# 应用高分辨熔解曲线分析法检测 FGFR3 基因 p. R248C 突变

刘颖娜 李茹 李东至\*

(广州医学院附属广州市妇女儿童医疗中心产前诊断中心,广东广州 510623)

【摘要】目的 探讨高分辨熔解曲线分析法用于 FGFR3 基因 p. R248C 突变检测的可行性。方法 选用经直接测序确诊基因型为 p. R248C 的致死性软骨发育不良 I型(type 1 thanatophoric dysplasia, TD I)样本 10 例和 30 例正常对照样本, PCR 扩增 FGFR3 基因第七外显子中包含 c. 742C>T(p. R248C) 位点的区域。应用 LightScanner 96(Idaho Technology)对 PCR 扩增产物进行高分辨熔解曲线分析。结果 应用高分辨熔解曲线分析法成功检测出 10 例 FGFR3 基因 p. R248C 杂合突变。结论 高分辨熔解曲线分析法是 1 种具有简单、高效、廉价和高通量等优点的新的分子遗传学分析法,能对 FGFR3 基因 的 p. R248C 突变进行快速基因诊断。

【关键词】 FGFR3 基因; 致死性软骨发育不良 I 型; 高分辨熔解曲线; 基因筛查

# Rapid Detection of the c. 742C>T Mutation of the FGFR3 Gene Causing Type 1 Thanatophoric Dysplasia by High-resolution Melting Analysis

#### Liu Ying-na, Li Ru, Li Dong-zhi\*.

(Prenatal Diagnostic Center, Guangzhou Maternal and Neonatal Hospital, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510623, China)

**(Abstract) Objective** To explore the feasibility of using high-resolution melting curve to detect the c. 742C>T(p. R248C) mutation of the FGFR3 gene causing type 1 thanatophoric dysplasia. **Methods** A 96-well LightScanner (Idaho Technology) for high resolution melting analysis was used to genotype the c. 742C>T mutation within the exon 7 of the FGFR3 gene . DNA samples including 10 prenatal samples with type 1 TD harboring the c. 742 C>T variant identified previously by DNA sequencing and 30 control samples from healthy individuals were amplified with the double-stranded DNA binding dye LC Green Plus. Melting curves were analyzed as fluorescence difference plots. **Results** Using the high-resolution melting curve analysis, we successfully genotyped the c. 742C>T (p. R248C) mutation in all of the 10 tested samples with type 1 TD. **Conclusion** High-resolution melting analysis is a kind of easy-to-use, rapid, and sensitive one tube assay for genotyping the c. 742C>T (p. R248C)mutation which is the most common one associated with type 1 TD. The technology has the potential to reduce sequencing burden and would be suitable for mutations screening of FGFR3 gene that have been found to be associated with TD. **(Key words)** FGFR3; Type 1 thanatophoric dysplasia; High-resolution melting; Genetic screening

高分辨熔解曲线(high-resolution melting, HRM)分析是通过实时监测升温过程中双链DNA

\*通信作者:李东至. E-mail: dongzhi3@yahoo.com.cn

荧光染料与 PCR 扩增产物的结合情况,获得双链 DNA 熔解曲线数据,根据熔解温度和曲线形状分析 PCR 扩增产物是否存在突变位点或单核苷酸多态 性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点。

基金项目:广东省科技厅一般项目(2008B080702011)

HRM采用新型的饱和染料 LC Green,不会抑制 PCR 反应,也不会引起双链 DNA 在解链过程中发 生重排,因此,更适用于检测单碱基突变、小片段插 入或缺失<sup>[1,2]</sup>。熔解曲线图形由 PCR 产物的片段长 度、碱基序列、GC 含量和杂合度等因素决定。根据 熔解温度的改变可区分野生型和纯合突变,而根据 熔解曲线形状不同可区分野生型和纯合突变,而根据 熔解曲线形状不同可区分野生型与杂合突变型。 HRM 具有操作简便、快速、高通量、低成本、结果准 确和闭管操作等优点,是 1 种新的遗传学分析方法。 本研究应用 HRM 技术检测 FGFR3 基因第 7 外显 子 c. 742 C>T(p. R248C)突变,探讨其用于致死性 软骨发育不良 I 型(thanatophoric dysplasia type 1, TD I)的快速分子诊断。

#### 1 资料与方法

1.1 研究对象和 DNA 提取 10 例 TD I 胎儿样 本(羊水或胎血)来自本院产前诊断中心,产前于孕 中期经超声诊断,并用 DNA 测序法进行基因诊断, 确诊为 FGFR3 基因 p. R248C 突变<sup>[3]</sup>。30 例正常 对照样本来自本院正常成人志愿者全血标本。 DNA 提取采用 Qiagen DNA Mini kit (Qiagen, Germany)试剂盒,按使用说明操作。采用单盲实 验法,40 例 DNA 样本只做序号标记,操作者在实验 前和实验过程中不知任何 1 例样本的突变情况,实 验结束后将实验得出的客观检测结果与已知的样本 性质进行对照。

1.2.1 引物设计 从 UCSC 基因组数据库(http:// genome.ucsc.edu)获得 FGFR3 基因 DNA 序列。应 用 LightScanner Primer Design Software 设计引物扩 增 FGFR3 基因第 7 外显子包含 c. 742 位点的区域, 正向引物序列为:5'-CCCTGAGCGTCATCTGCC-3', 反向引物序列为:5'-GCACCGCCGTCTGGTTG-3', 扩增片段长度为 85 bp。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 反应总体积为 10 μL,包括: dNTP 各 200 μM、正反向引物各 1.6 pM、0.5 UTaq DNA 聚合酶(Promega)、5 μL 2×GC buffer I (TakaRa)、20 ng 基因组 DNA 模板、1 μL 10×LC Green Plus。用 LightScanner(Idaho Technology)专用 的 96 孔板在热循环仪(Tprofessional, biometra)上扩 增模板。PCR 反应条件: 94 ℃预变性 3 min;随后 94 ℃变性 20 s,65 ℃退火 20 s,72 ℃延伸 20 s,共 40 个循环;最后 94 ℃ 30 s,25 ℃ 30 s形成异源双 链。PCR 扩增产物片段长度为 85 bp。

1.2.3 HRM 分析 PCR 扩增完成后,将 96 孔板 移至 LightScanner(Idaho Technology)进行熔解曲 线分析。LightScanner 温度范围设置为 70~98 ℃, 温度变化速度 0.1 ℃/s。持续监测荧光变化,采集 数据,获得熔解曲线,整个过程大概 5 分钟。应用 LightScanner Software with Call-IT 2.0 软件分析 数据。

1.2.4 基因测序 对 HRM 分析结果中野生型样 本进行随机抽样测序,获得野生基因型的标准品。

## 2 结果

HRM分析法成功检测出 10 例 FGFR3 基因 p. R248C 突变,该方法的敏感性和特异性均为 100%。图1示1例TDI样本和1例阳性对照样本 FGFR3 基因 c. 742 测序结果。图2示 30 例野生型 和10例杂合突变型样本 FGFR3 基因第7外显子 的熔解曲线图。图3示10 例突变基因型和30 例野 生基因型的-dF/dT vs. temperature 曲线差异,两者 区别明显。



图 1 (A)1例 TDI患者 FGFR3 第7外显子测序结果,
c. 742位点碱基为C/T杂合。(B)1例正常对照 FGFR3 第7外显子测序结果,c. 742位点碱基为C

### 3 讨论

TD(OMIM187600, OMIM187601)是常见的 致死性骨骼发育不良疾病,属常染色体显性遗传病, 发生率约为活产的 0.21~0.30/10 000<sup>[4]</sup>。主要表 现为严重短肢、短指/趾、头大、前额突出、鼻梁塌陷、 胸廓狭窄、小肋、腹膨隆、扁平椎及躯干长度正常 等<sup>[5,6]</sup>。根据放射学和临床特征,TD分为 2 类:TD I型长骨短而弯曲(外观似老式电话受话器),椎骨 严重扁平,不伴有三叶草形头颅;TD II 型具有典型 的三叶草形头颅,长骨短而弯曲及椎骨扁平均较 I 型为轻<sup>[7]</sup>。TD 属于致死性疾病,患者大多在围产 期死亡,存活者生存期很少超过 6 个月<sup>[8]</sup>。TD 患 儿的死因多是由于胸腔狭窄导致的肺发育不全或枕 骨大孔狭窄导致的中枢性呼吸抑制<sup>[9]</sup>。



图 2 FGFR3 基因第 7 外显子 c. 742 突变热点区的 HRM
Shifted Melting Curves 分析结果,灰色为野生型,
红色为 c. 742 C>T 杂合突变型



**图 3** FGFR3 基因第 7 外显子 c. 742 突变热点区的 HRM Difference Curves 分析结果,灰色为野生型, 红色为 c. 742 C>T 杂合突变型

既往研究已证实 FGFR3 基因的突变与致死性 软骨发育不良 I 型的发生密切相关。成纤维细胞生 长因子受体 3(fibroblast growth factor receptors 3, FGFR3)属酪氨酸激酶受体家族,是 1 种发育调节 跨膜受体。人类 FGFR3 基因位于 4p16.3,包括 19 个外显子和 18 个内含子,共 16.5 kb,FGFR3 蛋白 由 3 个细胞外免疫球蛋白样的 FGF 结合域(Ig I, IgⅡ,IgⅢ)、跨膜区(TM)和2个胞内酪氨酸激酶区 (TK1和TK2)组成。人类中FGFR3基因的突变 会引起一系列骨骼发育缺陷性疾病,如软骨发育不 全 (achondroplasia, ACH)、季 肋 发 育 不 全 (hypochondroplasia, HCH)和 TD 等。引起 TD Ⅱ 的 FGFR3 基因突变都是由酪氨酸激酶 Ⅱ 区(TK2) 的 1948 位核苷酸发生 A→G 突变所致, 使 650 位密 码子由 Lys 突变为 Glu(p. K650E)<sup>[10]</sup>。TD [ 患者 中已发现多种不同的点突变类型,大多数为单个氨 基酸突变为 Cvs,突变分部于 FGFR3 基因 3 种不同 的结构域,主要集中在 Ig Ⅱ和 Ig Ⅲ结构域的连接区 (Arg248Cys 和 Ser249Cys)、近膜区(Gly370Cys、 Ser371Cys 和 Tyr373Cys) 和羧基端(stop807Gly、 stop807Cys 和 stop807Arg)<sup>[11]</sup>。其中,73%的 TD I 是由 p. R248C、p. S249C 和 p. Y373C3 种错义突 变所致[12]。

TDI临床上最常见,多在孕期经超声检查发现。但该病几乎都是散发病例,产前难以进行有目的的筛选检查,而且单纯依靠超声表现有时很难与其他骨软骨发育不良病例鉴别诊断。对超声波常规检查发现严重断肢畸形、长骨弯曲、窄胸等征象者,应做基因检查,这样可以明确诊断,有助于临床处理。TDI是由FGFR3基因突变所致,目前至少已发现11种突变类型,其中p.R248C突变最常见,占50%<sup>[13]</sup>。在p.R248C突变的检测上,以往应用变性梯度凝胶电泳(DGGE)、限制性内切酶分析(RFLP)和直接测序等方法进行基因诊断<sup>[3,10,14,15]</sup>。但这些突变检测方法存在操作繁琐、费用高、诊断周期长等缺点。

HRM 分析是 1 种用于基因分型、突变扫描、甲 基化检测和序列匹配的新方法,具有简单、高效、廉 价和高通量等优点。尽管不同型号的仪器和染料对 其检测敏感性和特异性产生影响,但总体上优于其 他扫描方法<sup>[16]</sup>。其主要的特点是不需要对 PCR 产 物进行处理与分离,HRM 分析仪就可以直接进行 检测,不仅降低了污染风险,还节省时间和费用。整 个过程包括 PCR 扩增和 HRM 分析,用时不超过 2 小时。异源双链 DNA 在 HRM 分析仪升温过程 中,存在杂合突变位点的 DNA 片段先行解链,荧光 染料从局部解链的 DNA 分子上释放,导致在荧光 强度与时间曲线上出现变化,就可以判断出是否存 在突变位点。笔者应用 Lightscanner 96 扫描 FGFR3 基因第七外显子的 c. 742 位点区域,根据熔 解曲线形状不同成功地将 10 例 c. 742C>T(p. R248C)突变杂合子与 30 例野生型区分开。TD [ 的 FGFR3 基因 c. 742 位点的突变至今只发现 C> T杂合突变,未见纯合突变,因此本研究中应用 HRM分析法对其进行突变扫描的同时可以进行基 因分型。本研究结果显示,高分辨熔解曲线扫描检 测 p. R248C 突变的敏感性和特异性均为 100%, 证 实了熔解曲线用于杂合突变检测可获得极高的检出 率<sup>[17]</sup>。遗憾的是,由于 TD I 病例相对少见,本研究 没有对 c. 742 位点临近的 c. 746 C>G(p. S249C)突 变导致 TD I 的病例进行分析,没有获得 p. S249C 突变基因型的熔解曲线,无法分析此位点的检测效 果;但可以预计,p. S249C 突变的熔解曲线能与野生 型和 p. R248C 突变区分开。此外,由于 TD 都是由 点突变所致,还可针对导致 TD I 及 TD II 的 FGFR3 基因其他点突变位点设计引物应用 HRM 对其进行基因分型,如果区分不是很明显,可结合非 标记探针(unlabled probe)<sup>[18]</sup>或弹回探针(snapback primer)<sup>[19]</sup>方法进一步优化基因分型效果。

总之,对常规产前超声检查疑为 TD I 的病例, 临床上在产前取材排除染色体疾病的同时可行基因 诊断,以便尽早明确诊断,协助临床处理。HRM 分 析法是一种快速、高效、廉价、精确的基因诊断方法, 可用于 FGFR3 基因 p. R248C 突变的快速基因 检测。

#### 参考文献

- Graham R, Liew M, Meadows C, et al. Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting[J]. Clin Chem, 2005, 51: 1295-1298.
- [2] Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen[J]. Clin Chem, 2003, 49: 853-860.
- [3] Yu Yang, Dong-Zhi Li. FGFR3 Gene Mutations in Chinese Cases of Thanatophoric Dysplasia Type 1[J]. Fetal Diagn Ther, 2009, 26: 90-92.

- [4] Waller DK, Correa A, Tuan MVO, et al. The Population-Based Prevalence of Achondroplasia and Thanatophoric Dysplasia in Selected Regions of the US [J]. American Journal of Medical Genetics Part A, 2008, 146A: 2385-2389.
- [5] Schramm T, Gloning KP, Minderer S, et al. Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasias [J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2009, 34: 160-170.
- [6] Martinez-Frias ML, Frutos CA, Bermejo E, et al. Review of the recently defined molecular mechanisms underlying thanatophoric dysplasia and their potential therapeutic implications for achondroplasia[J]. Am J Med Genet Part A, 2010, 152A: 245-255.
- [7] Sahinoglu Z, Uludogan M, Gurbuz A. Prenatal diagnosis of thanatophoric dysplasia in the second trimester: ultrasonography and other diagnostic modalities [J]. Arch Gynecol Obstet, 2003, 1: 57-61.
- [8] 陆国辉. 产前遗传病诊断[M]. 广州: 广东科技出版社, 2002. 425-426.
- [9] Baker KM, Olson DS, Harding CO, et al. Long term survival in typical thanatophoric dysplasia type 1[J]. Am J Med Genet, 1997, 70, 427-436.
- [10] Tavormina PL, Shiang R, Thompson LM, et al. Thanatophoric dysplasia (type I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3[J]. Natre Genet, 1995, 9: 321-328.
- [11] Zoltan VAJO, Clair A, Francomano, et al. The Molecular and Genetic Basis of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Disorders: The Achondroplasia Family of Skeletal Dysplasias, Muenke Craniosynostosis, and Crouzon Syndrome with Acanthosis Nigricans [J]. Endocrine Reviews, 2000, 1: 23-39.
- [12] Rousseau F, El Ghouzzi V, Delezoide AL, et al. Missense FGFR3 mutations create cysteine residues in thanatophoric dwarfism type I (TD1) [J]. Hum Molec Genet, 1996, 5: 509-512.
- [13] Wilcox WR, Tavormina PL, Krakow D, et al. Molecular, radiologic, and histopathologic correlations in thanatophoric dysplasia[J]. Am J Med Genet, 1998, 78: 274-281.
- [14] Sawai H, Komori S, Ida A, et al. Prenatal diagnosis of Thanatophoric dysplasia by mutational analysis of the fibroblast growth factor receptor 3 gene and a proposed correction of previously published PCR results [J]. Prenat Diagn, 1999, 19: 21-24.
- [15] Mehmet S, Lihadh AG, Reyhanah AM, et al. Improved diagnosis of a common (R248C) in the human growth factor

receptor 3 (FGFR3) gene that causes type [ Thanatophoric dysplasia[J]. Clinical Biochemistry, 2003, 36: 151-153.

- [16] Chou LS, Lyon E, Wittwer CT. A comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a model [J]. Am J Clin Pathol, 2005, 124, 330-338.
- [17] Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of singlenucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis[J]. Clin Chem, 2004, 50: 1748-1754.
- [18] Matthew DP, Carl T, Wittwer. Closed-tube genotyping of apolipoprotein E by isolated-probe PCR with multiple unlabeled probes and high-resolution DNA melting analysis [J]. Bio Techniques, 2007, 43: 87-91.
- [19] Luming Zhou, Roscoe J, Hongzhe Lu, et al. Snapback Primer Genotyping with Saturating DNA Dye and Melting Analysis[J]. Clinical Chemistry, 2008, 54: 1648-1656.

编辑:肖云山 (收稿日期:2010-3-22)

### ・病例小测试・

孕妇 26 岁,孕 2 产 1,停经 6 月余,来院超声检查胎儿,发现双胎妊娠,胎儿性别均为 XX,羊水指数 230, 单一胎盘,双羊膜囊。请给与诊断。

(答案见本期)



图1 羊水最大深度 8 mm



图 2 一胎儿双顶径 50.6 mm,股骨长 38 mm 体重 394 g



图 3 羊水最大深度 130 mm;另一胎儿:双顶径 58.4 mm,股骨长 47.8 mm,体重 1 107 g

樊佳丽 摘编