

多重聚合酶链反应快速诊断基因缺失型 假肥大型肌营养不良症^①

胡冬贵^② 华小云 林群娣 陈 争 杜传书

(中山医科大学医学遗传学教研室;广州,510089)

提 要 应用 9 对寡核苷酸引物先 5 对后 4 对分 2 套分别扩增 Duchenne 型肌营养不良症(DMD)基因 9 个不同的外显子区域,对 9 个 DMD 型肌营养不良症(DMD)家系和 1 个 BMD 家系共 13 例 DMD/BMD 患者进行筛查,发现 7 例 DMD 患者的 DMD 基因存在一个或数个外显子所在的区域的缺失,从而不但明确了这些家系 DMD 基因突变的分子基础,而且为这些家系的遗传咨询和产前诊断提供了科学依据。

主题词 肌营养不良/诊断;聚合酶链反应

中图分类号 383.394

Duchenne 型肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)和 Becker 型肌营养不良症(Becker muscular dystrophy, BMD)是人类最常见的 X 连锁隐性遗传病之一,发病占出生男性活婴的 1/3 500(DMD)或 1/30 000(BMD)^[1]。DMD 是一种慢性进行性神经肌肉疾患,3~5 岁起病,12 岁前丧失站立和行走能力,20 岁左右死于心力衰竭或呼吸衰竭;但它的等位型 BMD 发病较晚,病程进展较缓,病情较轻,部分患者可有生育能力。一般在 16 岁后丧失站立和行走能力,可活至 30 岁,甚至更长时间。DMD 基因发生部分缺失,部分重复及单一碱基取代是 DMD/BMD 发病的分子遗传学基础。其中缺失型突变占 60%,大部分分布在 DMD 基因的 5'端和中央区(分别相当于 DMD 基因外显子 1~11 和 44~52 之间区域)^[2~3]。依据这种缺失热点分布特点,Chamblain 等于 1988 年及 Beggs 等 1990 年分别采用 6 对,9 对及 18 对针对上述缺失热点区域的寡核苷酸引物对 DMD/BMD 患者基因组 DMD 基因扩增,并根据扩增片段的出现与否及多少

而达到对缺失型患者基因诊断的目的,从而为这些缺失型家系的遗传咨询和产前诊断提供了科学的依据^[4~6]。与传统的缺失型基因诊断技术 DNA 印迹杂交(Southern blot hybridization)相比,本技术耗时短,花费少,结果可靠且易判断,已成为国内外筛查 DMD 基因缺失型突变的首选方法。

我们应用 9 对寡核苷酸引物先 5 对后 4 对分 2 套筛查了 9 个 DMD 家系和 1 个 BMD 家系共 13 例 DMD/BMD 患者。结果发现 7 例存在 1 个或数个外显子,甚至 9 个外显子所在的片段发生了缺失,从而不但明确了这些患者本身的分子遗传学的发病基础,而且为在这些缺失型 DMD/BMD 家系中遗传咨询和产前基因诊断工作的开展奠定了科学的基础。

1 材料和方法

1.1 病例资料

9 个 DMD 家系中 11 个 DMD 患者及 1 个 BMD 家系中 2 个 BMD 患者的诊断依据

① 广东省科委科研基金资助课题;

② 第一作者,1965 年出生,男,硕士。现在广州市第二人民医院内广州市妇产科研究所工作(广州市多宝路 63 号,510150)

典型的症状、家庭史、血清酶学,肌电图,肌活检及病理检查。

1.2 寡核苷酸引物的获取

购于中国医学科学院基础医学研究所遗传室(按 Chamblain 等文献中的核苷酸序列合成)^[4,5]。

1.3 基因组 DNA 制备

正常和患者 10ml 肝素抗凝外周静脉血,按常规蛋白酶 K 消化及苯酚抽提,TE⁻⁴溶解后置 4℃ 保存。

1.4 多重 PCR 扩增及扩增产物的检测

5 对引物首次 PCR 扩增:50 μ l PCR 总反应液内含 Tris-HCl 12.5mmol/L pH8.2; MgCl₂ 22 mmol/L; gelatin 0.1mg/ml; (NH₄)₂SO₄ 25mmol/L; 甲酰胺 5%,5 对共 10 条引物各 25pmol,0.5 μ g 基因组 DNA,16mmol 的 dNTPs,加 50 μ l 石蜡油。98℃ 变性 10min,再加 Taq DNA 耐热聚合酶 5U(上海复华公司生产),置 DNA 扩增仪(Perkin Elmer 公司),按 94℃30s,56℃30s 及 70℃ 2min 共 30 次循环,最后一次循环 70℃ 延伸 10min。扩增产物 4℃ 保存;4 对引物再次 PCR 扩增;与 5 对引物扩增条件相同。

取 10 μ l 多重 PCR 扩增产物点样于 2% 含有溴乙锭的琼脂糖凝胶中,电泳 3h,电泳结束后在紫外检测仪上观察结果并照相。

2 结 果

2.1 5 对引物首次多重 PCR

5 对引物首次多重 PCR 筛查了 13 个 DMD/BMD 患者,发现 1 例患者 5 个片段均缺失,4 例缺失 48 外显子所在的 506bp 的片段,2 例缺失了 45 外显子所在的 547bp 的片段。这 7 个缺失型患者来自 5 个 DMD/BMD 家系,所以被考察的 10 个家系中缺失型的发生率为 50%(5/10)(图 1)。

2.2 4 对引物再次多重 PCR

上述 13 例患者经 4 对引物多重 PCR 分析,发现 1 例缺失外显子 48 的患者还缺失了

外显子 12 所在的 316bp 的片段及外显子 51

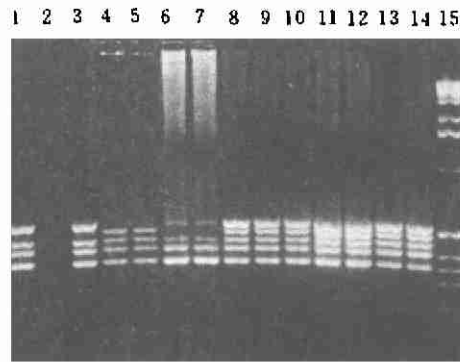


图 1 5 对引物 PCR 扩增电泳

1 与 3,缺失外显子 48 所在的 506bp 片段的患者;2,5 个片段都缺失的患者;4 与 5,同一家系中缺失外显子 45 所在的 547bp 片段两同胞兄弟;6 与 7,同一家系中缺失 48 外显子所在的 506bp 片段外祖父及其外孙;8~13 为非缺失型患者;14,正常男性对照;15,DNA marker

所在的 388bp 的片段,但位于外显子 17 至 45 之间的外显子 17,19,44 及 45 扩增成功。故推测该患者除了缺失外显子 12 之外还至少缺失了外显子 48 至 51 之间的区域;此外,缺失了 5 对引物多重 PCR 5 条片段的患者也同时缺失了 4 对引物多重 PCR 4 条片段。9 对引物跨越 DMD 基因外显子 4 至 51 之间的区域,因此该患者的 DMD 基因可能至少发生了外显子 4 至 51 之间的大片段缺失型突变。其余 11 个 DMD/BMD 患者未发现 4 对引物多重 PCR 片段的缺失(图 2)。



图 2 4 对引物 PCR 扩增电泳

1,同时缺失外显子 12 的 331bp 和外显子 51 的 388bp 片段的患者;2,4 对引物多重 PCR 4 条片段均缺失的患者;3~13,4 对引物多重 PCR 4 条片段均未发生缺失的 11 个患者;14,正常男性对照标本;15,DNA marker

2.3.9 对引物多重 PCR

应用 9 对引物先 5 重后 4 重分 2 套多重 PCR 筛查了 10 个家系中的 13 个 DMD/BMD 患者。结果发现 7 例患者的 DMD 基因

发生了缺失型突变,并且在所考察的 9 个外显子中受累最常见的外显子是 48 和 51,其详细缺失情况见附表。

附表 10 个家系中 13 例 DMD/BMD 患者 9 对引物多重 PCR 结果

家系 编号	患者 编号	扩增外显子								
		4	8	12	17	19	44	45	48	51
1	1001	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	1002	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	1003	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	1004	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	1005	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1006	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	1007	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	1008	+	+	+	+	+	+	+	-	+
7	1009	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	1010	+	+	+	+	+	+	-	+	+
8	1011	+	+	+	+	+	+	+	-	+
9	1012	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	1013	+	+	-	+	+	+	+	-	-

注:“+”和“-”分别表示相应外显子所在的片段扩增成功和失败

3 讨论

DMD 基因部分缺失,部分重复及单碱基置换突变是 DMD/BMD 发病的分子遗传学基础。缺失型突变占 60%左右,可累及 DMD 基因的全长,但绝大部分集中在两个缺失热点:5'末端区和中央区^[2,3]。基于上述 DMD 基因缺失型突变的分布特征,1988 年 Chamblain 等应用一系列互补于缺失热点区域的寡核苷酸引物进行 PCR 扩增,依据扩增成功与否判断 DMD 基因相应部位的存在和缺失从而获得缺失型 DMD/BMD 患者的基因诊断^[4]。目前多重 PCR 基因诊断技术已成为国内外 DMD/BMD 患者基因诊断及其家

系风险女性亲属后代产前基因诊断的首选技术^[4,5,7]。

本研究所选用的 9 对引物是由 Chamblain 等 1990 年所设计合成的。我们根据 DMD 基因缺失事件所累及其各外显子频率的高低,把频率最高的前 5 对引物组成首套 5 重 PCR,而剩下频率较低的 4 对引物则组成第二套 4 重 PCR。每一 DMD/BMD 患者用上述 2 套 PCR 系统先后扩增基因组 DNA,再根据扩增情况获得缺失型 DMD/BMD 患者的基因诊断。根据文献报道首套 5 重 PCR 和次套 4 重 PCR 对 DMD/BMD 患者的基因缺失型诊断分别为 41%和 8%,所以单用首套 5 重 PCR 就能诊断 41%的 DMD/BMD 患者,而只有首套 5 重 PCR 未

获诊断的情况下才用再次4重PCR技术^[7]。

从本研究的10个DMD/BMD家系来看,7例缺失型患者的基因诊断都可通过5重PCR技术来获得。而再次4重PCR技术只在上述缺失型患者中发现2例患者还存在DMD基因其他部位的缺失(1012和1013)。所以单从基因诊断的角度来看,加做或不加做再次4重PCR是没有区别的,但从分析某一DMD/BMD患者DMD基因突变的具体细节来看,加做再次4重PCR就对DMD基因突变的实质具有更全面的了解。

5对和4对引物中分别具有互补于2个缺失热点区域的寡核苷酸引物,由于DMD基因的缺失型突变事件往往只涉及某一个缺失热点,因而5重和4重PCR中未发生缺失热点上的引物的PCR扩增就可成为缺失部位PCR扩增的阳性对照。所以,DMD基因的5重和4重PCR技术无需设置阳性对照,非缺失部位的PCR扩增就已成为每次多重PCR扩增的阳性对照。

多重PCR技术的优点在于单次PCR就可考察多个基因组片段,但并非无限制地可以扩增无数个片段。在DMD基因多重PCR的实践中最长达11重PCR^[6],但由于引物太多,退火时互相干扰,导致引物对之间扩增程度参差不齐,扩增产物电泳带型深浅不一,有时难于判断,甚至无法判断。因此,近年来多重PCR趋向于把引物对数限制在一定范围内。中国医学科学院基础医学研究所遗传室首次把Chamblain等1990年所用的9重PCR改成首套5重和次套4重PCR技术,扩增产物电泳带型清晰,结果可靠,易于判断^[6,7]。本研究在上述基础上进一步简化了扩增程序,并扩大了其应用范围,用常规PCR

扩增试剂即可完成多重PCR扩增,值得推广应用。

参 考 文 献

- 1 Koenig M, Monaco AP, Kundel CM, et al. The complete sequence of dystrophy predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, 1988, 53 : 219
- 2 Stephen A, Martin B, Monaco AP, et al. Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers in the dystrophin gene. *J Med Genet*, 1992, 191 : 196
- 3 Hu X, Ray PN, Murphy EG, et al. Duplication mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: Its frequency, distribution origin and phenotype, genotype. *Am J Hum Genet*, 1990, 46 : 682
- 4 Chamblain JS, Gibbs RA, Rainer JE, et al. Deletion Screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nuclei Acids Res*, 1988, 16 : 1141
- 5 Chamblain JS, Gibbs RA, Rainer JE, et al. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In: Innis M, Gelfand D, Sninski, et al eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990. 272
- 6 Begs AH, Kunkel CM. Improved diagnosis of Duchenne/Becker/muscular dystrophy. *J Clin Invest*, 1990, 85 : 613
- 7 张俊武. Duchenne型和Becker型肌营养不良症. 见:吴冠芸等主编. *基因诊断技术及应用*. 北京:北京医科大学和协和医科大学联合出版社, 1992. 51

(1994-04-19 收稿 1995-04-15 修回)

RAPID GENETIC DIAGNOSIS OF THE DELETED-TYPE MUSCULAR DYSTROPHY BY MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION

Hu Donggui Hua Xiaoyun Ling Qundi Chen Zheng Du Chuanshu

(Department of Medical Genetics, Sun Yat-Sun University
of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

One or more fragment has been found to be deleted in five DMD and two BMD patients by multiplex polymerase chain reaction in a survey of ten muscular dystrophy pedigrees in which thirteen males are affected (only two BMD in a single pedigree). The genomic DNA of all the affected patients have been analyzed by multiplex PCR involving a two-step method in which five fragments were firstly amplified whereas the next four in another absolute eppendorf later. Our results revealed that exon 45 and exon 48 are the more frequent ones involved in the events of deletions in the dystrophin gene. With these results we can take a direct and accurate pregnant diagnosis in these five deletion-positive families.

Subject headings muscular dystrophy/diagnosis; polymerase chain reaction

~~~~~  
(上接第 20 页)

In the presence of 1 mmol/L extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , thrombin (0.2U/ml) induced an influx of extracellular calcium and calcium release from intra-cellular stores,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increased to  $770.3 \pm 27.3 \text{ nmol/L}$  ( $\bar{x} \pm s_x, n=15$ ), and then declined to a plateau still well above the basal level within 4 min. Calcium release was studied in the presence of 2mmol/L of EGTA in the incubation medium, the peak level  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  reached to  $321.2 \pm 17.8 \text{ nmol/L}$ , and then returned rapidly to the basal level within 4 min. After preincubation with  $400 \mu\text{mol/L}$  of  $\text{TMB}_8$ , an intracellular calcium blocker,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  reached a peak of  $443.7 \pm 27.7 \text{ nmol/L}$ , but did not decline back to the basal level.

**Subject headings** calcium indicator; calcium; platelet