

基于荧光聚合酶链反应的脆性 X 综合征 产前筛查技术的建立

李海波 刘敏娟 毛君 李红 陈瑛*

(南京医科大学附属苏州医院 生殖与遗传中心,江苏 苏州 215002)

【摘要】 目的 建立针对脆性 X 综合征 FMR1 基因 CGG 重复数的快速产前检测技术方法,用于基于人群的筛查。**方法** 采用荧光 PCR 法对 356 名孕妇进行产前 FMR1 基因 CGG 重复数检测。**结果** 本方法可检测 CGG 重复数小于 130 的携带者,共 275 例(77.25%)毛细管电泳结果显示为 2 组峰,提示为杂合型基因型,可明确诊断。81 例(22.75%)仅见到一组峰,提示可能为纯合子,也可能为 CGG 重复数高于 130 的携带者。**结论** 基于荧光 PCR 的检测技术,临床上可实现近 80% 孕妇 FMR1 基因 CGG 重复数精确、快速的初筛,剩余病例的明确诊断尚需其他技术辅助。

【关键词】 脆性 X 染色体综合征;FMR1 基因;产前检测;荧光聚合酶链反应

【中图分类号】 R715.5 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To establish an assay for detecting CGG repeats in FMR1 gene efficiently, and ascertain this assay as tools for population-based screening. **Method** 365 pregnancies in routine prenatal screening were recruited for genotyping by using fluorescence polymerase chain reaction (F-PCR). **Results** The F-PCR accurately detected permutation alleles up to 130 CGG repeats. 77.25% of the 365 pregnant women enrolled in routine prenatal screening were carrying heterozygous alleles. Because of the limitation of the approach, 22.75% of the samples with single peak in electrophoresis can not be diagnosed. **Conclusions** The F-PCR assay developed in this study was a reliable and efficient first-step approach for fragile X syndrome in clinical testing and for prenatal purpose, but for those carrying up to 130 repeats and homozygous individuals further tests are needed.

【Key words】 fragile X syndrome; fragile X mental retardation 1; prenatal screening; fluorescent polymerase chain reaction

脆性 X 综合征(fragile X syndrome, FXS)是 X 连锁显性遗传病[MIM: 300624], FMR1 基因中(CGG)_n 重复序列的不稳定性扩展及其上游 CpG 岛的异常甲基化是导致该病的分子基础。临床表现以不同程度的智力障碍为主,此外可伴有行为和体格发育异常及卵巢早衰等。在正常人群中其携带者所占比例高达 1%^[1],目前尚无确切的药物可以治

疗,女性携带者不但可累及生殖系统,还会将生育后代的致病效应放大,使子女出现严重的智力及生理功能异常,因此对孕妇行产前筛查进而指导生育就显得尤为重要^[2]。

因 FMR1 基因序列的特殊性,传统的 PCR 或 PCR 联合 Southern Blot 等技术或难于扩增,或检测精度不够,本文旨在建立基于荧光 PCR 快速筛查技术,分析普通孕妇人群中 FMR1 基因(CGG)_n 序列重复次数,并评估对其产前基因筛查的临床应用价值。

基金资助:江苏省“十二五”科教兴卫工程医学重点人才资助项目(编号 RC2011036);苏州市科教兴卫青年科技项目(KJXW2012026);苏州市“母婴阳光工程”专项基金

* 通讯作者:陈瑛, E-mail: cyandzh@sohu.com

1 对象和方法

1.1 研究对象 2009~2010年间在苏州市立医院持母婴阳光工程基因筛查券进行孕中期产前筛查的孕妇356名,均签署知情同意书。有3例明确CGG重复数的女性携带者样本用于技术体系的验证检测。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA制备 每例取200 μl 外周血,利用QIAamp DNA Mini Blood Kit(Qiagen公司,德国)提取基因组DNA,应用NanoDrop-1000(Thermo公司,美国)检测其浓度和纯度后,稀释至20 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 。

1.2.2 荧光PCR 参考Coffee等^[3]报导的方法加以改进,正反向引物跨越CGG重复区及侧翼序列,引物序列为:FXFOR 5'-AGGCGCTCAGCTC-CGTTTCGGTTTCCTTC-3'(正向)和FXX3 5'-FAM-GTGGGCTGCGGGCGCTCGAGG-3'(反向)(捷瑞生物工程有限公司,上海)。PCR总反应体系15 μl ,试剂主要购自瑞士Roche公司:去离子水4.83 μl ,10 \times PCR fasttaq buffer 1.0 μl ,5 \times RICH buffer 0.08 μl ,DMSO 0.5 μl ,25mM MgCl_2 溶液0.6 μl ,10mM含有等比例dNTP和deaza dGTP 1.6 μl ,4 mM引物FXFOR、FXX3各0.2 μl ,Fast-start Taq聚合酶0.6 μl ,模板DNA为0.6 μl 。反应于热循环仪上进行(9700型,ABI公司,美国)。反应起始温度98 $^{\circ}\text{C}$ 变性5分钟;共10个循环中97 $^{\circ}\text{C}$ 变性35秒,62 $^{\circ}\text{C}$ 复性35秒,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸3分钟;接着20个循环,97 $^{\circ}\text{C}$ 变性35秒,62 $^{\circ}\text{C}$ 复性35秒,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸4分钟,每循环延伸时间增加20秒;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10分钟。

1.2.3 毛细管电泳分析 每反应体系中加入Hi-Di甲酰胺(ABI公司,美国)9.0 μl ,内标ROX-1000(ABI公司,美国)0.2 μl ,荧光PCR产物1.0 μl ,混匀离心后,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5分钟,立即置冰上5分钟。采用ABI 3130遗传分析仪进行毛细管电泳,应用GeneMapper V3.0软件进行数据分析,根据电泳峰位置坐标计算CGG重复次数,公式为 $(\text{CGG})_n = (\text{横坐标位置} - 151) / 3 + \text{漂移系数}$ 。

2 结果

参考Coffee等^[3]的电泳峰图判读标准,在356例孕妇中,275例(77.25%)毛细管电泳结果显示为2组峰,提示为杂合型基因型,可以明确诊断,且2组峰计算后 $(\text{CGG})_n$ 重复数均低于130个重复。杂合基因型等位基因分布范围见图1所示,CGG重复数主要分布在29~35之间,占69.44%。275例样本中 $(\text{CGG})_n$ 重复大于45的前突变携带者共6例(2.18%)。

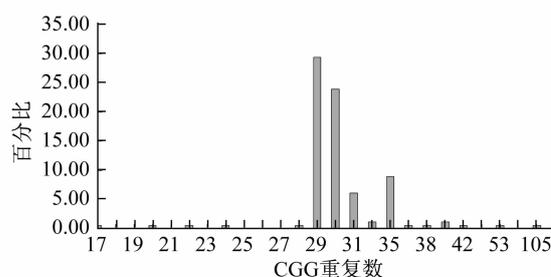


图1 CGG重复数的人群分布柱状图

81例(22.75%)仅见到一组峰,提示可能是纯合子,也可能存在一组峰 $(\text{CGG})_n$ 重复数高于130而超出本方法检测范围之外,这部分显示单组峰的样本也可能是前突变或全突变携带者(图2)。

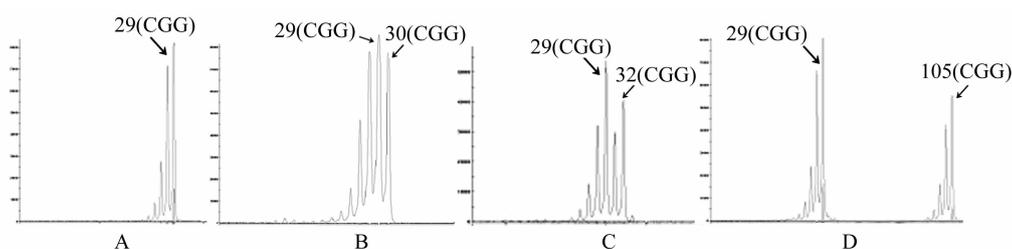


图2 不同基因型毛细管电泳峰型图

注:A单组峰,提示可能是纯合子,也可能存在一组峰CGG重复数高于130而超出本方法检测范围之外,这部分显示单组峰的样本可能是前突变或全突变携带者;B相差一个重复的2组峰;C相差2个重复的2组峰;D前突变携带者的峰型图

3例已知CGG重复数样本的验证检测中,1例正常、1例CGG重复数115的携带者均能够正确检出,1例CGG重复数为350的携带者未能明确检出。

3 讨论

1991年Pieretti等^[4]发现了FXS相关致病基因FMR1,提出FMR1基因内(CG)n重复序列的不稳定性扩展及其上游CpG岛的异常甲基化是导致该病的分子基础。研究指出小于44个CGG重复为正常;45~54个CGG重复为中间型(灰区);55~200个CGG重复属于前突变型;大于200个CGG重复为突变型,为致病型。前突变型未表现临床症状,但约有20%的前突变型女性携带者易发生“脆性X原发性卵巢功能不全(FX-POI)”,而部分前突变型男性携带者在其老年时期易发生“脆性X相关震颤-共济失调综合征(FX-TAS)”。全突变型的男性100%表现临床症状,女性则依据X染色体失活的不同而具有异质性临床症状。

前突变携带者的后代会增加约100个CGG的重复,这样子代变成致病性全突变的几率近100%。经过大样本的检测分析^[5]和人群调研^[6],美国医学遗传学协会(ACMG)、世界卫生组织(WHO)已公布进行FXS分子诊断的适宜人群,并确立了诊疗指南^[7,8],以色列等国家已在孕妇中进行常规筛查^[9]。我国FMR1前突变的筛查未被广泛接受的主要原因为检测技术水平的限制及缺少区域人群突变携带率的有效数据,本研究也旨在揭示苏州地区脆性X携带者的突变谱及频率,初步结果显示CGG重复数低于130个重复的样本前突变携带率即达2.18%,高于以往报道^[1],提示苏州地区产前FXS产前遗传学筛查的可行性。

现有多种方法用于FXS的分子诊断,其中包括Southern印迹杂交法,按照杂交出的条带结果可检出全部前突变和全突变等位基因,还可检测CpG岛的甲基化,是目前较为可靠的诊断方法。但是该方法的缺点是酶解不完全,容易造成假阳性结果,操作繁琐,花费高,对样本量要求大,难于精确确定拷贝数等。在基因表达水平上的检测方法有RT-PCR方法(检测FMR1基因的转录)和免疫学方法(采用抗体检测FMR1基因的翻译产物FMRP蛋白),但只能检测全突变患者,所以很难将其应用于大范围的人群筛查。本实验方法与上述方法相比,具有高通量、简便、快速、价廉的特点,初筛能够快速排除近

80%的杂合的正常个体及重复数在50~130个重复的前突变个体。剩余病例的明确诊断尚需其他与本技术检测手段类似的技术(如AmplideX FMR1 PCR Kit, Asuragen公司,美国)加以辅助^[10]。通过本研究,我们认为本方法可靠、简便,对产前孕妇FMR1基因CGG重复数筛查具有一定的临床应用价值。

致谢 感谢北京大学医学部医学遗传学系钟南教授对本研究的指导。

参考文献

- [1] Crawford DC, Acuna JM, Sherman SL. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review[J]. *Genet Med*, 2001, 3(5): 359-371.
- [2] Jacquemont S, Birnbaum S, Redler S, et al. Clinical utility gene card for: fragile X mental retardation syndrome, fragile X-associated tremor/ataxia syndrome and fragile X-associated primary ovarian insufficiency[J]. *Eur J Hum Genet*, 2011, 19(9). doi: 10.1038/ejhg.2011.55. Epub 2011 May 4.
- [3] Coffee B, Keith K, Albizua I, et al. Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated FMR1 DNA[J]. *Am J Hum Genet*, 2009, 85(4): 503-514.
- [4] Pieretti M, Zhang FP, Fu Y, et al. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome[J]. *Cell*, 1991, 66(4): 817-822.
- [5] Strom CM, Crossley B, Redman JB, et al. Molecular testing for Fragile X Syndrome: lessons learned from 119,232 tests performed in a clinical laboratory[J]. *Genet Med*, 2007, 9(1): 46-51.
- [6] Metcalfe S, Jacques A, Archibald A, et al. A model for offering carrier screening for fragile X syndrome to nonpregnant women: results from a pilot study[J]. *Genet Med*, 2008, 10(7): 525-535.
- [7] Hawkins M, Boyle J, Wright KE, et al. Preparation and validation of the first WHO international genetic reference panel for Fragile X syndrome[J]. *Eur J Hum Genet*, 2011, 19(1): 10-17.
- [8] Sherman S, Pletcher BA, Driscoll DA. Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing[J]. *Genet Med*, 2005, 7(8): 584-587.
- [9] Toledano-Alhadeff H, Basel-Vanagaite L, Magal N, et al. Fragile-X carrier screening and the prevalence of premutation and full-mutation carriers in Israel[J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 69(2): 351-360.
- [10] Chen L, Hadd A, Sah S, et al. An information-rich CGG repeat primed PCR that detects the full range of fragile X expanded alleles and minimizes the need for southern blot analysis[J]. *J Mol Diagn*, 2010, 12(5): 589-600.

编辑:邹刚
(收稿日期:2013-03-28)