

基因测序结合 STR 连锁分析在假肥大型肌营养不良症产前诊断中的应用

李少英 何文智 刘海波 冼嘉嘉 马晓燕 王晓蔓 黎青*

(广州医科大学附属第三医院 妇产科研究所实验部, 广东 广州 510150)

【摘要】 目的 假肥大型肌营养不良症(Duchenne/Becker muscular dystrophy (DMD/BMD))是一种 X-连锁隐性致死性遗传病,尚无特异性治疗方法,建立一套适合于 DMD 基因点突变产前诊断及早期产前诊断的方法,为携带者产前诊断提供有效的基因诊断途径,以避免患胎的出生。方法 27 例 DMD 基因点突变携带者妊娠期取绒毛组织或羊水进行风险胎儿的 DMD 基因测序、DNA-STR 分型和性别基因检测。结果 27 个风险胎儿中,检出 DMD 患胎 6 例,其中无义突变 3 例,移码突变 2 例,剪接位点突变 1 例;检出携带者胎儿 8 例,其中移码突变 4 例,无义突变 3 例,剪接位点突变 1 例;13 例为正常胎儿。27 例中 11 例是通过绒毛膜穿刺活检进行,其余为羊膜腔穿刺羊水检查。结论 基因测序结合 STR 连锁分析用于用于 DMD 点突变的产前基因诊断是目前一种准确和可行的方法。可成功地避免患病胎儿的出生,并能明确区分 DMD 基因纯合子和杂合子突变,避免正常胎儿被错误淘汰。

【关键词】 假性肥大型进行性肌营养不良症抗肌萎缩蛋白;基因测序;产前诊断

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective Duchenne/Becker muscular dystrophy (DMD/BMD) is an X-linked lethal recessive disease caused by mutations in the dystrophy gene. There is no specific and efficient treatment for this serious and disabling disease. We performed prenatal diagnosis for the carriers with DMD gene point mutations to early detection and prevent fatal birth defects in birth. **Method** Using DNA sequencing and linkage analysis of short tandem repeats (STR) methods, 27 cases which carrying DMD gene point mutations were performed prenatal diagnosis through amniocentesis or chorionic villus sampling. **Results** Within 27 cases of DMD risk fetus, 6 cases were found to be sufferer; in which 3 cases were Nonsense mutation homozygote, 2 cases were Shift code mutations, 1 case was Splice site mutation. 8 cases were carrier, in which 4 cases were Shift code mutation heterozygote, 3 cases were Nonsense mutation heterozygote, 1 case was Splice site mutation heterozygote. 13 cases were normal. 16 cases were performed prenatal diagnosis through amniocentesis and 11 cases through chorionic villus sampling. **Conclusions** DNA sequencing combined with linkage analysis of short tandem repeats (STR) provides a accurate and available method for DMD point mutation in prenatal diagnosis. It can make a distinction between DMD gene homozygote and heterozygote, avoid misdiagnosis of normal male fetus.

【Key words】 Duchenne/Becker muscular dystrophy (DMD/BMD); dystrophy gene; DNA sequencing; prenatal diagnosis

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2015.04.006

基金项目:广东省科技计划项目(2013B022000023),广州市科技计划项目(201300000095)

* 通讯作者:黎青, E-mail: 81292522@163.com

假性肥大型进行性肌营养不良症(Duchenne/Becker muscular dystrophy (DMD/BMD))是源于横纹肌的一种 X 连锁隐性致死性遗传病,进行性肌萎

缩和腓肠肌无力伴小腿腓肠肌假性肥大是其典型的临床特征,群体发病率高达1/3500^[1]。本病定位在人类X染色体短臂Xp21上,DMD基因突变是假肥大型肌营养不良症发病的分子遗传学基础。迄今尚无有效的治疗方法。其防治的基本措施是对DMD高危孕妇进行胎儿产前基因诊断,避免有病患儿出生^[2]。

我们采用基因测序方法对经 Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)方法检测后未检测出DMD基因缺失和重复突变的患儿及家庭成员进行DMD基因79个外显子测序,并对检出致病点突变的携带者孕妇进行产前诊断。为确保产前诊断的准确率,我们采用基因测序结合STR连锁分析对风险胎儿进行诊断。本文是本院从2012~2014年间对25个DMD基因点突变家系的27个风险胎儿进行产前基因诊断的结果。

1 资料与方法

1.1 基本资料 从2012~2014年,我们接受了27个假肥大型肌营养不良症风险胎儿产前诊断,先证者主要来源于本院遗传咨询门诊、中山大学附属第一医院及广州市儿童医院等,先证者具有典型的临床表现,经血清肌酶、肌电图或肌肉活检等检查,排除其他神经肌肉系统遗传病,并经MLPA方法检查后未发现有DMD基因79个外显子中有缺失和重复。

1.2 方法

1.2.1 先证者及孕妇均经本院基因诊断确诊,明确先证者为DMD基因点突变,孕妇为携带者。

1.2.2 携带者再次生育时,于妊娠9~12周左右,经常规术前检查,在B超引导下,行绒毛膜穿刺术抽取绒毛组织约10 mg或于妊娠16周以后行羊膜腔穿刺术以获得10 ml羊水样本。

1.2.3 DNA的提取采用QIAmp DNA mini kit (QIAGEN, 德国)快速DNA提取试剂盒提取DNA样本。

1.2.4 PCR反应根据GenBank上DMD基因序列NC_000023.9,用Primer premier 5.0软件设计引物,扩增DMD基因单个外显子的基因序列。引物

由上海英骏生物技术公司合成。PCR反应总容积为10 μ l,每一反应体系中含10 \times PCR Buffer II 1.0 μ l,3.2 μ mol/L上下游引物各1.0 μ l,10 mmol/L的dNTP混合物0.35 μ l,5.6 units/ μ l的Taq DNA Polymerase 0.07 μ l,模板DNA 1.0 μ l。反应条件为94 $^{\circ}$ C 12分钟(94 $^{\circ}$ C 30秒,52 $^{\circ}$ C或55 $^{\circ}$ C 30秒,72 $^{\circ}$ C 30秒)35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10分钟;4 $^{\circ}$ C保存。扩增完成后取5.0 μ l PCR产物,DNA Marker标记,于2.0%琼脂糖凝胶,电压120V,电泳大约30分钟,BIO-RAD凝胶成像系统观察结果,若显示各上样孔扩增条带清晰,结果可靠,可用于基因测序检测。

1.2.5 DMD基因测序采用BigDye Terminator v3.1试剂盒进行测序,测序产物在ABI genetic analyzer 3500上进行毛细管电泳,电泳结束后使用Sequencing Analysis 5.2和Mutation Surveyor软件进行结果分析。

1.2.6 STR连锁分析选用DMD基因内和两侧6个STR位点进行分析,PCR体系、条件与引物参照<http://www.DMD.CN/>。

2 结果

我们采用基因测序结合STR连锁分析的方法对25个出现过先证者家庭的27例高风险妊娠于妊娠早期抽取胎儿绒毛组织,或妊娠中期行羊膜腔穿刺术抽取羊水作产前诊断。

2.1 25个产前诊断家庭中,DMD先证者基因突变类型无义突变10例,占40%;移码突变9例,占36%;剪接位点突变5例,占20%;错义突变1例,占4%(见表1)。

2.2 DMD产前诊断结果 27个风险胎儿中,男性胎儿13例,检出DMD患胎6例,占46%(6/13);女性胎儿14例,检出携带者胎儿8例,占57%(8/14),48%(13/27)为正常胎儿。27例中11例是通过绒毛膜穿刺活检进行,其余为羊膜腔穿刺羊水检查。

2.3 胎儿DMD基因突变类型 6例患胎中,无义突变3例,移码突变2例,剪接位点突变1例;8例携带胎中,移码突变4例,无义突变3例,剪接位点突变1例(见表1)。

表1 胎儿基因突变类型、临床诊断及转归

编号	先证者基因型	突变类型	胎儿性别	胎儿诊断结果	妊娠转归
1	c. 7814C>G	错义突变	男	正常	继续妊娠
2 ^a	c. 265 delG	移码突变	女	携带者	继续妊娠
3	c. 5899C>T	无义突变	男	患胎	终止妊娠
4	c. 4598delA	移码突变	女	携带者	继续妊娠
5	c. 8390+1G>A	剪接位点突变	男	正常	继续妊娠
6 ^b	c. 8390+1G>A	剪接位点突变	男	患胎	终止妊娠
7	c. 2566C>T	无义突变	女	携带者	继续妊娠
8	c. 3604-1G>C	剪接位点突变	男	正常	继续妊娠
9	c. 7432dupG	移码突变	女	正常	继续妊娠
10	c. 354G>A	无义突变	女	正常	继续妊娠
11	c. 565 C>T	无义突变	男	患胎	终止妊娠
12	c. 565 C>T	无义突变	男	正常	继续妊娠
13	c. 4150G>T	无义突变	女	携带者	继续妊娠
14	c. 10020C>A	无义突变	女	携带者	继续妊娠
15	c. 8038C>T	无义突变	男	患胎	终止妊娠
16	c. 7657C>T	无义突变	男	正常	继续妊娠
17	c. 955delT	移码突变	男	正常	继续妊娠
18	c. 1821delA	移码突变	男	患胎	终止妊娠
19	c. 7523delA	移码突变	女	正常	继续妊娠
20	c. 615T>A	无义突变	女	正常	继续妊娠
21	c. 2169-1G>T	剪接位点突变	女	携带者	继续妊娠
22	c. 1331+1G>A	剪接位点突变	男	正常	继续妊娠
23	c. 4771 delG	移码突变	男	患胎	终止妊娠
24	c. 4617 delA	移码突变	女	携带者	继续妊娠
25	c. 8038C>T	无义突变	女	正常	继续妊娠
26	c. 4931delA	移码突变	女	携带者	继续妊娠
27	c. 831+1G>T	剪接位点突变	女	正常	继续妊娠

注:a:胎儿样本连锁分析结果(DMD携带者)与测序结果(DMD患胎)不一致,在原检测序列两侧设计引物重新测序,结果显示胎儿样本在原引物序列位置中发生新突变(c. 265-46G>GC),新测序结果与连锁分析结果一致。(见图1);b:胎儿样本6个STR连锁分析结果显示在配子形成过程中在所选的STR位点中内发生联会交换。

3 讨论

DMD基因具有突变频率高和突变形式多样的特点。缺失突变、重复突变及点突变是DMD基因主要的突变类型,其中缺失突变,占55%~65%,重复突变占5%~10%,点突变占25%~30%左右^[3]。目前,国内常用的检测DMD基因缺失/重复突变的技术有多重PCR技术、MLPA技术、变性高效液相色谱技术(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)等^[4]。检测DMD基因微小突变的技术有依赖于使用RNA的体外蛋白截短实验(protein truncation test, PTT)、编码序列直接测序法、使用基因组的变性梯度凝胶电泳法(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、单链构象多态性(single-strand conformation polymor-

phism, SSCP)、异源二聚体分析、变性高效液相色谱等方法,这些方法各有优缺点,但比较适合实验室使用的是直接测序法^[4]。

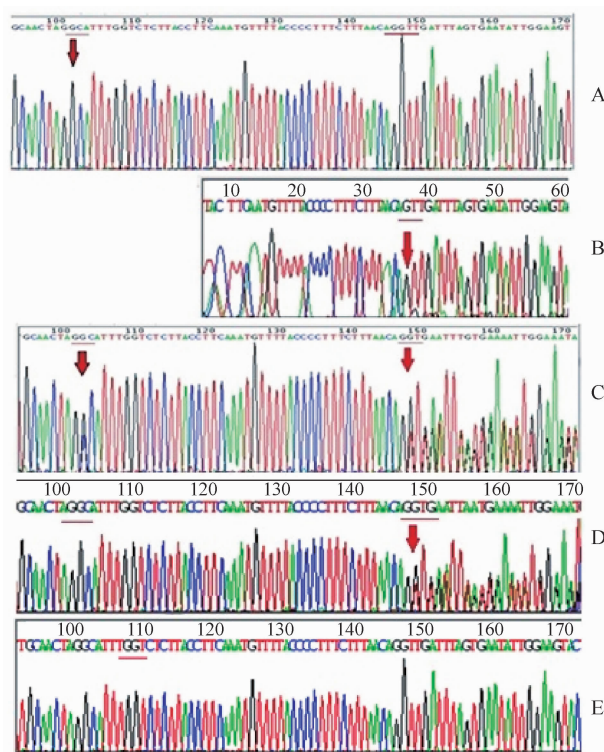


图1 2号样本DMD基因第5外显子测序结果

A:正常对照;B:胎儿样本(编号2)第一次测序结果示c. 265 delG(参考序列:NM-004006.2)符合DMD患者的基因特点;C:胎儿样本(编号2),在原检测序列两侧设计引物重新测序,结果显示c. 265-46G>C杂合子和c. 265 delG杂合子,突变点c. 265-46G>C刚好位于原引物序列位置中。D:胎儿的母亲,测序结果示c. 265 delG杂合子,无c. 265-46G>C突变;E:胎儿的父亲,测序结果示无c. 265-46G>C突变

DMD基因产前诊断是一个比较复杂的难题,本院自1994年以来致力于DMD的研究,建立了一套DMD基因诊断和产前诊断技术,包括性别诊断、多重PCR缺失突变分析、直接测序、STR单体型连锁分析。从2005年起,我们开展了MLPA方法同时诊断DMD基因79个外显子的缺失突变与重复突变信息^[5];对于未能检测出缺失突变与重复突变信息家系,如家系信息完整我们采用STR连锁分析方法进行产前诊断,但由于DMD基因庞大,在有丝分裂中基因内发生重组的可能性约为10%,故在分子学水平运用这种重复序列进行连锁分析的准确性大概为95%^[6-8],如6号家系,胎儿样本6个STR连锁分析结果显示在配子形成过程中在所选STR位点中内发生联会交换,只采用连锁分析无法对这胎

儿进行诊断。

从 2012 年起,我们开展了直接测序方法诊断 *DMD* 基因 79 个外显子的点突变信息,*DMD* 基因总检出率高于 95%。并对检出致病突变的携带者孕妇进行产前诊断。但只采用直接测序技术用于产前诊断有局限性。如 2 号家系(图 1),胎儿样本第一次测序结果显示 c. 265 delG,符合进行性肌营养不良患者的基因特点,但通过 STR 连锁分析和性别诊断结果显示该胎儿为女性携带者,测序结果和连锁分析结果不一致,考虑样本基因在引物部位存在突变,因此在原检测序列两侧设计引物重新测序,重新测序结果显示,该序列同时存在两个突变 c. 265-46G>C 杂合子和 c. 265 delG 杂合子,突变 c. 265-46G>C 刚好在原测序引物的位置,新测序结果符合携带者的基因特点,与连锁分析结果一致。同时对胎儿父母的该段序列测序,均无 c. 265-46G>C 突变,但胎儿存在 c. 265-46G>C 突变。因女性胎儿的两条 X 染色体一般一条源于母亲,一条源于父亲,从图 1 显示胎儿的 c. 265 delG 与 c. 265-46G 连锁,源于母亲,推测胎儿 c. 265-46G>C 突变源于父亲,该突变一种可能是精子减数分裂过程中偶发的新发突变,另一种可能源于父亲生殖腺嵌合体。生殖腺嵌合体在多种遗传病中均有报道,如进行性肌营养不良、巴特综合征、致死性成骨不全等^[9,10]。从上述例子显示,只采用 *DMD* 基因测序手段进行胎儿产前诊断会存在误判的风险。我们对胎儿进行 *DMD* 基因检测的同时,选择 *DMD* 基因内和两侧的 6 个 STR 位点进行连锁分析,从不同的角度考察含有突变的可能性,还可发现母体细胞污染问题。特别是在胎儿 *DMD* 基因型与母亲基因型相同的情况下,DNA-STR 分型显得尤其有必要,可避免 CVS 取样误差导致的结果错误^[11],确保产前诊断的准确率。

我们采用直接测序结合 STR 连锁分析和性别基因检测同时对 27 例胎儿进行产前诊断。检出男胎 13 例,46%(6/13)为患胎;女胎 14 例,57%(8/14)为携带者;48%(13/27)为正常胎儿。建议患胎终止妊娠,正常及携带者继续妊娠。其后进行追踪随访,均与诊断结果相符。

对家系中有先证者的高危孕妇进行产前诊断,可检测出患胎、携带者和正常胎儿。避免了患胎的出生和健康男孩被不必要地淘汰。我们所推荐的直接测序结合 STR 连锁分析和性别基因检测的联合

方法,检测结果快而准确,同时我们提倡进行绒毛活检早期产前诊断以减轻孕妇身心痛苦。27 例临床 *DMD* 基因点突变风险胎儿诊断获得了满意的结果,取得了明显的社会效益,对优生优育,提高人口素质具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Fortina P, Cheng J, Mann A, et al. Diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy and quantitative identification of carrier status by use of entangled solution capillary electrophoresis[J]. Clin Chem, 1997, 43: 745-751.
- [2] 李涛, 吴东, 侯巧芳, 等. MLPA 联合遗传连锁分析在假肥大型及肌营养不良症产前诊断中的价值[J]. 中华医学遗传学杂志, 2013, 30(1): 40-44.
- [3] Lee SH, Kwak IP, Cha KE, et al. Preimplantation diagnosis of non-deletion Duchenne muscular dystrophy (DMD) by linkage polymerase chain reaction analysis[J]. Mol Hum Reprod, 1998, 4(4): 345-349.
- [4] Shen BC. The analysis of Duchenne muscular dystrophy patients and carriers of the gene deletion, duplication and point mutation[M]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2006.
- [5] 李少英, 孙筱放, 黎青, 等. 中国人群中抗肌萎缩蛋白基因突变类型和分布特点及其与临床症状相关性的研究[J]. 遗传, 2011, 33(3): 251-254.
- [6] Beggs AH, Kunkel LM. A polymorphic CACA repeat in the 3' untranslated region of dystrophin[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 1931.
- [7] Lee SH, Kwak IP, Cha KE, et al. Preimplantation diagnosis of non-deletion Duchenne muscular dystrophy (DMD) by linkage polymerase chain reaction analysis[J]. Mol Hum Reprod, 1998, 4(4): 345-349.
- [8] Abbs S, Yau SC, Clark S, et al. Matthew CG and Bobrow M. A convenient multiplex PCR system for the detection of dystrophin gene deletions: comparative analysis with cDNA hybridization shows mistypings by both methods[J]. J Med Genet, 1991, 28: 304-311.
- [9] Chang B, Momoi N, Shan L, et al. Gonadal mosaicism of a TAZ(G4.5) mutation in a Japanese family with Barth syndrome and left ventricular noncompaction[J]. Mol Genet Metab, 2010, 100(2): 198-203.
- [10] 段红蕾, 王皖骏, 朱湘玉, 等. 连续发生两次同种新发 *DMD* 基因突变的家系[J]. 中华医学遗传学杂志[J]. 2015, 32(4): 495-497.
- [11] Winsor EJ, Akoury HD, Steele L, et al. The role of molecular microsatellite identity testing to detect sampling errors in prenatal diagnosis[J]. Prenat Diagn, 2010, 30: 746-752.

(收稿日期: 2015-11-08)

编辑: 宋文颖