

· 临床研究 ·

等位基因特异性扩增法检测脊髓性肌萎缩 运动神经元生存基因缺失

卢丽萍¹, 麻宏伟², 姜俊²

(中国医科大学附属第二医院 1. 检验科; 2. 发育儿科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 用单链构象多态性(SSCP)、限制性片段长度多态(RFLP)的方法诊断脊髓性肌萎缩(SMA)较普遍,但方法复杂。该文采用等位基因特异性扩增法进行 SMA 基因诊断,以探讨该方法的实用性和特异性。方法 应用等位基因特异性扩增法对 40 名 SMA 患者(I 型 15 例,II 型 17 例,III 型 8 例)和 40 名正常对照进行运动神经元生存基因(SMN)基因外显子 7 的基因缺失研究。所有 SMA 患者均经 RFLP 方法证实缺失 SMN₁ 基因外显子 7。结果 等位基因特异性扩增法检测所有 SMA 患者均存在 SMN₁ 基因外显子 7 缺失,与 RFLP 的结果一致(诊断符合率为 100%)。结论 等位基因特异性扩增是既简便又实用的 SMA 基因诊断方法。

[中国当代儿科杂志, 2005, 7(3): 228 - 230]

[关键词] 脊髓性肌萎缩;等位基因特异性 PCR;运动神经元生存基因

[中图分类号] R596 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830(2005)03 - 0228 - 03

Detection of survival motor neuron gene deletions using allele-specific amplification in patients with spinal muscular atrophy

Li-Ping LU, Hong-Wei MA, Jun JIANG. Department of Laboratory Medicine, Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Ma H-W, Email: mahongwei1960@hotmail.com)

Abstract: Objective Single strand conformation polymorphism (SSCP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) have been used for the diagnosis of spinal muscular atrophy (SMA), but the two methods were complex. In order to find out a simpler and reliable method, this paper studied the feasibility of allele-specific PCR (AS-PCR) in the gene diagnosis of SMA. **Methods** AS-PCR technique was used to detect the deletion of exon 7 of survival motor neuron (SMN) gene in 40 patients with SMA (15 cases of type I, 17 type II and 8 type III) and in 40 healthy controls. All the patients were confirmed to have deletion of exon 7 of SMN₁ by the RFLP method. **Results** AS-PCR showed that all the 40 patients had deletion of exon 7 of SMN₁. This result was consistent with that detected by the RFLP method. **Conclusions** AS-PCR technique is simple and reliable for the gene diagnosis of SMA.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(3): 228 - 230]

Key words: Spinal muscular atrophy; Allele-specific PCR; Survival motor neuron gene

脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy, SMA)是以脊髓前角 α-运动神经元变性为主要病变的常染色体隐性遗传病。临床表现为进行性对称性肌萎缩和肌无力。发病率接近 1/10 000。SMA 致病基因定位于染色体 5q 11.2 ~ 5q 13.3 区域。该区域的运动神经元生存基因(survival motor neuron, SMN)为 SMA 的决定性基因,存在两个高度同源的拷贝,端粒拷贝(SMN₁)和着丝粒拷贝(SMN₂)。96% SMA 患者有 SMN₁ 基因外显子 7 的纯合缺失或突变^[1]。

因此,检测 SMN₁ 基因外显子 7 的缺失对 SMA 的分子诊断更有价值。AS-PCR (Allele-Specific Amplification)是由 Ugozzoli 和 Wallace^[2]创立的一种用于检测单碱基突变的 PCR 方法。由于 SMN₁ 和 SMN₂ 在外显子 7 仅有一单碱基差异,该文采用此方法检测脊髓性肌萎缩 SMN₁ 基因外显子 7 的缺失,旨在探讨较以往采用的单链构象多态性(single strand conformation polymorphism, SSCP)、限制性片段长度多态(restriction fragment length polymorphism, RFLP)方法更为简便、快速的 SMA 基因诊断方法。

[收稿日期] 2004 - 10 - 30; [修回日期] 2005 - 01 - 30

[作者简介] 卢丽萍(1962-)女,在读博士,副教授,副主任。主攻方向:遗传病的分子遗传学研究。

[通讯作者] 麻宏伟,中国医科大学附属第二医院发育儿科,邮编 110004。

1 对象与方法

1.1 对象

均为1993年5月至2003年9月来我院发育儿科就诊的患者,共40例,男13例,女27例,其中I型15例,II型17例,III型8例。平均年龄 2.0 ± 2.1 岁(26 d ~ 12岁)。以上患者均经中国医科大学附属第二医院遗传门诊确诊,并由RFLP法证实存在SMN₁基因外显子7缺失;正常对照40例,均为本院检验科职工,个体间无亲缘关系,直系亲属中无SMA患者。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取 提取患者及正常对照外周静脉血5 mL, EDTA抗凝,常规酚-氯仿抽提法提取白细胞基因组DNA。

1.2.2 PCR扩增 分别用等位基因特异性引物SMN₁, SMN₂和共同反义引物SMN_{7R}组成两个PCR反应体系,用以检测SMN₁和SMN₂基因外显子7。引物及内对照引物以参考文献^[3]设计,由上海生工公司合成。SMN₁为:5'-CCT TTT ATT TTC CTT ACA GGG TTT T-3'; SMN₂为:5'-CCT TTT ATT TTC CTT ACA GGG TTT C-3';两者共同的反义引物SMN_{7R}:5'-TGC CTA GGT TAT CCC ATA TCA C-3',扩增片段为404 bp。为避免假阴性结果,在每一反应中同时扩增了N-乙酰转移酶基因(NAT₂)作为内标。内对照引物为: Nat₁₄:5'-GAC ATT GAA GCA TAT TTT GAA AG-3'和 Nat_{503R}:5'-TGC TCT CTC CTG ATT TGG TCC -3'。扩增片段为500 bp。PCR反应条件:反应体系为25 μL,内含10 × Buffer 2.5 μL, dNTP 2.0 μL (2.5 mmol/L), 10 pmol/μL各引物(SMN₁或SMN₂, SMN_{7R}, Nat₁₄和Nat_{503R}) 0.5 μL, Taq DNA聚合酶0.2 μL, 基因组DNA 5 μL (100 ng/μL)。置Biometra Gradient PCR扩增仪上, 95℃预变性5 min, 94℃ 30 s, 61℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30次循环后, 72℃延伸5 min。100 bp DNA ladder maker由TaKaRa公司提供。扩增产物用2%琼脂糖凝胶电泳分离, EB染色, 紫外灯下显带。

2 结果

2.1 SMN₁基因外显子7特异性引物扩增结果

正常对照C₁, C₂, C₃均有SMN₁基因的404 bp片段, SMA患者P₁, P₂, P₃, P₄无404 bp片段。即SMA患者存在SMN₁基因外显子7纯合缺失而正常

对照则无缺失。见图1。

2.2 SMN₂基因外显子7特异性引物扩增结果

SMA患者P₁, P₂, P₃及正常对照C₁, C₂, C₄均有SMN₂基因的404 bp扩增片段。正常对照C₃无404 bp片段。即SMA患者无SMN₂基因缺失。正常对照C₃纯合缺失SMN₂基因。见图2。

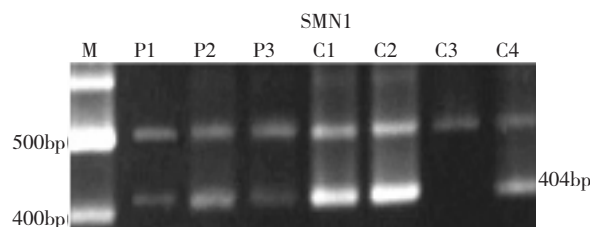


图1 用SMN₁特异性引物(外显子7-T)的电泳图

M:100 bp DNA ladder maker, 内标引物PCR扩增产物为500 bp。SMN₁特异性引物扩增为404 bp

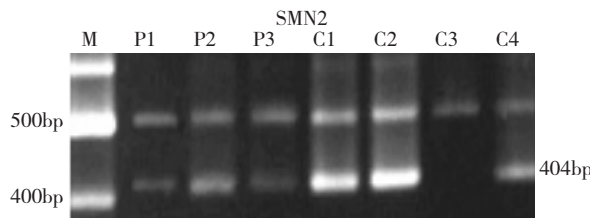


图2 用SMN₂特异性引物(外显子7-C)的电泳图

M:100 bp DNA ladder maker, 内标引物PCR扩增产物为500 bp。SMN₂特异性引物扩增为404 bp

3 讨论

SMN基因全长20 kb, 含有9个外显子, 其转录产物约1.7 kb, 编码294个氨基酸。在一条染色体上该基因有两个高度同源的拷贝(SMN₁端粒拷贝和SMN₂着丝粒拷贝)。两者仅有5个碱基的差异, 其中1个在内含子6, 1个在外显子7, 2个在内含子7及1个在外显子8。约96% SMA患者SMN₁基因外显子7, 8纯合缺失, 另有4%左右患者为SMN₁杂合缺失或基因内突变。而所有患者一般无SMN₂基因外显子7纯合缺失, 只是不同表型所具有的SMN₂基因拷贝数可以不同。而正常人群存在SMN₂纯合缺失(3% ~ 5%)^[1,4,5]。本研究结果显示SMA患者无SMN₂基因缺失, 正常对照中纯合缺失SMN₂基因外显子7者占2.5% (1/40), 与国外报道^[6]接近, SMN₁主要产生全长形式的SMN基因转录产物, 由于SMN₂基因外显子7内280密码区发生C→T碱基置换, 可引起mRNA剪接跳跃, 而使SMN₂主要产生缺少外显子7的SMN基因转录产物, 进而产生无功能蛋白质, 故仅SMN₁基因可产生有功能的蛋

白^[7]。

以往根据 SMN₁ 和 SMN₂ 之间的核苷酸错配并基于患者 SMN₁ 基因外显子 7 和 8 纯合缺失,对 SMA 的基因诊断多采用 SSCP, RFLP 等方法^[8]。但上述方法需费用高、操作繁杂、耗时长或酶切不完全。采用 AS-PCR 法依据的原理是: TaqDNA 酶对于 3'端错配的引物,以低于正常配对末端的速度延伸,当错配碱基数目达到一定程度或 PCR 条件达到一定的严谨程度时,3'端碱基错配的引物则不能延伸,PCR 反应终止。当引物 3'端与模板出现 A:G, C:C, G:G 的错配时,可使 PCR 产物量降低 100 倍, A:A 降低 20 倍^[9]。本研究采用 AS-PCR 法是基于 SMN₁ 和 SMN₂ 在外显子 7 有一单碱基差异,等位基因特异性引物仅扩增 SMN₁ 或 SMN₂ 序列。所应用的两种等位基因特异性引物除其 3'端的一个碱基外,其余序列相同,其 3'端与基因组 DNA 产生一个 T:G 碱基错配,因此可特异性地检测出 SMN₁ 基因外显子 7 纯合缺失,可省去酶切消化的步骤。从实验结果看,采用该方法所分析 40 名经 RFLP 方法证实的 SMA 患者样本,结果所有患者均有 SMN₁ 基因外显子 7 缺失,而正常对照无缺失。这种碱基的错配可达到预期的等位基因特异性扩增的效果,与 RFLP 方法所得的结果完全一致。提示 AS-PCR 法是一种特异、可靠、实用、较 SSCP, RFLP 扩增方法简单、省时的 SMA 基因诊断的方法。

[参 考 文 献]

- [1] Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Violette L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy -determining gene[J]. Cell, 1995, 80(1):155-165.
 - [2] Ugozzoli L, Wallace RB. Application of an allele-specific polymerase chain reaction to the direct determination of ABO blood group genotypes[J]. Genomics, 1992, 12(4):670-674.
 - [3] Simsek M, AL-Bulushi T, Shanmugakonar M, AL-Barwani HS, Bayoumi R. Allele-specific amplification of exon 7 in the survival motor neuron (SMN) genes for molecular diagnosis of spinal muscular atrophy[J]. Genet Test, 2003, 7(4):325-327.
 - [4] Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA)[J]. Hum Mutat, 2000, 15(3):228-237.
 - [5] 丁华新, 杨晓苏, 肖波, 吴志国, 张丽芳. 脊髓性肌萎缩症 SMN 基因拷贝数定量分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2004, 21(2):153-155.
 - [6] Chan V, Yip B, Yam I, Au P, Lin CK, Wang V, et al. Carrier incidence for spinal muscular atrophy in southern Chinese[J]. J Neurol, 2004, 251(9):1089-1093.
 - [7] Monani UR, Sendtner M, Coover DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, et al. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in Snn(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy[J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(3):333-339.
 - [8] 张丽芳, 杨晓苏, 肖波. 脊髓性肌萎缩症的基因学研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2001, 3(1):5-10.
 - [9] 赵春江, 李宁, 邓学梅. AS-PCR 技术检测鸡 EX-FABP 基因型方法的建立[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(3):273-275.
- (本文编辑: 吉耕中)

· 消息 ·

新生儿 HIE 头部亚低温治疗学术研讨会 及新生儿医学新进展学习班通知

复旦大学儿科医院与全国亚低温治疗新生儿 HIE 协作组将于 2005 年 9 月中旬在湖南省张家界市召开“头部亚低温治疗新生儿 HIE 学术研讨会”。会议前后将与湖南省怀化市卫生局联合举办为期 7 天的“新生儿医学新进展”学习班, 学习班内容主要为“新生儿脑损伤”领域的新理论和新进展。该学习班为国家级继续教育学习班, 共 50 学时, 授予国家 I 类学分 18 分, 授课教师均为全国该领域的著名专家。学习班期间可以旁听“头部亚低温治疗新生儿 HIE 学术研讨会”。有意参加者请先与复旦大学儿科医院邵肖梅教授或程国强医师联系, 之后将寄去正式通知。详情请登录复旦大学儿科医院(<http://www.ch.shmu.edu.cn>); 联系方式: 邮编: 200032; E-mail: shao_xiaomei@yahoo.com.cn 或 gqchengcm@hotmail.com