

• 论 著 •

荧光定量 PCR 快速筛查脊髓性肌肉萎缩症 smn1 致病基因携带者*

邓坤仪, 彭建明, 范汉恭, 李丽莲, 向燕群

(南方医科大学附属中山博爱医院检验科, 广东中山 528403)

摘要:目的 采用荧光定量聚合酶链式反应(PCR)技术检测脊髓性肌肉萎缩症(SMA)运动神经元生存基因 1(smnl)基因拷贝数,快速筛查 SMA 致病基因携带者。方法 采用荧光定量 PCR 技术检测经多重连接探针扩增技术(MLPA)确认的 21 例 SMA 携带者、79 例健康人群标本,及另 200 例本地人群标本。结果 21 例 SMA 携带者及 79 例健康人群标本检测结果与 MLPA 符合率均达 100.0%;200 例本地人群标本中,4 例 smnl 基因拷贝数为 1(为携带者),占 2.0%;173 例 smnl 基因拷贝数为 2,占 86.5%;23 例 smnl 基因拷贝数为 3,占 11.5%。结论 荧光定量 PCR 技术是 1 种快速、简便和准确的 SMA 致病基因携带者检测技术。

关键词: 荧光定量 PCR; 脊髓性肌肉萎缩症; 运动神经元生存基因 1

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.21.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)21-2983-02

Application of real-time quantitative polymerase chain reaction rapid screening in spinal muscular atrophy smn1 gene carrier*

DENG Kunyi, PENG Jianming, FAN Hangong, LI Lilian, XIANG Yanqun

(Department of Clinical Laboratory, Zhongshan Boai Hospital Affiliated of Southern Medical University, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

Abstract: Objective To explore the potential of real-time quantitative PCR rapid screening in detecting spinal muscular atrophy (SMA) smn1 gene copy numbers and SMA carrier. **Methods** Twenty one carriers and 79 healthy controls confirmed by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and 200 healthy adults were detected by real-time quantitative PCR. **Results** Coincidence rate of results of 21 carriers and 79 healthy controls detected by MLPA and real-time PCR were 100.0%. Of 200 healthy adults, 4 cases had 1 copy of smn1, which accounted for 2.0%. And 173 had 2 copy of smn1, which accounted for 86.5%. In addition, 23 had 3 copy of smn1, which accounted for 11.5%. **Conclusion** Real-time quantitative PCR is a fast, easy and accuracy technology for SMA carrier detection.

Key words: real-time quantitative PCR; spinal muscular atrophy; smn1

脊髓性肌肉萎缩症(SMA)是常染色体隐性遗传性神经肌肉病,居致死性常染色体隐性遗传病第 2 位,仅次于囊性纤维变性^[1],人群中发病率为 1/6 000~1/10 000。最近报道中国人群 SMA 致病基因的携带者频率为 1/42^[2]。位于染色体 5q11.2~q13.3 上的运动神经元生存基因(smnl)是 SMA 的主要致病基因,其具有 2 个高度同源的拷贝 smn1 和 smn2,两者仅有 5 个碱基差别,分别位于第 7、8 外显子和第 6、7 内含子中。既往研究已证实,90% 以上的 SMA 为 smn1 基因缺失所致^[3],检测 smn1 拷贝数可以确诊 SMA 患者和携带者^[4]。SMA 基因目前多采用聚合酶链式反应限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析技术及多重连接探针扩增技术(MLPA)进行诊断^[5-6],两者操作都比较繁琐,需要特定仪器及有经验的操作人员。本研究拟采用荧光定量聚合酶链式反应(PCR)技术,定量检测 smn1 基因拷贝数,可简单快速进行 SMA 携带者检测。

1 资料与方法

1.1 一般资料 从中山市博爱医院检验科收集 2015 年 1~6 月乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝外周全血标本 300 例。男性 167 例,女性 133 例;年龄 18~51 岁,平均(31.6±10.8)岁;其中 100 例经 MLPA 确认 smn1 拷贝数,21 例为 SMA 携带者,79 例为健康人群;另 200 例标本为随机收集,用于分析本地区表

观健康人群 SMA 致病基因携带者频率调查。所有标本采用传统酚-氯仿法抽提外周血基因组 DNA。

1.2 方法 扩增 smn1 及清蛋白 12 号外显子的引物由赛默飞世尔中国有限公司合成,扩增 smn1 引物序列如下:上游引物 R1,5'-CCT TTT ATT TTC CTT ACA GGG TTT C-3';下游引物 R2,5'-GAT TGT TTT ACA TTA ACC TTT CAA CTT TT-3'。采用人血清清蛋白 12 号外显子作为参比基因,扩增清蛋白引物序列如下:上游引物 R3,5'-AGC TAT CCG TGG TCC TGA AC-3;下游引物 R4,5'-TTC TCA GAA AGT GTG CAT ATA TCT G-3'。采用罗氏 LightCycler480 扩增仪进行检测,总反应体积 20 μL,10 μL LightCycler480 SYBR Green I Master,20 ng 基因组 DNA(8 μL),分别在不同反应管中加入 0.1 μmol/L 和 0.5 μmol/L smn1 和清蛋白引物。扩增条件为 95 ℃ 预变性 10 min,然后 95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,共 40 个循环。每个标本平行测定 3 次。

1.3 统计学处理 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 数学模型进行结果计算。在每次检测待测标本时,同时检测 1~3 例健康标本,分别计算待测标本及健康标本待测基因与参比基因 Ct 的差值(ΔCt),再将待测标本的 ΔCt 减去健康标本的 ΔCt ,得到 $\Delta\Delta Ct$,计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 即可得到待测标本相对于健康标本目的基因的相对拷贝数, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 结果为 1.0 即为健康人群,为 0.5 即为 SMA 致病

* 基金项目:广东省中山市科技计划项目(20132A026)。

作者简介:邓坤仪,女,副主任技师,主要从事临床医学检验方面的研究。

基因携带者,为 0 即为 SMA 患者。

2 结 果

2.1 已知基因型标本荧光定量 PCR 检测结果 经 MLPA 检测基因型已知的 21 例 SMA 携带者标本及 79 例健康对照标本,通过荧光定量 PCR 分析检测结果与 MLPA 法符合率达 100.0%,见表 1。

表 1 已知基因型标本荧光定量 PCR 检测 smn1 结果

标本	n	smn1 基因 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值	推算拷贝数(n)
携带者	21	0.52±0.13(0.38~0.58)	1
健康人群	79	1.14±0.26(0.76~1.67)	2~3

2.2 本地人群标本 smn1 基因拷贝数结果 200 例本地人群标本中,smn1 基因拷贝数为 1 的有 4 例,其 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值为 0.39~0.56,携带者频率为 2.0%;其余标本 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值为 0.87~1.69,绝大部分 smn1 基因拷贝数为 2,见表 2。

表 2 本地人群标本荧光定量 PCR 检测 smn1 结果

推算拷贝数	smn1 基因 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值	n	频率(%)
1	0.52±0.11(0.39~0.56)	4	2.0
2	1.14±0.13(0.87~1.25)	173	86.5
3	1.54±0.14(1.43~1.69)	23	11.5
合计	—	200	100.0

注:—表示无数据。

3 讨 论

根据 SMA 发病年龄和病情严重程度不同分为 I、II、III 型;其中 I 型 SMA,患儿于出生后 6 个月内发病,不能独坐,多于 2 岁内死于呼吸功能不全;II 型 SMA,出生后 6~18 个月发病,患儿可独坐,但不能独立行走,大多能存活 2 年以上;III 型 SMA,出生 18 个月发病,呈慢性进展,可以保持独立行走和站立的能力,一般在成年后死亡。近年来有人提出存在 IV 型(或称成人型)SMA,此型 SMA 非常少见,病情轻微。4 种 SMA 都可能由 smn1 发生缺失、重排或小的基因内突变所致。大部分健康人 smn1 拷贝为 2,约 5%的健康个体有 3 个 smn1 拷贝,携带者 smn1 拷贝数为 1^[7]。smn2 是与 smn1 高度同源的基因,是 SMA 患者临床表型的调节基因,其拷贝数越多,产生的全长转录产物也越多,可部分补偿 SMN 蛋白不足,减轻 SMA 患者临床表现,也可预测 SMA 患儿病程进展^[8]。提高 smn2 产生全长 SMN2 蛋白量是日后对 SMA 进行基因治疗的研究方向。

荧光定量 PCR 对于 smn1 基因的检测,主要是比较标本中 smn1 基因与健康对照的相对量以推定其拷贝数,所以采用无需标准品的相对定量方法。由于缺失 1 个 smn1 基因标本与未缺失标本之间基因的拷贝数差异仅为 1 倍,体现在 Ct 值上的变化非常小,需要恰当的数据处理模式将这种微小的差异检测出来。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 数据处理模式,每次检测标本时同时检测 1~3 例健康对照标本,分别计算待测标本及健康对照标本的 ΔCt (目的基因减去参比基因 Ct 值),将待测标本 ΔCt 减去健康对照标本 ΔCt ,得到 $\Delta\Delta Ct$,然后计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,得到目的基因相对参比基因的拷贝数。这种目的基因相对定量模式,无需制备标准曲线,可灵敏地检测出基因拷贝数的差异。

笔者筛查了 200 例本地人群标本,发现 4 例 smn1 基因拷贝数为 1 的 SMA 携带者,与之前关于中国人群 SMA 致病基因携带者频率的报道相近^[1,9],smn1 基因拷贝数为 2 的标本有 173 例,占 86.5%,smn1 基因拷贝数为 3 的有 23 例,占 11.5%。

由于患者来源限制,本研究没有检测 SMA 患者标本,也没有检测 SMA 患儿父母的标本。本研究采用与 MLPA 进行比较的方法来验证当前方法。对经 MLPA 法检测基因型已知的 21 例 SMA 携带者标本及 79 例健康人群标本,荧光定量 PCR 分析所检测的结果与 MLPA 的相符率达 100.0%。MLPA 是 1 种高通量、针对待测核酸中靶序列进行定性和半定量分析的新技术,该技术可对待测基因所有外显子的缺失及重复状况进行检测,结果准确,目前国内外众多学者均将其用于 SMA 的基因检测^[6,10]。不过,其方法存在操作繁琐,对操作人员要求较高等缺陷。荧光定量 PCR 方法操作简单,可以大批量进行检测,结果准确。

SMA 目前尚无有效的治疗手段,病情严重,将对患者家庭和社会带来沉重负担。本院负责全市大多数人口的婚前医学检查和孕前优生健康检查,探索 1 个适合本地区的 SMA 筛查方法,并通过检测 SMA 携带者,对高危夫妇进行婚姻及生育指导,对有效降低 SMA 发病率、提高人口素质有重要意义。

参考文献

- [1] Labrum R, Rodda J, Krause A. The molecular basis of spinal muscular atrophy(SMA)in South African black patients[J]. Neuromuscul Disord,2007,17(9/10):684-692.
- [2] Zhu S, Xiong F, Chen YJ, et al. Molecular characterization of SMN copy number derived from carrier screening and from core families with SMA in a Chinese population[J]. Eur J Hum Genet,2010,18(9):978-984.
- [3] Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene(SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy(SMA)[J]. Hum Mutat,2000,15(3):228-237.
- [4] Prior TW. Spinal muscular atrophy diagnostics[J]. J Child Neurol,2007,22(8):952-956.
- [5] Liu WL, Li F, He ZX, et al. Molecular analysis of the SMN gene mutations in spinal muscular atrophy patients in China[J]. Genet Mol Res,2013,12(3):3598-3604.
- [6] 丁宇,余永国,叶晓来,等.多重连接依赖性探针扩增方法在脊髓性肌萎缩症基因诊断中的应用[J]. 临床儿科杂志,2014,30(11):1001-1005.
- [7] 李秀玲,贺静,朱宝生.脊肌萎缩症的基因诊断和产前诊断研究进展[J]. 中国妇幼保健杂志,2011,26(14):220-223.
- [8] Cuscó I, Barceló MJ, Rojas-García R, et al. SMN2 copy number predicts acute or chronic spinal muscular atrophy but does not account for intrafamilial variability in siblings[J]. J Neurol,2006,253(1):21-25.
- [9] Fang P, Li L, Zeng J, et al. Molecular characterization and copy number of smn1, smn2 and naip in Chinese patients with spinal muscular atrophy and unrelated healthy controls[J]. BMC Musculoskelet Disord,2015,16(1):11.
- [10] 张文慧,曹延延,宋昉,等.运用 MLPA 技术分析脊髓性肌萎缩症患儿 SMN1 基因的部分缺失[J]. 中华医学杂志,2015,95(6):430-434.