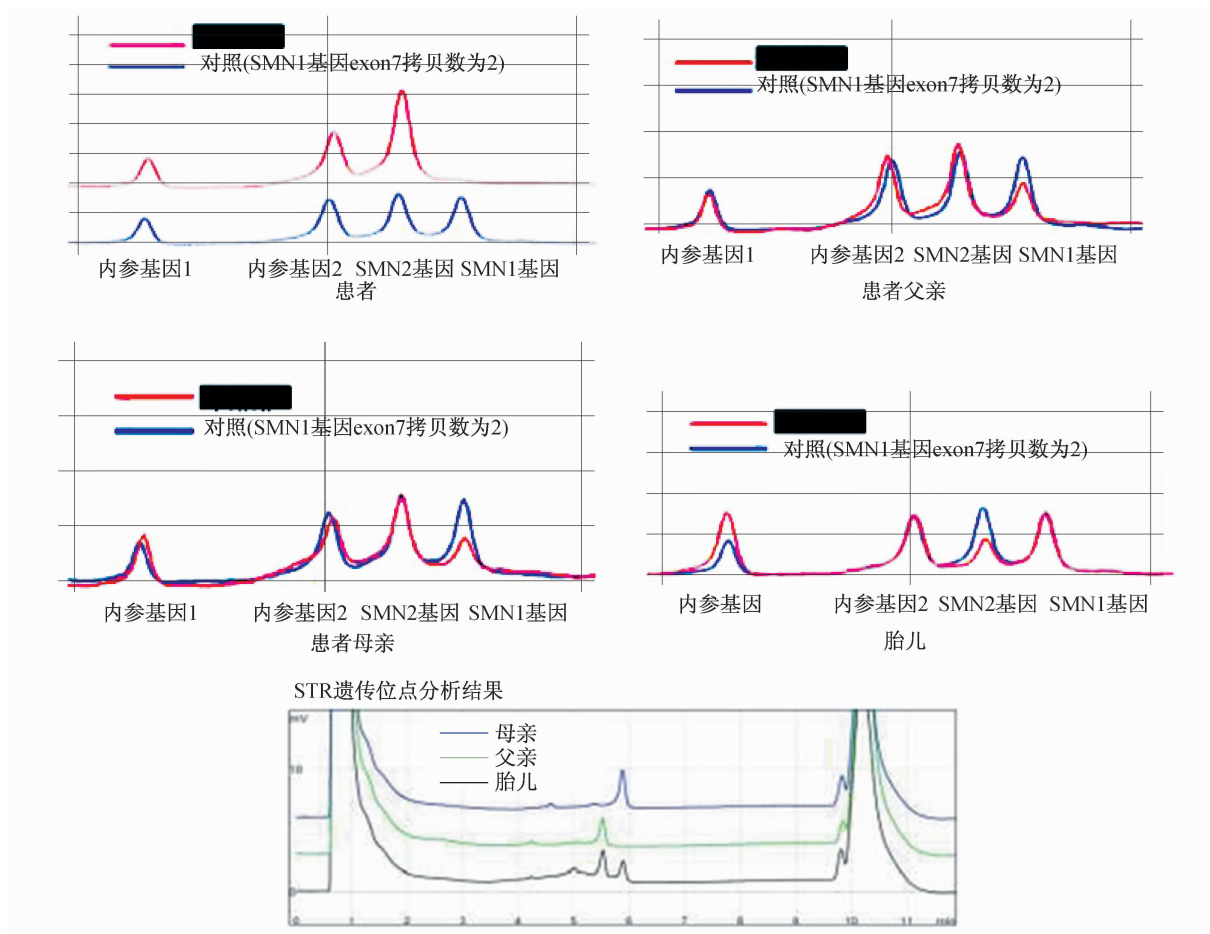


图 1 脊髓性肌萎缩症家系产前基因诊断

对苯丙酮尿症家系进行 PAH 基因测序显示:先证者在 PAH 基因上存在无义突变 c. 781C>T (p. Arg261Ter) 和错义突变 c. 842C>T (p. Pro281Leu),均为杂合子。先证者父亲在 PAH 基因上存在无义突变 c. 781C>T (p. Arg261Ter),为杂合子;不存在错义突变 c. 842C>T (p.

Pro281Leu)。先证者母亲在 PAH 基因上不存在无义突变 c. 781C>T (p. Arg261Ter);存在错义突变 c. 842C>T (p. Pro281Leu),为杂合子。推测出患者的两个突变分别来自父亲和母亲,为复合杂合突变类型,经相关文献检测发现该复合杂合突变类型可能是导致患者发病的原因。对胎儿羊水细胞检测显

示:胎儿羊水样本在 PAH 基因上不存在无义突变 c. 781C>T(p. Arg261Ter);存在错义突变 c. 842C>T(p. Pro281Leu),为杂合子,与患者母亲的突变类型一致,可以推测胎儿为携带者,不发病,可以继续妊娠(图 2)。

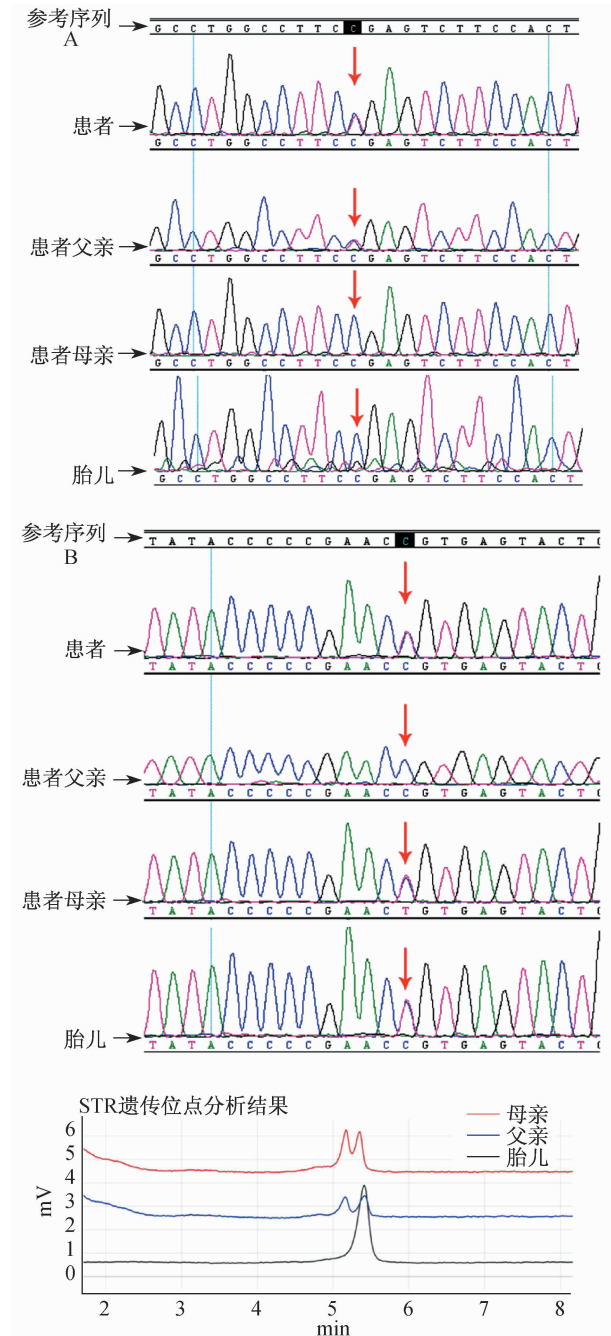


图 2 苯丙酮尿症家系产前基因诊断测序图

软骨发育不全患者经基因测序:患者在 FGFR3 基因外显子 10 发现 1 处序列异常, c. 1138G>A, 导致编码氨基酸改变 Gly380Arg。检测结果在人类基

因突变数据库进行检索分析, c. 1138G>A (Gly380Arg) 改变与软骨发育不全密切相关。胎儿羊水样本在 FGFR3 基因外显子 10 未发现序列异常, STR 遗传位点分析显示无母体细胞污染, 其遗传方式符合孟德尔遗传定律(图 3)。建议其继续妊娠, 胎儿已出生, 发育正常。

3 讨论

单基因病具有亲代向子代遗传传递的特性, 患者一旦被诊断为遗传性疾病, 对家庭的打击是巨大的, 患者及其亲属常常难以接受和承认患病的事实, 该类遗传病只有通过产前诊断才能有效防止患儿出生。产前分子诊断主要针对有生育患儿风险夫妇的胎儿进行诊断, 通过分子诊断可对明确诊断为某种疾病的胎儿采取干预措施, 如对目前尚无治愈可能的单基因病的胎儿可建议实施选择性流产^[9]。目前国内外已实现多种取材方法(绒毛、羊水、脐血、母体外周血富集胎儿有核细胞)和多种分子学检测手段(PCR-RFLP、PCR 单链构象多态性、DNA 测序、高效液相色谱等)结合, 对单基因病进行产前基因诊断。基因检测是单基因病产前诊断的金标准, 避免了产前超声容易造成的误诊和不必要的治疗性引产。

Migita 等^[10]认为早期绒毛膜细胞易被母体组织细胞污染, 在 SMA 家系产前诊断研究中, 我们采用经腹绒毛活检术, 获取胎儿绒毛膜细胞进行 SMN1 基因第 7 号外显子的 DHPLC 方法检测, 同时以 STR 遗传位点判断是否存在母体细胞污染, 可在早期进行取材, 安全性较高, 结果准确^[11]。绒毛活检在单基因病中具有重要的临床价值, 单基因病家庭可在孕早期选择合适妊娠方式, 若胎儿未检测出突变位点, 建议继续妊娠, 减轻家庭的心理负担。若胎儿检测出突变位点, 且该单基因病无法治疗, 可建议其终止妊娠。若胎儿为携带者, 建议其后代也应进行产前分子诊断, 有效地避免患儿的出生。因此, 妊娠早期采集绒毛进行单基因病的分子学诊断可以达到早诊断、早发现、早干预的目的。

此外, 羊膜腔穿刺已成为当今世界最常用且安全可靠的前产诊断取材方法, 本研究中我们分别对

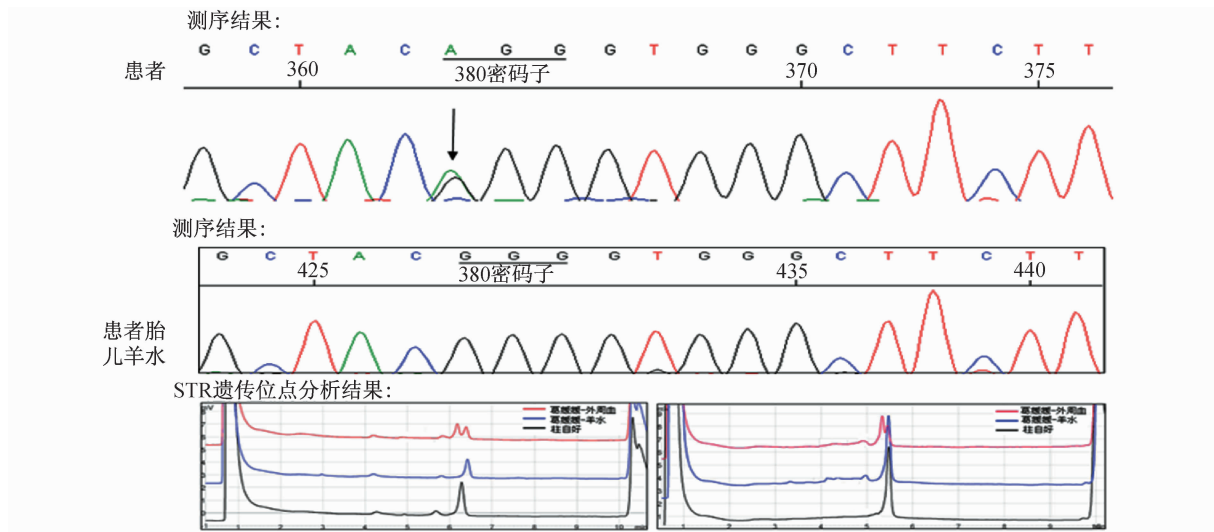


图3 软骨发育不全家系产前基因诊断测序图

PKU 家系孕 18 周和 ACH 家系孕 24 周羊水细胞进行直接测序法检测。在 PKU 家系中,患者在其 PAH 基因编码区发现 1 个无义突变 c. 781C>T(p. Arg261Ter),为杂合子,该突变造成 PAH 氨基酸编码提前终止,很可能影响其蛋白功能。已有该位点致病性的相关报道,且其在人群中发生频率极低^[12,13]。在其 PAH 基因编码区还发现 1 个错义突变 c. 842C>T(p. Pro281Leu),为杂合子,经 SIFT 和 Polyphen 对其进行蛋白功能预测,结果均显示为有害。已有该位点致病性的相关报道,且其在人群中发生频率极低^[14]。而在胎儿羊水细胞未发现 PAH 基因上的无义突变 c. 781C>T(p. Arg261Ter)和错义突变 c. 842C>T(p. Pro281Leu),胎儿为携带者。在 ACH 家系中,ACH 患者胎儿羊水样本在 FGFR3 基因外显子 10 未发现序列异常,未遗传到母亲突变位点 c. 1138G>A(Gly380Arg),其母亲的突变位点是与目前的研究报道相一致的,99%的 ACH 是由于成纤维细胞生长因子受体 3 基因(FGFR3)第 10 外显子发生 G1138A(98%)或 G1138C(1%)突变,导致跨膜区第 380 位密码子甘氨酸被精氨酸取代^[15]。从以上研究结果可以看出,苯丙酮尿症和先天性软骨发育不全以点突变为主要突变形式,并可见到明显的突变热点,而脊髓性肌萎缩症 98.6%的患者存在 SMN1 基因纯合缺失,这些突变基因谱提示不同的

单基因遗传病致病基因的突变特点是不同的,某些致病基因在一个种族人群中的突变性质、分布、热点及其与其他民族地区的差异,对遗传病诊断、遗传咨询和建立有效的基因诊断程序是非常重要的。在临床检测中,对于基因拷贝数发生变化的单基因病,可应用 DHPLC 技术具有较高的灵敏度和特异度,而点突变的检测采用直接测序法方法简单,结果可靠。

总之,根据不同单基因病的突变特点,应用 DHPLC 技术以及直接测序法对其进行分析,可快速、准确做出判断,基因诊断已成为有效的诊断性检查,且在孕早期绒毛活检,孕中期羊膜腔穿刺以及孕晚期脐带血采集这些为单基因病产前诊断提供了安全、有效的保证,值得临床推广应用。

参考文献

- [1] 刘敬忠. 遗传病等先天性疾病的基因诊断技术进展[J]. 中国检验医学杂志, 2002, 25(2): 73-75.
- [2] Scriver. Genes and human disease[R]. World Health Organization, 1995.
- [3] Lefebvre S, Burglen L, Rebollet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene[J]. Cell, 1995, 80(1):155-165.
- [4] Kidd JR, Pakstis AJ, Zhao H, et al. Haplotypes and linkage disequilibrium at the phenylalanine hydroxylase locus, PAH, in a global representation of populations[J]. Am J Hum Genet, 2000, 66(6):1882-1899.
- [5] Patil SJ, Banerjee M, Phadke SR, et al. Mutation analysis

- in Indian children with achondroplasia-utility of molecular diagnosis[J]. Indian J Pediatr. 2009;76(2):147-149.
- [6] 肖雪, 蔡兰云, 王蕊艳, 等. DHPLC技术在儿童型脊髓型肌萎缩症的基因诊断及携带者基因筛查中的应用[J]. 江西医学院学报, 2009, 2(49), 99-102.
- [7] 梁海燕, 靳耀英, 喻唯民. 苯丙氨酸羟化酶基因突变分析及与临床严重度相关性的研究[J]. 中日友好医院学报, 2005, 4(19):198-201.
- [8] Shiang R, Thompson L M, Zhu Y Z, et al. Mutations in the transmembrane domain of *FGFR3* cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia droplasia[J]. Cell, 1994, 78:335-342.
- [9] 孔祥东, 史惠蓉. 单基因遗传病产前基因诊断发展、困难与对策[J]. 郑州大学学报(医学版), 2008, 43(1):18-20.
- [10] Migita M, Uchikoba Y, Orimo H, et al. Genetic diagnosis of Werdnig—Hofmann disease:a problem for application to prenatal diagnosis[J]. J Nippon Med Sch, 2003, 70(1):45-48.
- [11] Chaturvedi L S, Srivastava S, Mukherjee M, et al. Cartier detection in non-deletional Duchenne/Becker muscular dystrophy families using polymorphic dinucleotide (CA) repeat loci of dystrophin gene[J]. Indian J Med Res, 2001, 113:19-25.
- [12] Shirahase W, Oya N, Shimada M. A new single base substitution in a Japanese phenylketonuria (PKU) patient [J]. Brain and Development, 1991, 13(4):283-284.
- [13] Okano Y, Asada M, Kang Y, et al. Molecular characterization of phenylketonuria in Japanese patients[J]. Human genetics, 1998, 103(5):613-618.
- [14] Bardelli T, Donati M A, Gasperini S, et al. Two novel genetic lesions and a common BH4-responsive mutation of the PAH gene in Italian patients with hyperphenylalaninemia[J]. Molecular genetics and metabolism, 2002, 77(3):260-266.
- [15] Bellus GA, Heferon TW, Ortiz deLuna RI, et al. Achondroplasia defined by recurrent G380R mutations of *FGFR3*[J]. Am J Hum Genet, 1995, 56(2):368-373.

(收稿日期:2014-06-10)

编辑:邹刚

读者 · 作者 · 编者**本刊对照片及图像的要求**

照(图)片每3张图单独占1页,集中附于文后,分别按其在正文中出现的先后次序连续编码。每张照(图)片均应有必要的图题及说明性文字置于图的下方,并在注释中标明图中使用的全部非公知公用缩写;图中箭头标注应有文字说明。大体标本照片在图内应有尺度标记,病理照片要求注明特殊染色方法和高、中、低倍数。照片要求有良好的清晰度和对比度,并在背面标明图号、作者姓名及图的上下方向。说明文字应简短,不应超过50字,所有的图在文中相应部分应提及。电子图片采用jpg格式,分辨率不低于300像素/英寸,并应经过剪切后充分显示关键部分。

动态图像分别按其在正文中出现的先后次序连续编码,文中应标记为“动态图×”。视频资料要求图像清晰稳定,剪接顺畅,保持可能获得的最高清晰度模式,视频文件采用AVI格式,大小在5M以内。每个文件名均应与文中的名称相符,如“动态图×”。

中国产前诊断杂志(电子版)编辑部