

论著 · 临床研究

# 甲基化特异性 MLPA 技术在 Prader-Willi 综合征诊断中的应用价值

詹实娜<sup>1,2</sup> 王春枝<sup>1</sup> 杨尧<sup>1</sup> 王艳<sup>1</sup> 吴虹林<sup>1</sup> 李昊<sup>1</sup> 何玺玉<sup>1,2</sup>

(1. 北京军区总医院附属八一儿童医院临床遗传中心, 北京 100700; 2. 安徽医科大学研究生学院, 安徽 合肥 230032)

**[摘要]** **目的** 不同发病机制的 Prader-Willi 综合征(PWS)在临床表现、预后和遗传风险上均存在一定差异,目前临床常用的确诊方法甲基化特异性 PCR(MS-PCR)不能区分发病机制,本研究采用甲基化特异性多重连接依赖的探针扩增(MS-MLPA)技术诊断 PWS,探讨其在诊断以及分辨发病机制上的优势。**方法** 采用系统对照的方法,取经临床 MS-PCR 检查的 30 例患儿的外周血样本,其中包括通过 MS-PCR 确诊为 PWS 的病例 16 例,阴性对照病例 14 例,重新提取 DNA,采用 MS-MLPA 试剂盒 Me028 进行基因检测分析。**结果** MS-MLPA 检测结果与 MS-PCR 检测结果一致,且检测出 16 例 PWS 病例中 4 例源于母源性同源二倍体,12 例源于父源性 15q11-q13 区域缺失。**结论** MS-MLPA 是能鉴别 PWS 发病机制的一种可靠的实验诊断方法。

[中国当代儿科杂志,2012,14(6):445-448]

**[关键词]** Prader-Willi 综合征;甲基化特异性 PCR;甲基化特异性 MLPA;儿童

**[中图分类号]** R596.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)06-0445-04

## Value of methylation-specific mutiplex ligation-dependent probe in the diagnosis of Prader-Willi syndrome

ZHAN Shi-Na, WANG Chun-Zhi, YANG Yao, WANG Yan, WU Hong-Lin, LI Hao, HE Xi-Yu. Clinical Genetics Center, Bayi Children's Hospital of Beijing Military General Hospital, Beijing 100700, China (He X-Y, Email: hxyjs2001@yahoo.com.cn)

**Abstract: Objective** Prader-Willi syndrome (PWS) with different pathogenesis has different clinical manifestations, prognosis and genetic risks. Pathogenesis of the disease cannot be explained by conventional diagnostic method MS-PCR. This study employed methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) for the diagnosis of PWS in order to explore the role of this method in the diagnosis and assessment of pathogenesis of PWS. **Methods** A system antithetical method was employed. Peripheral blood samples were collected from 30 children for MS-PCR. Of the 30 children, 16 were diagnosed with PWS by MS-PCR and the other 14 showed negative MS-PCR. MS-MLPA kit Me028 was used to detect DNA extracted from the 30 samples. **Results** The results showed by MS-MLPA and MS-PCR were identical. MS-MLPA demonstrated that 4 cases were maternal uniparental disomy and 12 cases were paternal dfeletion in 15q11-q13 region. **Conclusions** MS-MLPA is a reliable method of genetic testing for PWS which can distinguish pathogenesis of PWS. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(6):445-448]

**Key words:** Prader-Willi syndrome; Methylation-specific PCR; Methylation-specific MLPA; Child

Prader-Willi 综合征 (Prader-Willi syndrome, PWS)是基因组印迹遗传的典型代表,是由于染色体 15q11~q13 区域父源等位基因表达异常所致。PWS 在新生儿中的发病率约 1/30000,全部人口中的发病率约 1/50000<sup>[1-2]</sup>。其发病机制包括:(1)父源性 15q11~q13 区域缺失(65%~70%);(2)母源性同源二倍体(20%~30%);(3)印迹中心突变或缺失(2%~5%);(4)染色体平衡易位(<1%)<sup>[3]</sup>。而不同发病机制所致的临床表现和再发风险率均存在一定差异。现临床确诊 PWS 主要依靠甲基化特异性 PCR(methylation-specific PCR, MS-PCR),该方法可以确诊 99% 以上的病例,缺陷是不能区分具体发病机制。而甲基化特异性多重连接探针依赖的扩增技术(methylation-specific mutiplex ligation-dependent probe amplification, MS-MLPA)能够区分 PWS 两种主要发病机制,且该方法操作简单,虽不能鉴别印迹中心突变或缺失以及染色体平衡易位,但已能区分约 95% 的病例,临床意义重大,且国内关于该方法诊断

[收稿日期]2011-12-27;[修回日期]2012-02-21  
[作者简介]詹实娜,女,硕士研究生。  
[通信作者]何玺玉,教授。

PWS 少有报道。因此本研究对 MS-MLPA 方法诊断 PWS 的优越性行对照研究,现报道如下。

# 1 资料与方法

## 1.1 研究对象

以 2009 年 6 月至 2011 年 8 月于北京军区总医院附属八一儿童医院门诊及病房就诊并通过 MS-PCR 检测检查为 PWS 的患儿为阳性组;同时取相同时间段内经 MS-PCR 检查为阴性的患儿作为对照组。其中阳性组 16 例,男 10 例,女 6 例;对照组 14 例,男女各 7 例;年龄 4 d 至 6 岁。所有参与本研究的患儿家属均签署了知情同意书。

## 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及浓度测定 取 30 例患儿的外周血 1~2 mL,EDTA 抗凝。采用天根生化科技有限公司生产的血液 DNA 提取试剂盒,按说明书提取样本 DNA。通过美国 Beckman Coulter 公司生产的 DU 800 型紫外分光光度计测定样本 DNA 浓度。

1.2.2 MS-MLPA 检测 按照 MS-MLPA 试剂盒 Me028(MRC-Holland 公司,荷兰)说明书,首先取每个样本 120 ng 基因组 DNA,于 ABI 9700 PCR 仪中 98℃ 变性 10 min,后加入 SALSA 探针混合杂交至少 16 h。杂交后每个样本分别用连接酶和连接-消化酶进行拷贝数分析试验及甲基化分析试验,反应条件为:49℃ 30 min,98℃ 5 min,15℃ 终止;最后每管中分别加入聚合酶混合物进行 PCR 扩增,反应条件为:95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 60 s,共 35 个循环;72℃ 延伸 20 min;15℃ 终止。用 AB 3130 基因分析仪对扩增产物进行分析,最终所得数据以 GeneMarker 软件分析。

1.2.3 结果判定 基因拷贝数判定:特异性探针峰值与内参信号峰值比的正常阈值为 0.7~1.3,提示基因拷贝数无变异,为 2 个拷贝;比值小于 0.7,

提示基因缺失,仅 1 个拷贝;比值大于 1.3,提示基因重复,为 3 个拷贝。

1.2.4 甲基化异常判定 MS-MLPA 试剂盒甲基化试验中,母源性基因可被甲基化,父源性基因不能被甲基化;未甲基化的父源性基因与 5 个特异性探针结合后能被 HhaI 酶切断,不能扩增出特异性条带。故在基因拷贝数无异常的前提下,同一反应中 5 个甲基化特异性探针经 HhaI 酶切后峰值比较酶切前减少一半,提示甲基化无异常;信号峰完全消失,提示甲基化的母源性等位基因缺失;信号峰不变,提示甲基化的母源性等位基因增加了 1 倍。

# 2 结果

## 2.1 MS-MLPA 检测结果

16 例经 MS-PCR 检测确诊为 PWS 的患儿行 MS-MLPA 检测亦显示为 PWS 阳性;MS-PCR 检测为阴性的 14 例患儿经 MS-MLPA 检测亦为阴性。

## 2.2 基因拷贝数试验结果

图 1 为两组儿童基因拷贝数 MS-MLPA 分析图谱,可见对照组特异性探针的峰值比均在 0.7~1.3 之间(图 1A)。阳性组 16 例患儿中,4 例患儿特异性探针峰值比在 0.7~1.3 之间,提示基因拷贝数无异常(图 1B);12 例患儿特异性探针的峰值比 <0.7,提示基因缺失(图 1C)。同时从 MS-MLPA PCR 产物扩增峰值图可见,阳性组中 12 例患儿 5 个特异性探针峰较对照组降低,提示基因拷贝数异常,存在基因缺失;4 例患儿 5 个特异性探针峰与对照组相近,提示基因拷贝数无异常。见图 2A~C。

## 2.3 甲基化试验结果

经 HhaI 酶切后数据分析显示:(1)阳性组中 12 例患儿 5 个特异性探针峰与对照组相近,为 1 个拷贝;4 例患儿 5 个特异性探针峰较对照组增加 1 倍,

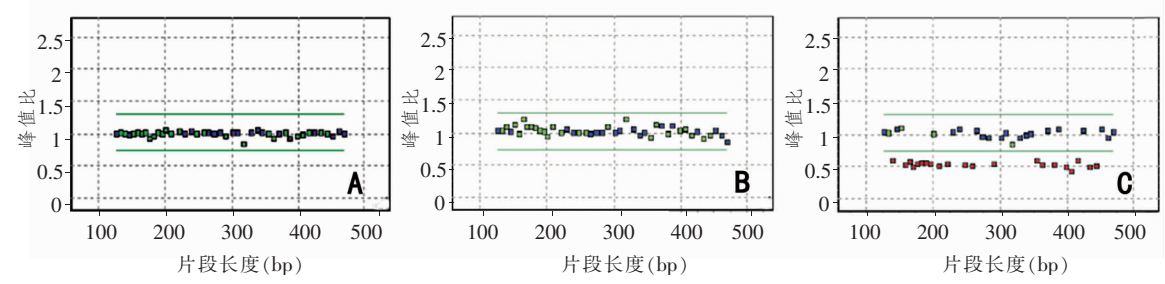
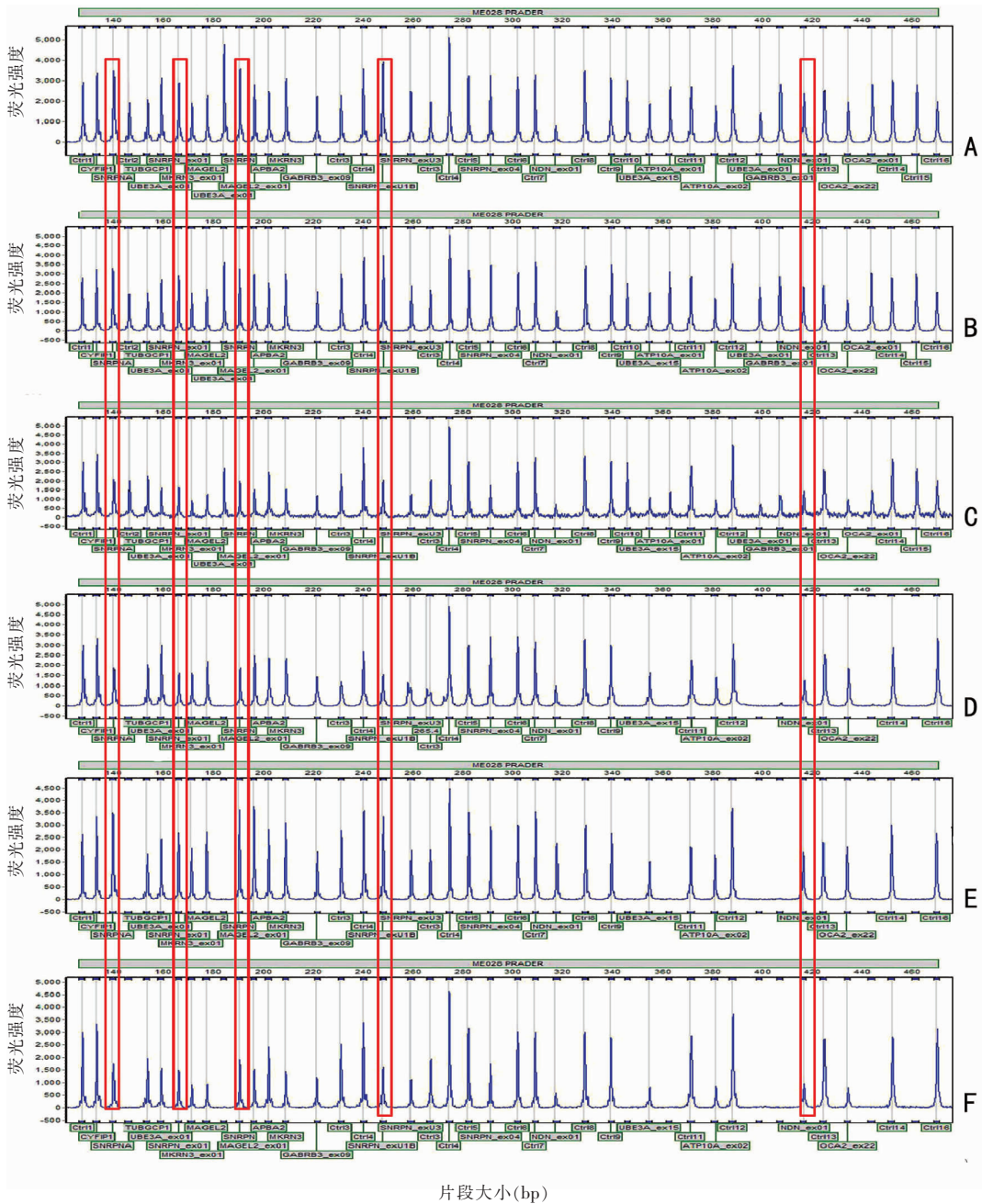


图 1 基因拷贝数 MS-MLPA 分析图谱 图中的两条绿线代表正常峰值比范围(0.7~1.3),比值 >1.3 提示基因重复,比值 <0.7 提示基因缺失;蓝色方块代表内部对照探针,绿色方块代表目的探针,红色方块代表基因拷贝数异常的探针。A 为对照组患儿 MS-MLPA 图,可见基因拷贝数无异常;B 为母源性同源二倍体所致 PWS 患儿 MS-MLPA 图,所有探针均位于两条绿线之内,基因拷贝数无异常;C 为父源性缺失型所致 PWS 患儿 MS-MLPA 图,在 <0.7 范围内存在许多红色方块,提示基因缺失。

为2个拷贝。(2)各组自身甲基化前后比较,甲基化后对照组5个特异性探针峰较甲基化前减半,为1个拷贝;而阳性组16例患儿的5个特异性探针峰酶切后信号不变,分别为1个拷贝(12例)和2个拷

贝(4例)。见图2D~F。  
综上可确定,16例患儿中,4例发病机制为母源性同源二倍体,12例为父源性15q11-q13区域缺失。对照组无假阳性结果,均检测为阴性。



**图2 MS-MLPA 的基因拷贝数试验和甲基化试验的结果** 红色方框内的探针为甲基化酶切位点的特异性探针,片段大小从左到右为142 bp、166 bp、190 bp、247 bp和418 bp。A:对照组,基因拷贝数正常;B:阳性组,5个特异性探针峰与对照组接近,示基因拷贝数正常,为母源性同源二倍体所致;C:阳性组,5个特异性探针峰较对照组降低,示存在基因缺失,为父源性缺失型所致;D:对照组酶切后,5个特异性探针信号减半,示甲基化无异常;E:阳性组(母源性同源二倍体)酶切后,5个特异性探针信号不变,仍为2个拷贝;F:阳性组(父源性缺失型)酶切后,5个特异性探针信号也不变,仍为1个拷贝数。

### 3 讨论

PWS以新生儿严重中枢性肌张力低下和喂养困难为特征,婴儿后期或幼儿早期开始过量饮食,会逐渐出现病理性肥胖、运动和语言发育延迟、不同程度认知缺陷及行为异常(脾气暴躁、倔强、强迫症等)、性腺发育不良、特殊面容、斜视及脊柱侧凸等特征<sup>[4]</sup>。目前已公认有4种发病机制,其中父源性缺失型和母源性同源二倍体为主要机制。据文献报道,父源性15q11-q13区域缺失较母源性同源二倍体所致PWS患儿生后,睡眠障碍、色素减退及语言发育延迟等症状的发病率更高<sup>[5]</sup>;而母源性同源二倍体所致PWS患儿智商较父源性缺失型患儿高,行为异常程度轻,但却更容易伴有精神异常现象及孤独症<sup>[6]</sup>。本病再发风险情况取决于发病机制及先证者性别,女性缺失型PWS先证者有50% Angleman综合征(AS)的再发风险,若先证者为男性,则有50% PWS的再发风险。而绝大多数染色体的微缺失和单亲二倍体的再发风险为1%。可见明确发病机制对于PWS患儿的终生干预治疗指导及遗传咨询意义重大。

目前国内外用于确诊PWS的技术主要为MS-PCR,该方法的诊断率不低于99%,但是不能区分发病机制。

2005年Nygren等<sup>[7]</sup>改进MLPA技术为MS-MLPA,用来检测PWS/AS。MS-MLPA已经成为研究若干基因组甲基化状态的诊断性实验。其剂量分析为检测大片段缺失提供可能,同时它可以检测UBE3A基因或SNORD116基因区域的缺失。该方法的优点是需要的DNA量少(20~200 ng),且不需要父母标本,检测分辨率高,从单个碱基的突变到整条染色体的数量变化都可检测到,但不能反映平衡易位和倒位现象;与MS-PCR相比,MS-MLPA不需要对DNA进行硫化处理,仅以HhaI内切酶对特异性探针和DNA结合序列进行消化,试剂盒中有5个特异性酶切位点的探针,可判断甲基化状态;而且即使有一个探针出现失误,仍有4个探针可以评估检测,大大降低失误率。缺点是不能将母源性二倍体和印迹中心的缺陷相区分。本研究通过该技术将确诊的16例PWS患儿进一步辨别出父源性缺失型12例和母源性同源二倍体4例,由于不同的发病机制所致PWS的临床表现存在差异,鉴别其发病机制为临床干预治疗和遗传咨询提供了更好的帮助。

国内对MS-MLPA用于PWS诊断研究的报道较少。国外对该方法的研究及应用较国内早,有关报道相对较多。其中一个样本量较大的研究<sup>[8]</sup>对62例PWS、10例AS患者通过DNA微卫星分析、FISH、MS-MLPA等方法进行检测,最终验证MS-MLPA可以精确地鉴定包括缺失、母源性二倍体和印迹中心缺陷的各种异常<sup>[8]</sup>。本研究对16例经MS-PCR确诊为PWS的患儿行MS-MLPA检测均可再次证实为阳性,并明确了其发病机制;MS-PCR检测为PWS阴性的14例患儿经MS-MLPA检测亦为阴性,检测的30例病例无一例假阳性或假阴性结果。本研究为迄今为止报道国内病例数最多,并首次经系统对照研究方法证实了MS-MLPA在诊断PWS上的高度敏感性和特异性,提示该方法是一种快捷、可靠的实验诊断方法。

### [参 考 文 献]

- [1] Vogels A, Van Den Ende J, Keymolen K, Mortier G, Devriendt K, Legius E, et al. Minimum prevalence, birth incidence and cause of death for Prader-Willi syndrome in Flanders[J]. Eur J Hum Genet, 2004, 12(3): 238-240.
- [2] Thomson AK, Glasson EJ, Bittles AH. A long-term population-based clinical and morbidity review of Prader-Willi syndrome in Western Australia[J]. J Intellect Disabil Res, 2006, 50(Pt 1): 69-78.
- [3] Shao XY, Zhang R, Hu C, Wang CR, Lu JY, Qin W, et al. Precise microdeletion detection of Prader-Willi Syndrome with array comparative genome hybridization[J]. Biomed Environ Sci, 2010, 23(3): 194-198.
- [4] 王薇,吴晓燕,宋红梅,邱正庆,魏珉. 甲基化特异性PCR方法诊断Prader-Willi综合征[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(4): 485-488.
- [5] Torrado M, Araoz V, Baialardo E, Abalde K, Mazza C, Krochik G, et al. Clinical-etiological correlation in children with Prader-Willi syndrome (PWS): an interdisciplinary study[J]. Am J Med Genet A, 2007, 143(5): 460-468.
- [6] Descheemaecker MJ, Govers V, Vermeulen P, Fryns JP. Pervasive developmental disorders in Prader-Willi syndrome: the Leuven experience in 59 subjects and controls[J]. Am J Med Genet A, 2006, 140(11): 1136-1142.
- [7] Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(14): e128.
- [8] Bittel DC, Kibiryeva N, Butler MG. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of subjects with chromosome 15 abnormalities[J]. Gene Test, 2007, 11(4): 467-475.

(本文编辑:万静)