

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01279

MELAS 和 MERRF 综合征相关 mtDNA 突变位点检测集成芯片的建立

陈刚^{1,2}, 李伟¹, 杜卫东¹, 曹慧敏², 汤华阳¹, 唐先发¹, 孙中武³, 赵辉², 金庆辉², 赵建龙², 张学军¹

1. 安徽医科大学省部共建教育部重要遗传病基因资源利用重点实验室, 安徽省基因研究重点实验室, 合肥 230032;
2. 中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 上海 200050;
3. 安徽医科大学第一附属医院神经内科, 合肥 230022

摘要: 文中建立了一种新型的寡核苷酸芯片, 用于线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作(Mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes, MELAS)和肌阵挛性癫痫伴发不规律红纤维(Myoclonic epilepsy with ragged red fibers, MERRF)线粒体 DNA 所有已知突变位点的集成检测。将 31 对 allele 位点特异性的寡核苷酸探针包被在醛基修饰的载玻片表面, 以多重不对称 PCR 方法制备 Cy5 荧光标记靶基因。利用此芯片对 5 例 MELAS 患者、5 例 MERRF 患者及 20 例健康对照进行筛查, 结果发现, MELAS 患者均为 *MT-TI* 基因 A3243G 突变; 在 MERRF 患者组, *MT-TK* 基因 A8344G 突变 4 例, T8356C 突变 1 例; 健康对照组均未发现 31 种相关 mtDNA 突变。芯片检测与 DNA 测序结果完全一致。结果表明, 这种寡核苷酸芯片可以对 MELAS 和 MERRF 综合征已知突变位点进行同步快速检测, 具有较高的灵敏度和特异性。这一模式的基因芯片经过适当改装后也可用于其他人类线粒体疾病的基因诊断。

关键词: 寡核苷酸芯片; 线粒体 DNA; 突变; MELAS 综合征; MERRF 综合征

Development of a DNA biochip for detection of known mtDNA mutations associated with MELAS and MERRF syndromes

CHEN Gang^{1, 2}, LI Wei¹, DU Wei-Dong¹, CAO Hui-Min², TANG Hua-Yang¹, TANG Xian-Fa¹, SUN Zhong-Wu³, ZHAO Hui², JIN Qing-Hui², ZHAO Jian-Long², ZHANG Xue-Jun¹

1. Key Lab of Gene Resource Utilization for Severe Hereditary Diseases of Ministry of Education & Key Lab of Genome Research of Anhui Province, Anhui Medical University, Hefei 230032, China
2. Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China

收稿日期: 2008-03-10; 修回日期: 2008-05-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30470591), 安徽省自然科学基金项目(编号: 050430716)和安徽省“十五”高校学科拔尖人才基金项目资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470591), Natural Science Foundation of Anhui Province (No.050430716) and 10th Five-Years Science Foundation for Outstanding Scholars in Universities of Anhui Province]

作者简介: 陈刚(1984-), 男, 安徽人, 硕士生, 研究方向: 生物芯片。E-mail: gang_7717@hotmail.com
李伟(1982-), 女, 安徽人, 硕士生, 研究方向: 分子生物学。E-mail: liwei2006@sjtu.edu.cn
陈刚, 李伟并列第一作者。

通讯作者: 杜卫东(1958-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 线粒体疾病分子遗传学。E-mail: weidongdu@hotmail.com
赵建龙(1969-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 生物微系统。E-mail: jlzhao@mail.sim.ac.cn

3. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

Abstract: We developed an oligonucleotide biochip for synchronous multiplex detection of 31 known mitochondrial DNA mutations associated with MELAS (Mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes) and MERRF (Myoclonic epilepsy with ragged red fibers). Allele-specific oligonucleotide probes were covalently immobilized on aldehyde modified glass slides, and then hybridized with Cy5-labeled DNA fragments amplified from sample DNAs by a multiplex asymmetric PCR (MAP) method. Five patients with MELAS, 5 patients with MERRF and 20 healthy controls were investigated using the oligonucleotide biochip. The results showed that all the cases with MELAS had an A3243G mutation in the *MT-TL1* gene. In the MERRF group, 4 cases were found to be an A8344G mutation and 1 case was a T8356C mutation, and both mutations were in the *MT-TK* gene. In the healthy controls, none of the 31 related mutations was found. The results of the DNA biochip were consistent with those by DNA sequencing. Clearly, the DNA biochip combined with MAP method would become a valuable tool in multiplex detecting of the point mutations in mtDNA leading to MELAS and/or MERRF syndrome. Moreover, this biochip format could be modified to extend to the screening scope of SNPs for any other human mitochondrial diseases.

Keywords: oligonucleotide biochip; mtDNA; mutation; MELAS syndrome; MERRF syndrome

线粒体脑肌病是一大类以线粒体功能和形态异常为特征的异质性疾病, 损害常累及多组织和器官, 但以中枢神经系统、骨骼肌和心肌等高需能部位为主^[1,2]。线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作 (Mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes, MELAS) 和肌阵挛性癫痫伴发不规则红纤维 (Myoclonic epilepsy with ragged red fibers, MERRF) 是两种最常见的由线粒体 DNA 点突变引起的线粒体脑肌病, 通常按母系遗传方式传播给子代^[3-5]。MITOMAP 数据库^[4] (<http://www.mitomap.org>) 报道与 MELAS 或 MERRF 相关的 mtDNA 点突变数量呈逐年增多的趋势, 其中与 MELAS 相关的突变位点已经超过 20 种, 与 MERRF 相关的突变位点有 10 余种。加之 MELAS、MERRF 综合征的早期临床表征并不典型, 有时同一患者二种疾病表型可以合并存在, 形成所谓 MERRF/MELAS 重叠综合征 (MERRF/MELAS overlap syndrome), 如 mtDNA A3243G、T8356C 和 G12147A 突变均可以引起 MERRF/MELAS 重叠综合征^[6-8], 给常规临床诊断带来诸多困难。因此, 建立敏感、特异、简便的诊断方法尤为重要。

本文研制一种基于 PCR-序列特异寡核苷酸探针法 (PCR-SSOP) 原理的微阵列芯片 (即 MELAS-MERRF 芯片, MELAS-MERRF biochip), 结合多重不对称 PCR (Multiplex asymmetric polymerase chain reaction, MAP) 方法, 用以对 MELAS 和/或 MERRF 综合征患者相关突变位点进行快速检测。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源

收集安徽医科大学第一附属医院 MELAS 和 MERRF 患者标本各 5 例, 诊断根据临床、呼吸链酶活性的生化测定、病理形态学分析等^[2,9], 另取 20 例健康人血样作为对照。

1.1.2 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa)、基因组 DNA 提取试剂盒 (Qiagen)、点样液 (TeleChem International)、杂交液 (DIG Easy Hyb, Roche)、芯片点样仪 (PROSYS 5510A, Cartesian Tech.)、GenePix 4000B 激光共聚焦扫描仪 (Axon Instruments Inc.)、醛基修饰载玻片 (CEL Associates, Inc.)、超纯水系统 (Simplicity TM, MILIPORE)、凝胶成像分析系统 (Alphamager TM 2200, Alpha Innotech Corporation)。

1.2 方法

1.2.1 引物与探针的设计

根据修正版剑桥 mtDNA 参考序列 (revised Cambridge Reference Sequence, rCRS)^[10] 和文献报道的 31 种与 MELAS 和 MERRF 综合征相关的 mtDNA 点突变, 采用 Primer 5.0 版软件分别设计 PCR 引物和探针, 设计后引物用 NCBI BLAST 在线软件进行比对以排除非特异性序列。引物及探针由宝生物

工程(大连)有限公司合成, PCR 引物分为普通引物(无 Cy5 荧光标记)和 Cy5 标记引物两组, 二者碱基序列相同(表 1)。普通引物用于 PCR 条件摸索及 DNA 测序, Cy5 标记引物用于扩增芯片杂交靶分子, 所有探针(表 2)的 5 端均连接 15 个 Poly T 并进行氨基修饰。

1.2.2 样本 DNA 的制备

利用 Qiagen 公司试剂盒(FlexiGene DNA kit)抽提 MELAS、MERRF 综合征患者及健康对照组 DNA。

1.2.3 芯片与电泳灵敏度比较

选择 MERRF 综合征中最有代表性的突变位点 T8344C 野生型探针进行芯片灵敏度试验。通过点样仪将探针点阵于醛基修饰的载玻片表面, 点样浓度为 12.5 $\mu\text{mol/L}$, 点样量为 0.7 nL/探针点, 置于 70% 的相对湿度、室温条件下 48 h 固定, 取出后置沸水浴中 15 s, 空气中充分干燥。取不同量的荧光标记 PCR 产物(采用表 1 引物 2F 和 2R 扩增)与芯片杂交。杂交用荧光标记 PCR 产物量分别为 0.055 ng、0.11 ng、0.32 ng、0.95 ng、2.84 ng、8.52 ng 和 25.56 ng。制作靶分子量与荧光强度坐标图。以高于阴性对照荧光信号 2 倍 cut-off 值(荧光均值加上 2SD)作为阳性。

电泳灵敏度试验采用不同量上述 PCR 产物分别在 2% 琼脂糖凝胶电泳, 得到电泳图谱, 利用凝胶成像系统的分析软件计算出电泳图中各条带的灰度值, 制作靶分子量与荧光强度的坐标图。

表 1 PCR 引物

Table 1 PCR primers

| 引物名称 Primer name | 序列 Sequence (5' 3') | 5 端起始点 5' end begins | PCR 产物长度 PCR product length (bp) |
|---------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| 1F | TTGGCGGTATGCACTTTTAAC | 407 | 241 |
| 1R | TGTTTATGGGGTGATGTGAGC | 647 | |
| 2F | CTGAAATCTGTGGAGCAAACC | 8 175 | 384 |
| 2R | GCAATGAATGAAGCGAACAG | 8 558 | |
| 3F | ACCAATCCTACCTCCATCG | 14 366 | 494 |
| 3R | CCAAGGAGTGAGCCGAAGT | 14 859 | |
| 4F | TCTTCAATCAGCCACATAGCC | 11 624 | 587 |
| 4R | TCTCGGTAAATAAGGGGTCGT | 12 210 | |
| 5F | CAGCCGCTATTAAAGGTTCGT | 3 017 | 821 |
| 5R | TGGCAGGAGTAATCAGAGGTG | 3 837 | |
| 6F | AGTCGTAACATGGTAAGTG | 1 558 | 157 |
| 6R | GTTGTCTGGTAGTAAGGTG | 1 714 | |
| 7F | CACTTTACATCCAAACATC | 9 882 | 256 |
| 7R | GTTGTGGTAGTCAAAATGT | 10 137 | |
| 8F | ACTAATAAGTGGCTCCTT T | 3 768 | 740 |
| 8R | ATGGTAGAGTAGATGACGG | 4 507 | |
| 9F | TCATCTTCCTAATTACCAT | 12 701 | 919 |
| 9R | AGAATTATTCGAGTGCTAT | 13 619 | |

1.2.4 MELAS-MERRF 芯片的制备

去离子水稀释探针, 与点样液等量混匀, 使终浓度为 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 。通过点样仪按 MELAS-MERRF 芯片布阵图(图 1)点阵于醛基修饰的载玻片表面, 其

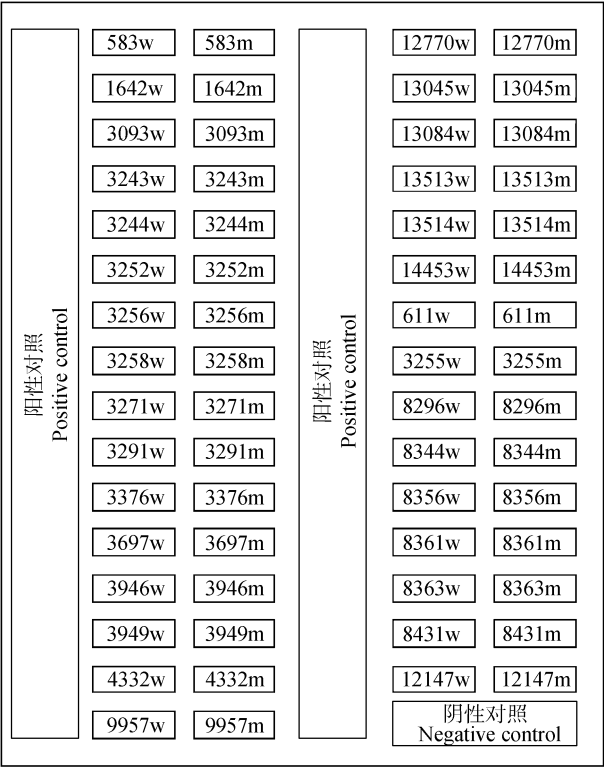


图 1 MELAS-MERRF 芯片布阵图

Fig.1 Layout for MELAS-MERRF biochip

表 2 MELAS-MERRF 芯片探针与序列

Table 2 Probes for MELAS-MERRF biochip

| 探针名称 Probe name | 编号 Code | 所在链 Strand | 序列(5'-NH ₂ -(T) ₁₅ -xxx xxx xxx xxx-3') Sequence(5'-NH ₂ -(T) ₁₅ -xxx xxx xxx xxx-3') | 长度 Length (bp) |
|--------------------|------------|---------------|--|-------------------|
| 583 w | 1 | L | GGTAAGCTACATAAACTG | 18 |
| 583 m | 2 | L | GGTAAGCTATATAAACTG | 18 |
| 1642 w | 3 | L | TGAAATCTCCTAAGTGT | 17 |
| 1642 m | 4 | L | TGAAATCTTCTAAGTGT | 17 |
| 3093 w | 5 | L | AGAAACCGACCTGG | 14 |
| 3093 m | 6 | L | AGAAACCGACCTGG | 14 |
| 3243 w | 7 | L | ACCGGGCTCTGCCAT | 15 |
| 3243 m | 8 | L | ACCGGGCCCTGCCA | 14 |
| 3244 w | 9 | L | ACCGGGCTCTGCCAT | 15 |
| 3244 m | 10 | L | ACCGGGTTCTGCCA | 14 |
| 3252 w | 11 | L | TTATGCGATTACCG | 14 |
| 3252 m | 12 | L | TTATGCGACTACCG | 14 |
| 3256 w | 13 | L | GTTTTATGCGATTACC | 16 |
| 3256 m | 14 | L | GTTTTATACGATTACCG | 17 |
| 3258 w | 15 | L | GTTTTATGCGATTACC | 16 |
| 3258 m | 16 | L | AGTTTTGTGCGATTAC | 16 |
| 3271 w | 17 | L | CTGACTGTAAAGTTTTAAG | 19 |
| 3271 m | 18 | L | GACTGTAAGGTTTTAAGT | 18 |
| 3291 w | 19 | L | GAAGAGGAATTGAACC | 16 |
| 3291 m | 20 | L | AGAAGAGGGATTGAAC | 16 |
| 3376 w | 21 | L | TTCGTTCCGGTAAGC | 14 |
| 3376 m | 22 | L | TTTCGTTTGGTAAGC | 15 |
| 3697 w | 23 | H | CCTGATCGGCGCAC | 14 |
| 3697 m | 24 | H | CCTGATCAGCGCAC | 14 |
| 3946 w | 25 | L | GGCGTATTTCGATGTT | 15 |
| 3946 m | 26 | L | GCGTATTTGATGTTG | 15 |
| 3949 w | 27 | L | GGCGTATTTCGATGTT | 15 |
| 3949 m | 28 | L | GGCGTCTTCGATGT | 14 |
| 4332 w | 29 | H | TTATTTCTAGGACTATGAG | 19 |
| 4332 m | 30 | H | TTATTTCTAAGACTATGAG | 19 |
| 9957 w | 31 | L | CATACAGAAATAGTCAAA | 18 |
| 9957 m | 32 | L | CATACAGAAAGTAGTCAAA | 18 |
| 12770 w | 33 | L | CTACGCCCTCTCAG | 14 |
| 12770 m | 34 | L | CTACGCCCCCTCAG | 14 |
| 13045 w | 35 | L | CTTCTATGGCTGAGG | 15 |
| 13045 m | 36 | L | CCTTCTAGGGCTGA | 14 |
| 13084 w | 37 | L | TATAGTGCTTGAGTGGA | 17 |
| 13084 m | 38 | L | TATAGTGCTAGAGTGGA | 17 |
| 13513 w | 39 | H | CTCCAAAGACCACAT C | 16 |
| 13513 m | 40 | H | CTCCAAAACCACAT | 15 |
| 13514 w | 41 | H | CTCCAAAGACCACATC | 16 |
| 13514 m | 42 | H | TCCAAAGGCCACATC | 15 |
| 14453 w | 43 | L | GCGATGGCTATTGA | 14 |
| 14453 m | 44 | L | GCGATGGTTATTGA | 14 |
| 611 w | 45 | L | AAACATTTTCAGTGTATTGC | 20 |
| 611 m | 46 | L | TAAACATTTTATGTATTG | 20 |
| 3255 w | 47 | L | GTTTTATGCGATTACC | 16 |
| 3255 m | 48 | L | TTTTATGTGATTACCG | 16 |
| 8296 w | 49 | L | TTACAGTGGGCTCTA | 15 |
| 8296 m | 50 | L | TTACAGCGGGCTC | 14 |
| 8344 w | 51 | L | GGTGTGGTTCTCTT | 15 |
| 8344 m | 52 | L | GGTGTGGCTCTCT | 14 |
| 8356 w | 53 | L | TTCAGTGTAAGAGGT | 16 |
| 8356 m | 54 | L | TTCACTGTAGAGAGG | 16 |
| 8361 w | 55 | L | GGCATTTCACTGTAA | 15 |
| 8361 m | 56 | L | GGCATTTCACTGTAA | 15 |
| 8363 w | 57 | L | GGCATTTCACTGTAA | 15 |
| 8363 m | 58 | L | GGGCATTTTACTGT | 14 |
| 8431 w | 59 | L | GGTGATGAGGAATAGT | 16 |
| 8431 m | 60 | L | GGTGATAGGAATAG | 16 |
| 12147 w | 61 | H | GTAAATATAGTTTAACCAA | 19 |
| 12147 m | 62 | H | GTAAATATAATTTAACCAA | 19 |

注: w 代表野生型探针, m 代表突变型探针; 编号 1~44 号为 MELAS 探针, 45~62 号为 MERRF 探针; H 表示探针位于 mtDNA 重链上, L 表示探针位于 mtDNA 轻链上。

Notes: w represents for wild type probes, while m represents for mutant type probes. Probe codes of 1 to 44 are related to MELAS syndrome, while 45 to 62 are related to MERRF syndrome. H means the probe is on the heavy strand of mtDNA, and L means the probe is on the light strand of mtDNA.

中野生型和突变性探针各点 3 个平行点, 阳性对照探针为各探针的混合液, 阴性对照探针为等浓度点样液, 点样量为 0.7 nL/探针点。点样后芯片置于 70% 相对湿度, 室温固定 48 h, 取出后沸水浴 15 s, 空气中充分干燥, 4℃ 保存。

1.2.5 MAP 方法制备荧光标记杂交靶分子

每例样本 DNA 分成两组分别扩增, 一组为 5 重不对称 PCR (引物序列见表 1 中引物对 1~5), 另一组为 4 重不对称 PCR (引物序列见表 1 中引物对 6~9), 在同一热循环下分别进行 MAP 扩增, 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 35 s, 60℃ 45 s, 72℃ 90 s, 循环 40 次; 72℃ 延伸 10 min。2% 琼脂糖凝胶电泳验证。扩增体系包括: 1.5 U TaKaRa 公司耐热 DNA 聚合酶, 1×PCR 反应缓冲液, dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 200 μmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 样本 DNA 100 ng, 上游和下游引物 0.04~0.4 μmol/L 不等。如果探针与重链互补则上游引物用 Cy5 标记, 上游引物浓度高于下游引物浓度, 如果探针与轻链互补则下游引物用 Cy5 标记, 下游引物浓度高于上游引物, 此外, 不同引物对之间由于扩增效率不同, 浓度也有所差异, 因此, 整个扩增过程为不对称扩增, 调整 PCR 扩增体积至 25 μL。将样本 DNA 两组 MAP 产物等体积混合, 作为 MELAS-MERRF 芯片杂交靶基因。

1.2.6 芯片杂交及结果扫描

取 5 μL 步骤 1.2.5 制备的 MELAS-MERRF 芯片杂交靶基因与 10 μL 杂交液混匀, 95℃ 热变性 10 min, 立即冰浴 5 min, 取出 10 μL 加样于 MELAS-MERRF 芯片, 加盖玻片, 置 35℃ 湿盒中杂交 60 min。30 于洗液 1 (2×SSC, 0.1% SDS) 中漂洗 10 min, 洗液 2 (0.2×SSC, 0.1% SDS) 中漂洗 5 min, 氮气吹干。用 GenePix 4000B 扫描仪在 635 nm 处扫描, 扫描强度设为 70%, PMT 设为 700。通过圈点提取各点平均荧光信号强度值, 配合其配套软件分析, 最终获得检测结果, 以诊断比值 [Ratio = (野生型探针信号强度 - 背景信号强度) / (突变型探针信号强度 - 背景信号强度)] 作为突变存在与否的判断标准^[11], Ratio ≥ 3 时设为野生型, Ratio = 0.3 设置为均质性突变体, 0.3 < Ratio < 3 设为异质性突变体, 伪彩色图用 Scanarray 4000 软件提取。

1.2.7 DNA 测序

在与步骤 1.2.5 相同的热循环条件下, 采用普通 PCR 分别扩增 9 个目的 DNA 片段 (引物分别为表 1 引物对 1~9), 送由上海英骏生物技术有限公司进行测序。

2 结果

2.1 芯片灵敏度实验结果

图 2 所示, 芯片检测靶分子的灵敏度为 0.11 ng (图 2A), 琼脂糖凝胶电泳检测靶分子的灵敏度为 2.84 ng (图 2, B 和 C), 芯片检测 Cy5 标记靶分子的灵敏度明显高于琼脂糖凝胶电泳。

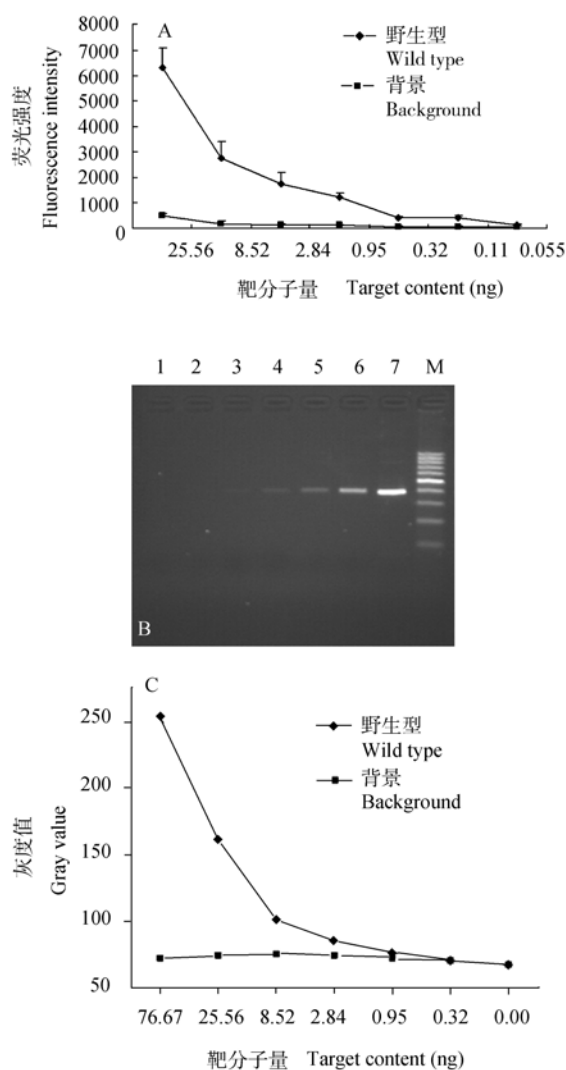


图 2 芯片与琼脂糖凝胶电泳灵敏度实验

A: 不同含量的靶分子对杂交荧光强度的影响 (mean ± SD); B: 不同含量的靶分子的琼脂糖凝胶电泳图 (1~7: 加入的靶分子量分别为 0.00 ng、0.32 ng、0.95 ng、2.84 ng、8.52 ng、25.56 ng 和 76.67 ng; M: 100 bp DNA ladder); C: B 图中各 DNA 条带的灰度值。

Fig. 2 Sensitivity experiment of oligonucleotide biochip and agarose gel electrophoresis

A: Effect of different amount of DNA targets on hybridization signal intensities of the oligonucleotide biochip (mean ± SD); B: Agarose gel electrophoresis of different amount of DNA targets (The amounts of target DNA added to lane 1~7 are 0.00 ng, 0.32 ng, 0.95 ng, 2.84 ng, 8.52 ng, 25.56 ng and 76.67 ng respectively; M: 5 μL 100 bp DNA ladder); C: Gray values of different DNA bands on figure 2B.

2.2 MELAS-MERRF 芯片多重不对称 PCR 琼脂糖凝胶电泳

多重不对称 PCR 琼脂糖凝胶电泳图所示(图 3), 每个条带丰度有所差异, 但清晰可辨, 没有非特异性扩增条带产生。其中, 泳道 M 为 100 bp DNA ladder; 泳道 1 为一组五重不对称 PCR, 条带大小从下到上依次为 241 bp(1F_1R)、384 bp(2F_2R)、494 bp(3F_3R)、587 bp(4F_4R)和 821 bp(5F_5R); 泳道 2 为一组四重不对称 PCR, 条带大小从下到上依次为 157 bp(6F_6R)、256 bp(7F_7R)、740 bp(8F_8R)和 919 bp(9F_9R)。

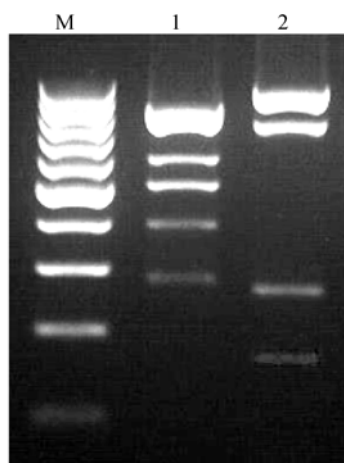


图 3 MELAS-MERRF 芯片多重不对称 PCR 电泳图

M: 100 bp DNA ladder; 1: 表 1 中引物 1F_1R、2F_2R、3F_3R、4F_4R 及 5F_5R 的产物; 2: 表 1 中引物 6F_6R、7F_7R、8F_8R 及 9F_9R 的产物。

Fig. 3 Multiplex Asymmetric PCR for amplification of hybridization targets for MELAS-MERRF biochip

M: 100 bp DNA ladder; Lane 1 indicates the production of PCR 1 using primers of 1F_1R, 2F_2R, 3F_3R, 4F_4R and 5F_5R in Table 1; Lane 2 indicates the production of PCR 2 using primers of 6F_6R, 7F_7R, 8F_8R and 9F_9R in Table 1.

2.3 临床样本芯片检测与突变位点 DNA 测序验证

利用 MELAS-MERRF 集成芯片对 MELAS 患者进行检测, 发现 5 例病例均为 *MT-TI* 基因 A3243G 异质性突变; 在 MERRF 患者中发现 *MT-TK* 基因 A8344G 同质性突变 4 例, 占 MERRF 患者的 80%, T8356C 异质性突变 1 例, 占 MERRF 患者的 20%。二组病例中均未见其他位点突变; 在健康对照组, 所有待检位点均为野生型。芯片检测与 DNA 测序结果完全吻合(图 4)。

3 讨论

临床上对 MELAS 和 MERRF 综合征的诊断多

依赖于临床指征和病理形态学检验, 间或结合生化与组化检测, 但由于 MELAS 和 MERRF 综合征的早期临床指征常并不典型, 加之相应生化与组化检测的特异性及敏感性均较低, 常常影响这二种综合征的临床确诊与治疗。因此, 从分子遗传学角度对 MELAS 或 MERRF 综合征相关 mtDNA 突变位点进行筛查, 将有助于了解疾病的确切性质, 并能为患者的诊断、治疗和遗传学咨询提供有益线索。目前已经建立了不少 mtDNA 突变体检测方法, 如限制性酶切片长度多态性(Restriction fragment length poly morphism, RFLP)、单链构象多态性(Single-strand conformation polymorphism, SSCP)、位点特异性寡核苷酸斑点印记(Allele-specific oligonucleotide dot blot)、温度梯度电泳(Temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)、瞬时温度梯度电泳(Temporal temperature gradient gel electrophoresis, TTGE)、变性梯度凝胶电泳(Denaturant gradient gel electrophoresis, DGGE)和变性高效液相色谱(Denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)等, 但在实际运用中这些技术仍存在一定的局限性, 如 RFLP 花费高、工作量大且有些重要突变位点因不在所用限制性内切核酸酶的识别范围而不能被检测到, 其他方法相对于 RFLP 要复杂, 更主要的是, 这些方法大多一次只能针对一个或几个突变位点进行检测, 检测结果常需 DNA 测序验证^[12]。寡核苷酸芯片技术可同时对多个突变位点及大批量的样本进行平行筛选, 具有快速、简便和耗费低廉等优点, 已被证明适合于疾病相关突变位点的检测^[11, 13~16]。

我们根据文献报道的与人类线粒体病 MELAS 和 MERRF 综合征相关的 mtDNA 突变位点, 设计 31 对等位基因特异性寡核苷酸(Allele specific oligonucleotide, ASO)探针, 并将这些探针固定于芯片表面, 结合 MAP 方法扩增荧光标记靶分子, 一次杂交可以检测几乎所有已知与 MELAS 或 MERRF 综合征相关的突变位点, 从 PCR 扩增到完成芯片检测仅需 5 h, 大大缩短了突变位点的筛查时间。另外, 寡核苷酸芯片采用自动化点样仪制作, 可以根据实际需要灵活设计探针, 具有成本低、操作简单、重复性好、灵敏度高等特点^[14]。MELAS-MERRF 芯片的建立基本上满足了对 MELAS 和/或 MERRF 综合征临床基因诊断和鉴别诊断的需要。

文献报道^[4, 17~19], 80% 以上的 MELAS 病例由 *MT-TL1* 基因 3243A>G 点突变引起, 80% 左右的

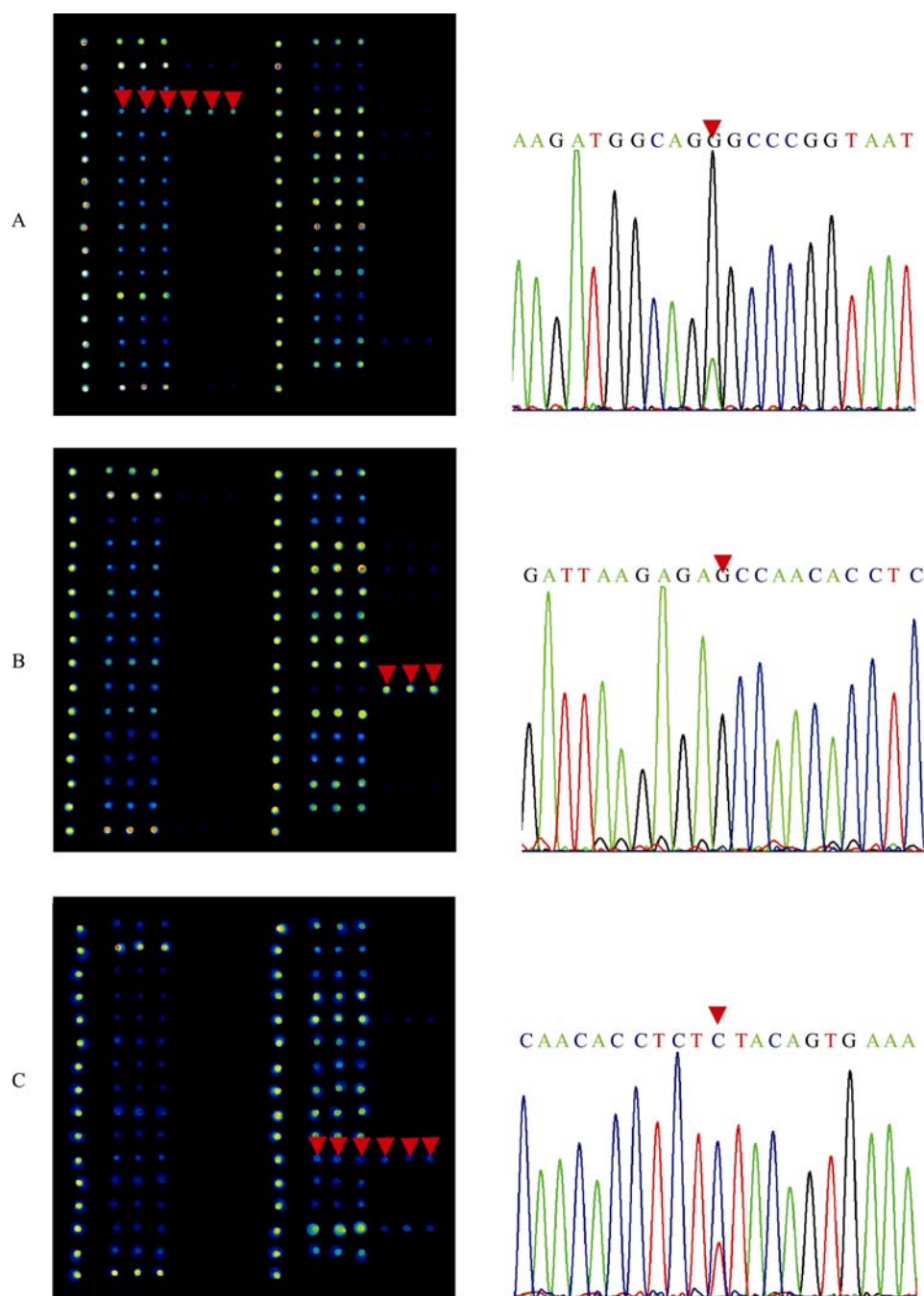


图 4 芯片检测图与相应突变位点 DNA 测序图

A: MELAS 患者芯片检测图与突变位点 DNA 测序图(3243A>G 异质性突变); B: MERRF 患者芯片检测图与突变位点 DNA 测序图(8344A>G 均质性突变体); C: MERRF 患者芯片检测图与突变位点 DNA 测序图(8356T>C 异质性突变体)。图中红色箭头揭示突变位点发生的部位。

Fig. 4 Results of oligonucleotide biochip and DNA sequencing

A: Oligonucleotide biochip assay and DNA sequencing in a MELAS patient with a 3243A>G heteroplasmic mutation; B: Oligonucleotide biochip assay and DNA sequencing in a MERRF patient with a 8344A>G homoplasmic mutation; C: Oligonucleotide biochip assay and DNA sequencing in a MERRF patient carrying a 8356T>C heteroplasmic mutation. The red arrows in the figures above indicate where mutant loci happen.

MERRF 病例则由 *MT-TK* 基因 8344A>G 点突变所致。本研究芯片筛查发现, 5 例 MELAS 患者全部为 3243A>G 突变。MERRF 患者中 8344A>G 突变 4 例, 占 80%, 8356T>C 突变 1 例, 占 20%。二种病例均未筛查到其他位点突变。利用这一 MELAS-MERRF 芯片可以深入调查 MELAS 和 MERRF 综合征相关突变位点在我国人群中的分布状况。这一模式的基因芯片经过适当改装后也可用于其他人类线粒体疾病的基因诊断。

参考文献(References):

- [1] DiMauro S, Moraes CT. Mitochondrial encephalomyopathies. *Arch Neurol*, 1993, 50(11): 1197–1208.
- [2] DiMauro S, Tay S, Mancuso M. Mitochondrial encephalomyopathies: diagnostic approach. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1011: 217–231.[\[DOI\]](#)
- [3] DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med*, 2003, 348(26): 2656–2668.[\[DOI\]](#)
- [4] Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Navathe SB, Baldi P, Wallace DC. MITOMAP: a human mitochondrial genome database–2004 update. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(Database issue): D611–613.[\[DOI\]](#)
- [5] CHEN Gang, DU Wei-Dong, CAO Hui-Min. Mitochondrial DNA mutations and related human diseases. *Hereditas(Beijing)*, 2007, 29(11): 1299–1308.[\[DOI\]](#)
陈刚, 杜卫东, 曹慧敏. 线粒体 DNA 突变与相关人类疾病. *遗传*, 2007, 29(11): 1299–1308.
- [6] Campos Y, Martin MA, Lorenzo G, Aparicio M, Cabello A, Arenas J. Sporadic MERRF/MELAS overlap syndrome associated with the 3243 tRNA(Leu(UUR)) mutation of mitochondrial DNA. *Muscle Nerve*, 1996, 19(2): 187–190.
- [7] Zeviani M, Muntoni F, Savarese N, Serra G, Tiranti V, Carrara F, Mariotti C, DiDonato S. A MERRF/MELAS overlap syndrome associated with a new point mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Lys) gene. *Eur J Hum Genet*, 1993, 1(1): 80–87.
- [8] Melone MA, Tessa A, Petrini S, Lus G, Sampaolo S, di Fede G, Santorelli FM, Cotrufo R. Revelation of a new mitochondrial DNA mutation (G12147A) in a MELAS/ MERRF phenotype. *Arch Neurol*, 2004, 61(2): 269–272.[\[DOI\]](#)
- [9] Munnich A, Rustin P. Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet*, 2001, 106(1): 4–17.[\[DOI\]](#)
- [10] Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*, 1999, 23(2): 147.[\[DOI\]](#)
- [11] Du W, Marsac C, Kruschina M, Ortigao F, Florentz C. Functionalized self-assembled monolayer on gold for detection of human mitochondrial tRNA gene mutations. *Anal Biochem*, 2003, 322(1): 14–25.[\[DOI\]](#)
- [12] Wong LJ, Boles RG. Mitochondrial DNA analysis in clinical laboratory diagnostics. *Clin Chim Acta*, 2005, 354(1-2): 1–20.[\[DOI\]](#)
- [13] Erdogan F, Kirchner R, Mann W, Ropers HH, Nuber UA. Detection of mitochondrial single nucleotide polymorphisms using a primer elongation reaction on oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(7): E36.[\[DOI\]](#)
- [14] Zhou W, Du W, Cao H, Zhao J, Yang S, Li W, Shen Y, Zhang S, Du W, Zhang X. Detection of gyrA and parC mutations associated with ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* by use of oligonucleotide biochip technology. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(12): 5819–5824.[\[DOI\]](#)
- [15] Tejedor D, Castillo S, Mozas P, Jimenez E, Lopez M, Tejedor MT, Artieda M, Alonso R, Mata P, Simon L, Martinez A, Pocovi M. Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Chem*, 2005, 51(7): 1137–1144.[\[DOI\]](#)
- [16] Waldmuller S, Freund P, Mauch S, Toder R, Vosberg HP. Low-density DNA microarrays are versatile tools to screen for known mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mutat*, 2002, 19(5): 560–569.[\[DOI\]](#)
- [17] Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA (Leu) (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, 1990, 348(6302): 651–653.[\[DOI\]](#)
- [18] Hammans SR, Sweeney MG, Brockington M, Morgan-Hughes JA, Harding AE. Mitochondrial encephalopathies: molecular genetic diagnosis from blood samples. *Lancet*, 1991, 337(8753): 1311–1313.[\[DOI\]](#)
- [19] Noer AS, Sudoyo H, Lertrit P, Thyagarajan D, Utthanaphol P, Kapsa R, Byrne E, Marzuki S. A tRNA(Lys) mutation in the mtDNA is the causal genetic lesion underlying myoclonic epilepsy and ragged-red fiber (MERRF) syndrome. *Am J Hum Genet*, 1991, 49(4): 715–722.