

• 临床检验研究论著 •

MLPA 及测序技术在 DMD/BMD 家系分析中的应用

古 艳¹, 谢建生², 都 莉^{1△}, 韩春锡³, 万 琼¹

(1. 江西省南昌大学第三附属医院检验科, 江西南昌 330006; 2. 广东省深圳市妇幼保健院产前诊断中心, 广东深圳 518048; 3. 广东省深圳市儿童医院神经内科, 广东深圳 518048)

摘要:目的 运用 MLPA 技术和 DNA 及 cDNA 测序技术对 DMD/BMD 进行家系分析, 对患者、可能携带者基因诊断并探讨诊断流程的临床可行性。方法 对 2 个 DMD/BMD 家系中 6 例患者、13 例女性可能携带者、6 例男性家系成员、6 例女性和男性健康对照共 31 例采集外周血提取 DNA, 运用 MLPA 技术分析对以上 31 例的 DMD 基因 79 个外显子; 患者取右侧腓肠肌 10~30 mg 肌肉提取 RNA, 逆转录 cDNA; 分别进行 DNA 及 cDNA 序列测定, 测序结果与 MLPA 结果进行比较。结果 经 MLPA 检测, 家系 1 的 4 例患者均缺失 DMD 基因 Exon50, 家系 2 中 2 例患者均缺失 Exon43。以上结果经肌肉 cDNA 测序证实了相应外显子缺失。结论 MLPA 技术结合 DNA 及 cDNA 测序技术进行 DMD 家系分析具有可靠的临床应用价值。

关键词:肌营养不良; 核酸探针; 基因扩增; 系谱

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.24.014 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2012)24-2976-02

Genealogy analysis of duchenne muscular dystrophy by multiplex ligation-dependent probe amplification and sequencing technology

Gu Yan¹, Xie Jiansheng², Du Li^{1△}, Han Chunxi³, Wan Qiong¹

(1. Department of Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Central for Prenatal Diagnosis, Shenzhen Maternity and Child Healthcare Hospital, Shenzhen, Guangdong 518048, China; 3. Department of Neurology, Children's Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518048, China)

Abstract: **Objective** To analyze the DMD genealogy by MLPA technique in combine with DNA and cDNA sequencing technology. **Methods** There were 31 individuals accepted DMD gene diagnosis, including 6 DMD/BMD patients, 13 possible carriers and 6 healthy men in 2 DMD/BMD families, moreover 6 healthy women and men were selected from health examination people. Genomic DNA of the peripheral blood was extracted from the pedigrees' members with DMD. RNA was extracted from the bioptic muscle of the DMD patients and was reversed transcription to cDNA. Gene diagnosis was performed for theses pedigrees' members using MLPA technique, the mutation was analyzed applying with DNA and/or cDNA sequence technique. Simultaneously, compare the effects of these methods on detecting DMD gene deletion. **Results** 4 patients of the first DMD family was deleted exon50, and the fetus was confirmed no DMD exons deletion. 2 patients were found deletion exon43 in the second family. MLPA analysis, DNA and cDNA sequencing technology showed the same result. **Conclusion** MLPA in company with DNA and cDNA sequencing technology could applied into clinical gene diagnosis for DMD.

Key words: muscular dystrophies; nucleic acid probes; gene amplification; pedigree

杜氏肌营养不良症(DMD)是 1 种严重致死性 X 连锁隐性遗传病, 肌肉呈进行性萎缩, 外周血肌酸肌酶显著增高^[1], 其发病率为 1/3 500 活男婴。患者 2~5 岁起病, 20 岁前死亡。贝氏进行性肌营养不良(BMD)和 DMD 由同一基因突变所致, 其发病较晚且症状轻, 12 岁之后还能行走^[2]。本病女性携带者一般无症状, 其生育的男胎有 1/2 概率是患儿, 女胎有 1/2 概率是致病基因携带者。由于本病目前无有效的治疗方法, 所以检出携带者及对胎儿进行产前诊断是有效控制致病基因传递、防止患儿出生、降低发病率的主要措施。本研究采用多重连接依赖式探针扩增(MLPA)技术结合 DNA 和 cDNA 测序技术进行 DMD 家系分析, 对患者进行基因诊断。

1 资料与方法

1.1 一般资料 家系 1(图 1)是具有遗传早现表现的 BMD 家系, 患者 II 1、II 3 和 II 6 的发病年龄 30~35 岁, 先证者 IV 12 岁发病。家系 I 患者血清肌酸肌酶均增高, 以 IV 1 显著。家系 2(图 2)先证者 V 2 现 8 岁, 具有行走和上楼梯困难、下肢无力、鸭步步态、腓肠肌肥大等 DMD 典型的临床表现; 血清肌酸肌

酶显著增高; 肌电图和神经传导速度检查呈肌源性损害。回顾家系 2 五代人中 共有 8 位男性患者。

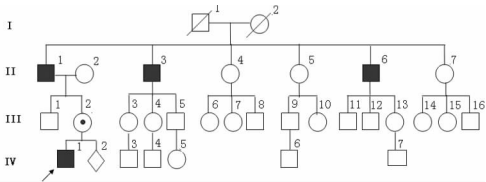


图 1 家系 I

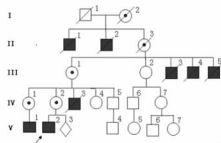


图 2 家系 II

1.2 方法

△ 通讯作者, E-mail: 0791duli@163.com.

1.2.1 DNA 和 RNA 标本获取 采集 6 例患者,13 例女性可能携带者、6 例男性家系成员、3 例女性健康对照和 3 例男性健康对照共 31 例的外周静脉血,常规酚氯法提取基因组 DNA。患者取右侧腓肠肌肉 10~30 mg,TRIzol 法提取 RNA,逆转录成 cDNA,测定浓度,−70 ℃ 保存备用。

1.2.2 MLPA 技术基因分析 用 MLPA(荷兰 MRC-Holland 公司)P034/P035 于分析 DMD 基因的 79 个外显子。运用 Fragment 模块分析 MLPA 图谱数据,比较 DMD/BMD 患者、双亲、可能携带者及正常对照的各个外显子的信号峰高,分析 DMD 基因外显子缺失、重复情况。

1.2.3 Gap-PCR 及 DNA/cDNA 测序 以管家基因 GAPdh 为模板设计引物,检测 cDNA 的质量及扩增效果。根据 MLPA 结果针对缺失部位进行引物设计,家系 2 患者缺失 Exon43,则在 DNA 水平 Intro43 和 Intro44 序列设计引物 Intro43 F 和 Intro44 R。家系 1 患者缺失 Exon50,则以 cDNA 为模板设计跨越 Exon50 序列的引物 Exon48 F 和 Exon51R;家系 2 患者缺失 Exon43,在 Exon42 和 Exon45 序列内设计引物 Exon42 F 和 Exon45 R 行跨越断裂点的 Gap-PCR。扩增产物用 2% 琼脂糖电泳,紫外成像系统分析结果。以切胶纯化的回收产物为模板,进行测序反应。

2 结 果

2.1 MLPA 检测结果 家系 I 中 4 例患者均缺失 DMD 基因 Exon50,母亲 Exon50 处信号比家系中正常女性及健康女性对照的信号低约 50%,为缺失 Exon50 杂合子。家系 II 中 V1 和 V2 检测图谱中 218bp 缺失提示缺失 Exon43;IV1 和 IV2 均为携带者,其 218 bp 处信号比家系中正常女性及健康女性对照的信号低约 50%。见图 3~6(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 DNA 和 cDNA 测序结果 家系 I 患者 IV1 扩增 cDNA 片段进行测序,见 Exon49 拼接 Exon51,Exon50 缺失。家系 II 患者 V2 扩增的 cDNA 片段进行测序,见 Exon42 拼接 Exon43 序列,Exon43 缺失。

3 讨 论

DMD 由人类 Dystrophin 基因突变引起,该基因定位于 Xp21.1-3,DNA 全长为 2.4 Mb, RNA 全长为 14.2 Kb,含有 79 个外显子,是目前发现的人类最大的基因^[3]。由于 DMD 基因内存在许多重复序列,并有许多断裂和交换热点,具有突变长度不一,突变位置无固定规律的特点,给临床检测难度大。目前国内常用多重 PCR 技术,针对 DMD 基因突变热点的十几个至二十几个外显子进行检测^[4-5],因其只能检测部分外显子及不能检测出女性携带者,给基因诊断和产前诊断带来很多不确定因素。本研究运用 MLPA 技术检测 DMD 基因全部外显子,并在 DNA 和 cDNA 水平上进行突变位点测序检测,对两家系中患者、携带者进行基因诊断^[6-8]。

MLPA 技术于 2002 年由荷兰的 Schouten 等设计发明,是一种高通量、针对待测核酸中靶序列进行定性和半定量分析技术^[9]。其原理是根据 DMD 每一个外显子的保守序列设计 A 探针和 M13 噬菌体衍生法制备的 B 探针,只有 A、B 探针连反应完成,才能进行 PCR 扩增并收集到相应探针的扩增峰,如果靶序列发生点突变、缺失或拷贝数目变化,那么相应探针的信号峰便会缺失、降低或增加,因此,根据信号峰的改变就可判断靶序列是否有点突变或拷贝数的异常。

本研究 DMD 家系 I 中 4 位患者 P034 检测结果均为 466 bp 片段峰信号缺失,提示 DMD 基因 Exon50 缺失;其母亲 466 bp 片段峰信号比家系中正常女性及健康对照女性的信号低约 50%,DMD 致病基因携带者可能性较大。家系 II 现存两患者均为 Exon43 缺失。由于以上两家系的 MLPA 检测结果均为单个外显子缺失,为了使诊断结果更为可靠^[10],进一步对 DMD 基因突变部位进行 DNA 序列测定,并在 cDNA 水平上设计 Gap-PCR,通过对突变外显子 cDNA 序列测定,证实 MLPA 检测结果。

本研究表明,运用 MLPA 技术快速对 DMD 基因 79 个外显子进行检测,根据基因突变位点设计引物并结合 DNA 及 cDNA 测序技术对 DMD 患者进行基因诊断;该检测流程和检测方案可应用于 DMD 临床基因诊断,具有临床实用性和可行性。

参考文献

- [1] Kingston HM, Thomas NS, Pearson PL, et al. Genetic linkage between Becker muscular dystrophy and a polymorphic DNA sequence on the short arm of the X chromosome[J]. J Med Genet, 1983,20(1):255-258.
- [2] Kingston HM, Sarfarazi M, Thomas NS, et al. Localisation of the Becker muscular dystrophy gene on the short arm of the X chromosome by linkage to cloned DNA sequences[J]. Hum Genet, 1984,67(1):6-17.
- [3] Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations; one gene, several proteins, multiple phenotypes[J]. Lancet Neurol, 2003,2(12):731-740.
- [4] Garcia-Linares C, Mercadé J, Gel B, et al. Applying microsatellite multiplex PCR analysis(MMPA) for determining allele copy-number status and percentage of normal cells within tumors[J]. PLoS One, 2012,7(8):e42682.
- [5] Wang Q, Li-Ling J, Lin C, et al. Characteristics of Dystrophin Gene Mutations Among Chinese Patients as Revealed by Multiplex Ligation-Dependent probe amplification[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2009,13(1):23-30.
- [6] Wu Y, Yin G, Fu K, et al. Gene diagnosis for nine Chinese patients with DMD/BMD by multiplex ligation-dependent probe amplification and prenatal diagnosis for one of them[J]. J Clin Lab Anal, 2009,23(6):380-386.
- [7] Li Q, Li SY, Hu DG, et al. Prenatal molecular diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy[J]. Beijing Da Xue Xue Bao, 2006,38(1):53-56.
- [8] Lalic T, Vossen RH, Coffa J, et al. Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA[J]. Eur J Hum Genet, 2005,13(11):1231-1234.
- [9] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. Nucleic Acids Res, 2002,30(12):e57.
- [10] Janssen B, Hartmann C, Scholz V, et al. MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls[J]. Neurogenet, 2005,6(1):29-35.