

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00600

多重连接探针扩增方法在假肥大型肌营养不良产前基因诊断中的应用

王谦^{1,2}, 金春莲², 林长坤², 崔婉婷², 麻宏伟³, 武盈玉³

1. 中国医科大学高职学院, 沈阳 110001;
2. 中国医科大学遗传教研室, 沈阳 110001;
3. 中国医科大学盛京医院儿科, 沈阳 110003

摘要: 假肥大型肌营养不良(Duchenne/Becker muscular dystrophy, DMD/BMD)是一种由于 *DMD* 基因突变导致的 X 连锁隐性致死性遗传病。目前没有有效的治疗方法。为建立一种既可以对携带者进行检测又可以进行产前基因诊断的方法, 文章联合应用多重连接探针扩增技术(Multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)和短串联重复序列(Short tandem repeats, STR)为遗传标记连锁分析的方法对 26 例有高风险再生育患儿的假肥大型肌营养不良家系的孕妇通过羊水穿刺进行产前基因诊断。26 例进行产前基因诊断的羊水标本中有 7 例诊断为男性患儿, 4 例诊断为女性携带者。MLPA 可以作为筛查 *DMD* 基因缺失和重复突变的首选方法。联合应用 MLPA 和 STR 连锁分析, 可以提高假肥大型肌营养不良的产前基因诊断率。

关键词: 假肥大型肌营养不良; *DMD* 基因; 多重连接探针扩增; 产前诊断

Prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy by multiplex ligation-dependent probe amplification

WANG Qian^{1,2}, JIN Chun-Lian², LIN Chang-Kun², CUI Wan-Ting², MA Hong-Wei³, WU Ying-Yu³

1. Senior Professional Institute, China Medical University, Shenyang 110001, China;
2. Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, China;
3. Department of Pediatrics, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China

Abstract: Duchenne/Becker muscular dystrophy (DMD/BMD) is an X-linked lethal recessive disease caused by mutation in the *DMD* gene. There is no efficient treatment for this serious and disabling disease. We established a combination method to detect carriers and performed prenatal diagnosis. Using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and linkage analysis of short tandem repeats (STR) methods, 26 prenatal diagnosis were performed for pregnancies at risk of having a DMD/BMD baby through amniocentesis. Seven out of 26 male fetuses were affected and the pregnancies were terminated. Four out of 26 female fetuses were found to be carriers. MLPA can be the method of choice for initial screening of DMD/BMD patients for deletions and duplications mutations. When combined with STR-based analysis, it can improve the rate of DMD/BMD prenatal diagnosis.

Keywords: Duchenne/Becker muscular dystrophy; *DMD*; MLPA; STR; prenatal diagnosis

收稿日期: 2008-11-18; 修回日期: 2009-04-09

基金项目: 国家十一五攻关课题项目(编号: 2006BAI05A08)资助

作者简介: 王谦(1977-), 女, 博士, 讲师, 专业方向: 遗传病的分子遗传学研究及产前基因诊断。E-mail: wangqian529@163.com

通讯作者: 金春莲(1945-), 女, 教授, 博士生导师, 专业方向: 遗传病的分子遗传学研究及产前基因诊断。E-mail: jchlcmu@126.com

假肥大型肌营养不良症是一种严重的神经肌肉疾病,分为DMD (Duchenne muscular dystrophy) 和BMD (Becker muscular dystrophy), 均是由于DMD基因突变所致^[1]。DMD是最常见的X-连锁隐性致死性遗传病, 新生男性婴儿中的发病率为 1/3500。BMD是一种较轻的神经肌肉疾病, 发病率约为 1/12000, 患者病情变化比DMD多, 从16岁就丧失行走能力到50、60岁才出现临床症状, 严重程度不同^[2]。

鉴于本病至今没有有效的治疗方法, 因此高效、准确的DMD致病基因诊断, 携带者检测, 产前诊断及正确的遗传咨询是预防本病的关键。Schouten等^[3]在MAPH(Multiplex amplifiable probe hybridisation)技术的基础上改进并设计了MLPA(Multiplex ligation-dependent probe amplification), 其原理是利用可与样本DNA正确杂交并被连接酶连接的探针进行扩增和定量分析的技术。MLPA是对于缺失和重复突变最有效的检测技术。因此本研究拟用MLPA方法筛查DMD患者, 对缺失和重复突变的患者和携带者做出诊断。但此方法对一些微小缺失、重复、点突变有漏诊的可能。国内外学者不断发现DMD基因两端及基因内的短串联重复序列(Short tandem repeat, STR)也称微卫星序列, 具有广泛的多态性, 可以作为遗传标记进行连锁分析^[4]。我室金春莲等也应用提供信息量较高的多态位点建立起DMD/BMD家系单体型连锁分析的方法, 这种方法尤其适用于用MLPA方法没有检测到缺失和重复突变的DMD家系^[5]。本研究共选择了7个多态性较高的基因内微卫星标记, 包括易发生基因交换重组的5'和3'端以及DMD基因缺失突变高发发热区的STR, 依次是5' DYS、intron 1、intron 44、intron 45、intron 49、intron 50、3' (CA)_n, 进行连锁分析, 对产前诊断中MLPA检测结果阴性, 而有阳性家族史的家系进行进一步筛查。

1 材料和方法

1.1 材料

26例假肥大型肌营养不良家系外周血来自2005年至2007年在中国医科大学盛京医院儿科就诊的患者及其父母。来自上述家庭的26例孕妇(均为生育过假肥大型肌营养不良患儿的母亲)羊水穿刺标本, 其中有10例有家族史。诊断标准依赖体格

检查、家族史、肌酸激酶水平、发病年龄、疾病的进展情况等。所有标本使用均经患者知情并同意。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取

饱和氯化钠法^[6]提取26个家系患者及其父母的基因组DNA, 煮沸法^[7]提取孕妇羊水细胞DNA。紫外分光光度计测定DNA纯度和浓度。将DNA浓度控制在50~200 ng/ μ L。

1.2.2 MLPA检测

MLPA 假肥大型肌营养不良检测试剂盒购自荷兰MRC-Holland, 80对探针被分成SALSAP034和P035两组。所有的反应在热盖温度为105℃的PCR仪上进行。

(1) DNA变性和SALSA MLPA探针杂交。反应体系如下: 稀释DNA样品(50~200 ng)加TE至5 μ L。98℃加热5 min, 开盖之前冷却到25℃。分别加入1.5 μ L P034/P035探针混合物, 和1.5 μ L MLPA buffer。小心混匀, 95℃孵育1 min, 60℃杂交16 h。

(2) 连接反应。反应体系如下: 温度降至54℃, 加32 μ L Ligase-65混合物。54℃孵育15 min, 98℃加热5 min。

Ligase-65混合物包括: 3 μ L Ligase-65 bufferA, 3 μ L Ligase-65 bufferB, 25 μ L水, 1 μ L Ligase-65。

(3) PCR反应总体积为50 μ L, 反应体系如下: 新管中混合4 μ L的10 \times SALSA PCR buffer, 26 μ L水, 10 μ L MLPA连接反应产物。于60℃时加10 μ L酶混合物。

酶混合物包括: 2 μ L SALSA PCR引物, 2 μ L SALSA酶溶解buffer, 5.5 μ L水, 0.5 μ L SALSA聚合酶。

PCR反应条件为: 95℃ 30 s、60℃ 30 s、72℃ 60 s循环35次, 72℃延伸20 min。

1.2.3 毛细管电泳检测(ABI 3130XL)

1 μ L PCR产物与0.5 μ L Genescan-Rox 500和8.5 μ L去离子甲酰胺混合, 在36 cm长的毛细管上电泳1 h, 温度控制在60℃。由于有内标作为参照, 每个峰都可以代表一个外显子。每次MLPA检测都包括一个正常的对照样本, 检测结果都经过两次独立的实验证实。

1.2.4 统计分析

依据产品说明书, 每个探针的相对信号强度的

计算方法是实际测定的峰面积(A_s)与所有 45 个峰面积(A_s)之比,然后再用这个值(A_s/A_s)与正常对照的相应探针的相对峰面积(A_c/A_c)进行比对所得到的比值。为了自动化的分析这个比值,我们用 Coffalyser 软件进行分析。由于 *DMD* 基因位于 X 染色体上,男性患者如果缺失一个或多个外显子,经 MLPA 检测将导致相应外显子产物缺失,即缺失外显子的信号全部消失。重复区表现出信号成倍增加。女性携带者,相应的外显子缺失信号将降低 35%~55%,而重复突变时相应的信号将升高 30%~55%。

1.2.5 连锁分析

当用 MLPA 方法进行产前筛查没有检测出突变,而有家族史时,应进行 STR 连锁分析。本研究选用 X 染色体上的 7 个 STR 位点,包括 5 DYS, intron 1, intron 44, intron 45, intron 49, intron 50, 3 (CA) $_n$ 多态。

(1) PCR 反应体积为 25 μ L, 反应体系如下: 基因组 DNA 100 ng, 每对引物 0.5 μ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1 U。反应条件: 95 5 min, 95 30 s, 58 30 s, 72 60 s 循环 32 次, 72 延伸 4 min。

(2) 电泳: 采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳, 应用 6% 的变性胶。预电泳, 电压 300 V, 大约 30 min。取扩增产物加去离子甲酰胺 95 变性 5 min, 取 15~18 μ L 上样液, 将样品全部加入加样孔中, 电泳 4 h 左右。电泳缓冲液为 TBE, 电泳后进行银染色并干燥保存。

(3) 根据片段大小对家系成员进行连锁分析, 判断羊水 DNA 样本是否携带风险染色体。

2 结果与分析

2.1 MLPA 检测结果

首先用 MLPA 对 26 个家系先证者进行筛查后发现 16 例外显子缺失, 1 例外显子重复。在这 17 个家系的羊水标本中检测出 4 例男性患儿和 2 例女性携带者, 结果见表 1, 图 1。其余 9 个 MLPA 方法未检测出 *DMD* 基因突变的家系继续用连锁分析来判断羊水标本是否携带风险染色体。

2.2 STR 连锁分析结果

9 例 *DMD* 先证者用 MLPA 方法筛查没有发现突变的家系, 继续用 STR 进行连锁分析, 结果检测出 3 例患儿, 2 例携带者, 4 例正常胎儿。如图 2 从 5 DYS

位点和 intron50 位点可以判断患儿携带了母亲的哪一条 X 染色体, 而这两个位点羊水标本携带的母亲的 X 染色体都与患儿不一致, 可以初步判断该羊水为正常男性胎儿。

3 讨论

自 90 年代中期以来, 我室开始对 *DMD*/*BMD* 高风险胎儿开展产前诊断工作, 建立了一系列产前诊断方案, 包括性别诊断、多重 PCR、STR 连锁分析等。

表 1 17 例经 MLPA 检测的羊水产前诊断和临床结果

患者编号	先证者 MLPA 检测结果	胎儿			
		性别	MLPA 结果	诊断结果	临床结果
1	Del52	男性	阴性	低风险	出生
2	Del52	男性	阴性	低风险	出生
3	Del45-50	男性	Del45-50	受累	流产
4	Del46-47	男性	阴性	低风险	出生
5	Dup50-54	男性	Dup50-54	受累	流产
6	Del35	男性	Del35	受累	流产
8	Del45-46	男性	阴性	低风险	出生
9	Del46-50	男性	阴性	低风险	出生
10	Del45	男性	阴性	低风险	出生
11	Del51-54	女性	阴性	低风险	出生
12	Del45-50	女性	45-50 外显子峰值信号降低	携带者	出生
13	Del46-50	女性	46-50 外显子峰值信号降低	携带者	出生
14	Del46-50	女性	阴性	低风险	出生
15	Del45-54	男性	Del45-54	受累	流产
16	Del8-13	男性	阴性	低风险	出生
17	Del48-53	男性	阴性	低风险	出生

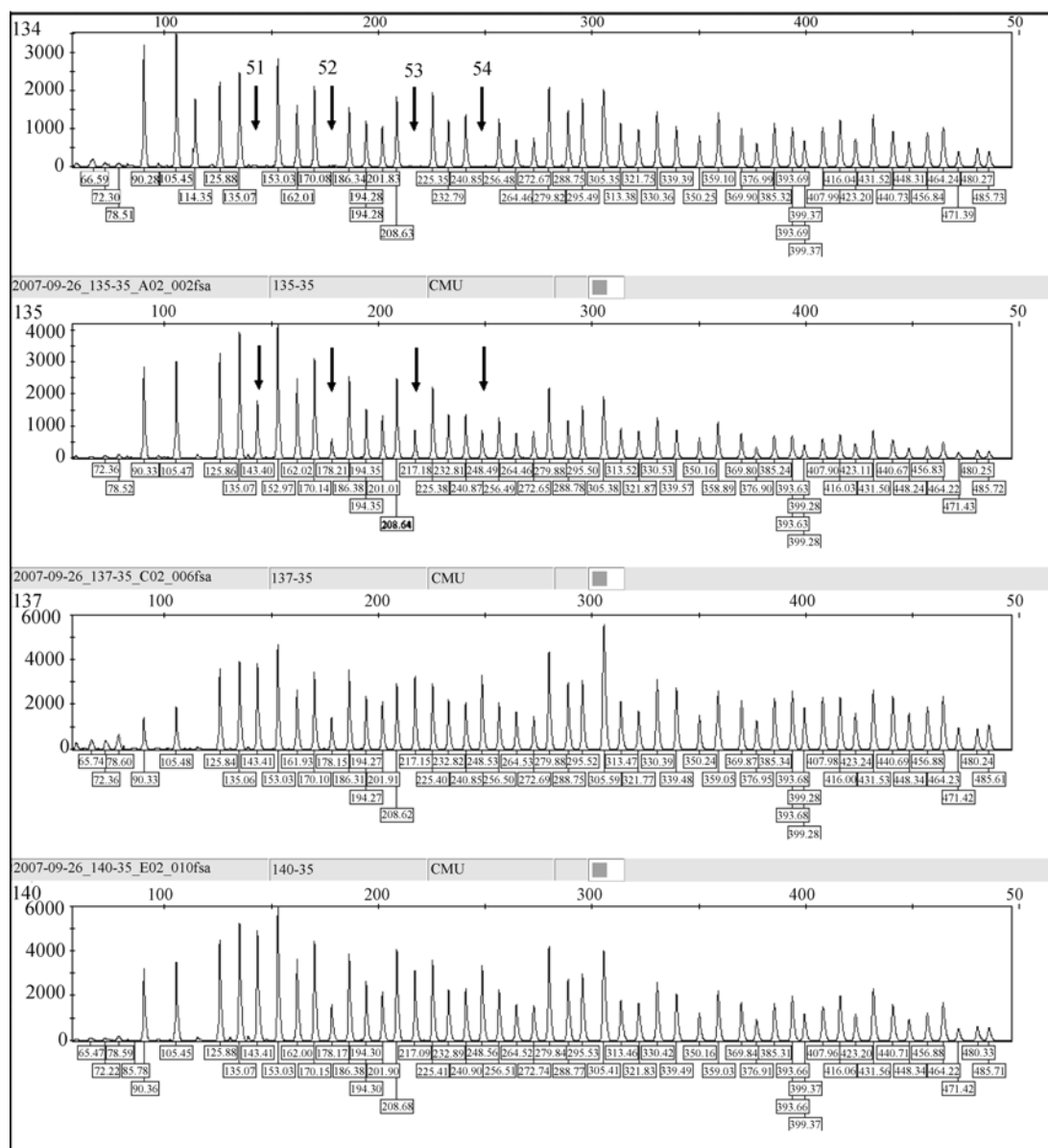


图 1 家系 11 MLPA 扩增后毛细管电泳检测结果

134 为 DMD 患儿, 外显子 51, 52, 53, 54 缺失; 135 为患儿的携带着母亲, 箭头代表与患儿相对应的外显子; 137 为正常女性对照; 140 为羊水 DNA 标本, 诊断为正常女性胎儿。

这次我们建立一种新方法 MLPA 来进行 DMD/BMD 产前筛查。与 MAPH 相似^[8], MLPA 在筛查 DMD/BMD 基因突变方面有独特的优势。除了操作简便外, 还可以克服其他常用技术的一些缺点。例如, Southern 印迹技术需要同位素, DNA 用量大^[9]。最常用的多重 PCR 技术, 有报道说可以检测到缺失热点的 18 个外显子, 能检测出 98% 的突变^[10], 但这种方法与 MLPA 相比, 准确性有限。

MLPA 的原理是一种定量和半定量技术, 不仅

能检测缺失突变, 也能检测基因拷贝数。MLPA 可以同时进行的 DMD 基因 79 个外显子缺失/重复突变的筛查, 所有反应在两个管中进行。针对每个外显子设计两条探针, 其 5 端和 3 端都连接一条通用引物, 这样采用同一 PCR 引物, 使得连接的探针片段在同一 PCR 条件下得到均一的扩增, 重复性好, 从而可进行定量分析。并且杂交探针涉及 DMD 基因所有外显子, 不单纯是缺失热点区, 这样就避免遗漏新发生缺失或重复突变的区域。因此即使在无先证者

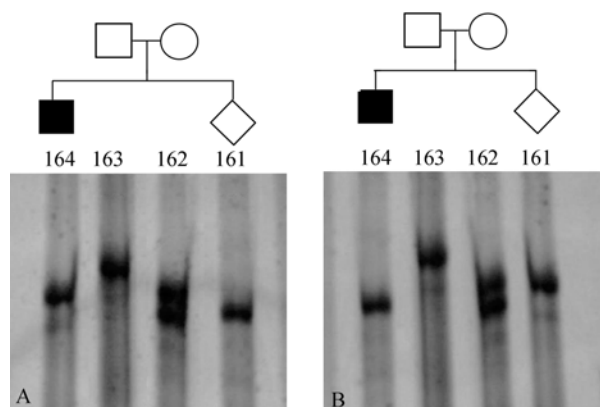


图 2 家系 21 的 5'DYSII(A)和 intron 50 (B)的 STR 连锁分析结果

164 为 DMD 患儿; 163 为患儿父亲; 162 为患儿携带者母亲; 161 为羊水 DNA 标本, 诊断为正常男性胎儿。

或发生新突变时, 也能对样品做产前诊断和携带者检测。在编号 11 这个家系中, 我们可以看到编号 135 的患儿母亲在相应的患儿缺失的外显子处毛细管电泳峰高降低 50%, 可诊断为 DMD 基因外显子 51、52、53、54 缺失的携带者。26 例羊水 DNA 样本中经 MLPA 检测后有 17 例可以得到明确的诊断结果。9 例未发现突变, 可能是存在一些我们没有发现的小突变, 或者这些突变位于内含子区域。我们的研究表明, MLPA 不仅是检测 DMD 基因缺失和重复突变的有效手段, 而且在检测女性携带者上灵敏性也要超过荧光定量 PCR。这里需要指出的是当 MLPA 检测发现单个外显子缺失时, 需要用另外一种方法来验证。因为可能是由于点突变位于探针的连接点上而妨碍探针与靶序列的杂交, 产生了假阳性的结果^[11]。

假肥大性肌营养不良患者的基因突变主要有基因缺失型和非缺失型, 以及其它的少见类型。缺失型的检测在国内外报道比较多, 但对非缺失型的检测尚缺少直观而有效的方法。本研究选用 X 染色体 DMD 基因上的 7 个 STR 多态位点对 9 例 MLPA 检测没有发现突变的胎儿进行产前基因诊断。诊断出 3 例男性胎儿和 2 例女性携带者。MLPA 方法检测到 4 例女性胎儿中有 2 例为携带者, 2 例为正常女性, 我们用 STR 连锁分析方法得到同样结果, 提示了 MLPA 方法在携带者检测上的可靠性。

结合 MLPA 和 STR 多态位点联合进行假肥大性肌营养不良产前基因诊断是一种简便, 可靠的方法, 并且两种方法联合应用可以提高诊断率。通过产前基因

诊断可以有效的减少患儿出生, 达到优生优育的目的。

参考文献(References):

- [1] Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol*, 2003, 2(12): 731-740. [\[DOI\]](#)
- [2] Moser H. Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum Genet*, 1984, 66(1): 17-40. [\[DOI\]](#)
- [3] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(12): e57. [\[DOI\]](#)
- [4] Florentin L, Bili C, Kekou K, Tripodis N, Mavrou A, Metaxotou C. Mapping dystrophin gene recombinants in Greek DMD/BMD families: low recombination frequencies in the STR region. *Hum Genet*, 1995, 96(4): 423-426.
- [5] 金春莲, 武盈玉. 应用二核苷酸重复多态 DMD 产前基因诊断研究. *中国医科大学学报*, 1999, 28(3): 186-188.
- [6] Nasiri H, Forouzandeh M, Rasaei MJ, Rahbarizadeh F. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *J Clin Lab Anal*, 2005, 19(6): 229-232. [\[DOI\]](#)
- [7] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 1997, 350(9076): 485-487. [\[DOI\]](#)
- [8] White S, Kalf M, Liu Q, Villerius M, Engelsma D, Kriek M, Vollebregt E, Bakker B, van Ommen GJ, Breuning MH, den Dunnen JT. Comprehensive detection of genomic duplications and deletions in the DMD gene, by use of multiplex amplifiable probe hybridization. *Am J Hum Genet*, 2002, 71(2): 365-374. [\[DOI\]](#)
- [9] Tuffery S, Chambert S, Bareil C, Sarda P, Coubes C, Echenne B, Demaille J, Claustres M. Mutation analysis of the dystrophin gene in Southern French DMD or BMD families: from Southern blot to protein truncation test. *Hum Genet*, 1998, 102(3): 334-342. [\[DOI\]](#)
- [10] Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(23): 11141-11156. [\[DOI\]](#)
- [11] Wang Q, Li-Ling J, Lin CK, Wu Y, Sun K, Ma H, Jin C. Characteristics of dystrophin gene mutations among Chinese patients as revealed by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). *Genet Test Mol Biomarker*, 2009, 13(1): 23-30. [\[DOI\]](#)