

· 研究快报 ·

Prader-Willi 综合征分子分型诊断方法的初步研究

李洪义¹, 李海飞¹, 孟舒¹, 邹小兵², 郑辉³, 陈争¹, 段红蕾¹(1. 中山大学中山医学院医学遗传学研究室, 广东 广州 510080; 2. 中山大学附属第三医院儿科, 广东 广州 510630;
3. 暨南大学医学院生理学研究室, 广东 广州 510632)

摘要:【目的】探讨 Prader-Willi 综合征(PWS)的短串联重复序列(STR)连锁分析诊断方法,为遗传咨询提供相关信息。【方法】对一例临床疑似病例经甲基化特异性 PCR(MS-PCR)确诊为 PWS 后,应用 15 号染色体特定区域的 STR 进行家系连锁分析,探讨其在 PWS 分子缺陷类型诊断方面的可行性。【结果】STR 连锁分析结果显示该患者为父源缺失型 PWS。【结论】STR 连锁分析是一种可准确诊断 PWS 并明确其分子缺陷类型的好方法;国人相关区域的 STR 位点及其多态信息等有待进一步研究,以完善并最终建立该方法。

关键词: Prader-Willi 综合征; 短串联重复序列; 连锁分析; 基因组印迹

中图分类号: R596.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2007)06-0718-03

A Preliminary Study of Molecular Diagnostics in Prader-Willi Syndrome // LI Hong-yi¹, LI Hai-fei¹, MENG Shu¹, ZOU Xiao-bing², ZHENG Hui³, CHEN Zheng¹, DUAN Hong-lei¹. (1. Department of Medical Genetics, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510089, China; 2. Department of Paediatrics, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 3. Department of Physiology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: 【Objective】The purpose of this research was to apply the molecular diagnostics to Chinese Prader-Willi Syndrome (PWS) patient, and finally provide genetic counseling to PWS families. 【Methods】In addition to methylation-specific PCR (MS-PCR), a new method of linkage analysis by six short tandem repeat (STR) was used to detect the molecular genetic defect of one Chinese PWS case. 【Result】This patient could be diagnosed as PWS by Methylation-specific PCR and STR linkage analysis. Also, the linkage analysis revealed that the patient had the paternal deletion of 15q11-q13. 【Conclusion】This STR linkage analysis can identify the molecular defect of PWS cases quickly and accurately. With more STR loci analyzed and their polymorphism information content obtained, this linkage analysis method could be better developed and become a potential diagnostics in PWS cases.

Key words: Prader-Willi syndrome; short tandem repeat; linkage analysis; genomic imprinting

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(6):718-720]

Prader-Willi 综合征(PWS)是一种与基因组印迹相关的遗传性疾病,临床主要特征是新生儿期和婴儿期肌张力减退,吮吸困难;儿童期食欲过盛导致肥胖,身材矮小,促性腺激素分泌不足的性腺机能减退和发育延迟伴中度智力低下^[1,2]。国外报道发病率约为每 1 万至 2.2 万人中一例^[3]。基于 DNA 的分子诊断是确诊的惟一方法,在早期和症状不典型患者的诊断中具有重要作用。我们采用甲基化特异性 PCR 确诊了一例 PWS 患者,应用 STR 家系连锁分析方法对其进行了分子缺陷类型的研究,为建立 PWS 分子分型方法的研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 研究对象

患者,男,8岁,中山大学附属第三医院儿童行为发育研究中心门诊病人,临床怀疑为 PWS 患者。该患者足月顺产,新生儿期肌张力低下,哺乳困难需人工喂养;3岁起开始食欲过盛,随年龄增长而明显肥胖,就诊时身高 1.25 m,体重 48 kg,额径窄,杏仁眼,上唇薄,手足短小;中度智力低下,语言功能轻度障碍;外生殖器发育不良,双侧隐睾。患者父母表型正常。

1.2 甲基化特异性 PCR(MS-PCR)

1.2.1 基因组 DNA 的亚硫酸氢钠预处理 取患者外周血常规提取基因组 DNA,使用 CpGenome™ DNA Modification Kit (Chemicon) 甲基化处理,所获得的甲基化处理 DNA 置-20 备用^[4]。

1.2.2 聚合酶链反应 人类 15q11-13 区域内 SNRPN 基因启动子区含有 CpG 岛,该区域母源性等位基因处于甲基

收稿日期:2007-06-30

基金项目:国家自然科学基金(30672003)

作者简介:李洪义(1960-),男,河北乐亭人,副教授,硕士生导师,E-mail:lihz@163.com.

化状态, 而父源性等位基因处于非甲基化状态, 根据亚硫酸氢钠修饰处理后此 DNA 序列的差异, 可设计出针对父源和母源基因的引物。使用 Prader- Willi/Angelman 甲基化诊断试剂盒(CpGenome™ Prader- Willi/Angelman Amplification Kit, Chemicon)进行 PCR 扩增。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外光下观察 DNA 条带。

1.3 短串联重复序列 (STR) 连锁分析

结合国外 PWS 研究进展^[9]和典型 PWS 缺失断裂点的位置, 我们自行选择了 15q11-13 典型缺失区域内的 D15S646、D15S817、D15S1513、D15S822 和 15q11-13 区域外 FBN1、FES 等 6 个 STR 遗传标记进行连锁分析。自行设计 STR 扩增所需引物, 由上海英骏生物公司合成。

1.3.1 聚合酶链反应 30 μL PCR 总反应体系包含 1 × PCR 缓冲液, 2.5 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTP, 1.5 u Taq 酶 (MBI), STR 上下游引物各 0.17 μmol/L 和 DNA 模板。应用 Perkin- Elmer 公司的热循环扩增仪进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳后, 紫外光下观察并记录扩增结果。

1.3.2 DNA 序列测定 以 STR 扩增引物为测序引物, 在 ABI377 测序仪上, 对患者核心家庭 3 名成员各 STR 的 PCR 扩增产物进行测序, 确定 STR 等位基因核心序列重复数目。

1.3.3 连锁分析 对患者及其父母的 6 个 STR 基因型进行分析, 根据这些位点在核心家庭中的遗传关系, 分析确定患儿的分子缺陷类型。

2 结果

2.1 甲基化特异性 PCR 结果

本方法的基本原理: 人类 15q11-13 区域内 SNRPN 基因启动子区含有 Cp G 岛, 该区域上父源性等位基因处于甲基化, 而母源性等位基因处于非甲基化状态, 使用亚硫酸氢钠等化学试剂可将未甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶, 基于这种差异性, 正常人 DNA 则母源性特异 M 引物和父源性特异 P 引物两对引物均扩增, 可见 174 bp 母源性 PCR 产物和 100 bp 父源性 PCR 产物。PWS 患者 DNA 仅母源性特异 M 引物扩增, 因此, 只见 174 bp 母源性 PCR 产物。

本例患者甲基化特异性 PCR 结果只显示 174 bp 母源性 PCR 产物, 而未见 100 bp 父源性 PCR 产物, 表明该患者为 PWS。患者甲基化特异性 PCR 产物电泳图见图 1。

2.2 短串联重复序列 (STR) 连锁分析结果

连锁分析结果显示, 该 PWS 患者父源性 15 号染色体的 15q11-13 区域内的 STR 遗传标记 (D15S646- D15S817- D15S1513- D15S822) 片段发生缺失(由于 D15S822 点位于典型缺失范围内, 推测患者在该点亦为缺失); 在 15q11-13 区域外, STR 遗传标记(FBN1- FES)的单倍型 5- 12 来自父亲, 而另一条正常 15 号染色体完全由母亲传递而来。患者核心家庭成员各 STR 基因型见表 1, 家庭 STR 基因型分析图见图 2。

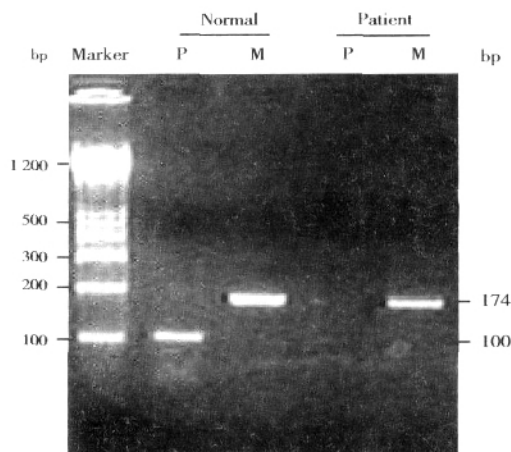


图 1 患者甲基化特异性 PCR 产物电泳图

Fig.1 The electrophoresis result of MS-PCR of the patient and normal control

P represented the paternal PCR amplification fragment and M represented maternal PCR amplification fragment. Normal control person showed the paternal 100 bp fragment and the maternal 174 bp fragment. The patient showed only the maternal 174 bp fragment.

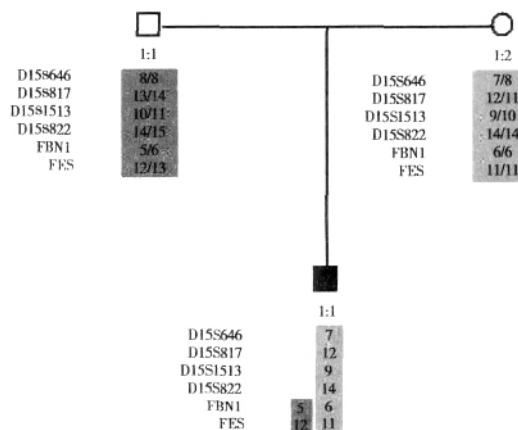


图 2 患者核心家庭成员基因型连锁分析

Fig.2 The genotype analysis of the patient's core family

The patient (II 1) had the paternal deletion of chromosome 15 fragment (STR D15S646-D15S817-D15S1513-D15S822)

表 1 患者核心家庭成员基因型分析

Table 1 The genotype of the core family of the patient

STR(short repeat tandem)	Patient s father	Patient s mother	Patient
D15S646	8/8	7/8	-/7
D15S817	13/14	11/12	-/12
D15S1513	10/11	9/10	-/9
D15S822	14/15	14/14	-/14
FBN1	5/6	6/6	5/6
FES	12/13	11/11	12/11

3 讨论

PWS是一种与基因组印迹相关的遗传性疾病,现在已经明确的引起 PWS 的分子缺陷类型主要包括:(1)父源性 15q11-13 区域缺失,约占 70%;(2)母源性 15 号染色体单亲二体,约占 20%~25%;(3)印迹缺陷,约占 2%~4%;(4)染色体平衡易位及其它罕见原因,小于 1%^[1,6]。故目前约有 99% 的 PWS 患者可以借助各种细胞与分子诊断方法进行确诊。

PWS 主要的细胞与分子诊断方法中^[7]: FISH 和甲基化特异性 PCR 是目前国内外主要使用的诊断方法, FISH 主要用于诊断缺失型或 15q 相关区带易位患者; MS-PCR 可用于诊断缺失型、单亲二体 (UPD) 和印迹缺陷 3 种类型的患者,即可以对 99% 的 PWS 患者进行诊断,但是不能区分此 3 种类型。这两种方法结合,仍然不能区分单亲二体和印迹缺陷这两种类型,由于不同类型的 PWS 其再发风险有显著的差别,故仅用这两种方法相结合诊断 PWS,无法为这两种类型患者及其家庭提供良好的遗传咨询和优生指导。

对于本例疑似 PWS 患者,在我们 MSPCR 进行检测确诊的基础上,自行选择了 15q11-13 典型缺失区域^[8,9]内 D15S646、D15S817、D15S1513、D15S822 和 15q11-13 区域外 FBN1 以及 FES 共 6 个 STR 遗传标记进行 STR 连锁分析。根据本研究的患者连锁分析结果,可以得出结论:本例 PWS 患者是由新生 (de novo) 缺失突变引起的,这种缺失可能是由于 15q11-q13 的结构不稳定引起的。

上述结果显示,通过选取 PWS 典型缺失区域内外的 STR 进行家庭连锁分析,能具体区分缺失型和单亲二体型 PWS 患者(这两型占 PWS 总数的 95%)。在 STR 的选择上,若仅选择典型缺失区域内的 STR,则父源缺失型和母源性同源单亲二体型的基因型表现一致,无法进行区分,故我们选择了典型缺失区域内、外的 STR。该方法亦可以区分同源和异源单亲二体。作为一种可行的确定 PWS 分子缺陷类型的方法,本文所用的 6 个 STR 虽然可以对该患者作出诊断,但仍然需要对典型缺失区域内、外众多的 STR 进行筛选,分析其多态信息量,从而挑选适合于中国人群的 STR,并进一步完善这种连锁分析方法。

对于临床上怀疑为 PWS 的患者,可首先用甲基化特异性 PCR 进行检测确诊;而为了明确具体的 PWS 分子缺陷类型,继而可以应用 STR 家庭连锁分析法进行分析,此方法能准确可靠地检测和区分缺失型和单亲二体两类 PWS 患者,至此,引起 PWS 的主要 3 种类型,缺失型、单亲二体 (UPD) 和印迹缺陷的具体分子缺陷类型可以得到确定,这

对于 PWS 的确诊、遗传咨询、产前诊断和优生工作都具有积极的作用。同时,由于 PWS 和 AS (Angelman 综合征) 的遗传机制相似,大约 70% 的 PWS 及 AS 是由 15q11-13 区域长约 3~4 Mb 的缺失引起的,如果这种缺失发生在来自父亲的 15 号染色体上,则表现为 PWS;反之,如缺失发生在来自母亲的 15 号染色体上,则表现为 AS。故该连锁分析方法也适用于缺失型和单亲二体型 AS 的诊断。

PWS 作为一种遗传综合征,尚缺乏有效的治疗方法,而该病早期的表现不特异,如果婴儿时期出现无明显原因的肌张力低下和喂养困难,临床上应怀疑本病。遗传学诊断是该病确诊的依据,而具体的分型诊断,对于遗传咨询和产前诊断,具有重要意义。

参考文献:

- [1] 陆国辉. 产前遗传病诊断 [M]. 第 2 版. 广州:广东科技出版社,2002:284-287.
- [2] CARREL A L, MOERCHEN V, MYERS S E, et al. Growth hormone improves mobility and body composition in infants and toddlers with Prader-Willi syndrome [J]. *J Pediatr*, 2004, 145: 744-749.
- [3] HOLM V A, CASSIDY S B, BUTLER M G, et al. Greenberg F Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria [J]. *Pediatrics*, 1993, 91:398-402.
- [4] KUBOTA T, DAS S, CHRISTIAN S L, et al. Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis [J]. *Nat Genet*, 1997,16: 16-17.
- [5] CAPKOVA C P, VRTEL R, SANTAVA A, et al. Molecular genetic study of causes of the Prader-Willi and Angelman syndrome [J]. *Cas Lek Cesk*,2005,144(2):113-118.
- [6] SHAFFER L G, AGAN N, GOLDBERG J D, et al. American College of Medical Genetics statement of diagnostic testing for uniparental disomy[J]. *Genet Med*, 2001,3:206-211.
- [7] MONAGHAN K G, WIKTOR A, VAN DYKE D L. Diagnostic testing for Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: a cost comparison [J]. *Genet Med*, 2002, 4(6):448-450.
- [8] BUTLER M G, BITTEL D C, KIBIRYEVA N, et al. Behavioral differences among subjects with Prader-Willi syndrome and type I or type II deletion and maternal disomy [J]. *Pediatrics*, 2004,113:565-573.
- [9] CHAI J H, LOCKE D P, GREALLY J M, et al. Identification of four highly conserved genes between breakpoint hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman syndromes deletion region that have undergone evolutionary transposition mediated by flanking duplicons [J]. *Am J Hum Genet*, 2003, 73:898-925.

(编辑 徐杰)