

· 实验研究 ·

SMN₁ 基因实时荧光定量分析在脊髓性肌萎缩携带者检测中的应用

卢丽萍¹, 麻宏伟², 姜俊², 王涛³, 胡斌³

(1. 中国医科大学附属盛京医院检验科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 中国医科大学附属盛京医院发育儿科, 辽宁 沈阳 110004; 3. 中山大学达安基因股份有限公司, 广东 广州 510665)

[摘要] 目的 脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy, SMA)是以脊髓前角运动神经元退化变性为特征的一种常见的常染色体隐性遗传病。SMA的发病率为1/10 000,携带者频率为1/50,因此,对于运动神经元存活基因(survival motor neuron, SMN₁)缺失携带者的检测在遗传咨询中尤为重要。然而SMA位点的重复使得携带者的检测比较困难。该研究的目的是探讨SMN₁基因定量分析在SMA携带者检测中的作用。**方法** 应用TaqMan技术的实时荧光定量PCR方法对109例不同临床表型的SMA患者父母和40例正常对照者的SMN₁基因拷贝数进行检测。**结果** ①SMA肯定携带者的SMN₁基因的平均拷贝数为0.777±0.035,变异系数(CV)值4.5%;正常人(1例,用于验证检测方法的重复性)SMN₁基因的平均拷贝数为2.064±0.120, CV值5.8%;②SMA患者父母SMN₁基因平均拷贝数为0.798±0.108, CV值13.5%;正常人(38/40,为人群SMN₁拷贝数)SMN₁基因平均拷贝数为2.106±0.18, CV值8.5%。**结论** SMA患者父母和正常对照者的SMN₁拷贝数的分布不同,前者为1个拷贝的SMN₁基因;后者以2个拷贝的SMN₁基因为主。因此,SMN₁基因定量检测可用于区分大部分正常人和SMA携带者。

[中国当代儿科杂志, 2007, 9(5): 457-460]

[关键词] 脊髓性肌萎缩;携带者;SMN₁基因;实时荧光定量分析
[中图分类号] R741 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)05-0457-04

Application of real-time PCR analysis of the SMN₁ gene in the carrier testing of spinal muscular atrophy

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

Abstract: Objective Spinal muscular atrophy (SMA) is one of common autosomal recessive diseases and is characterized by degeneration of the anterior horn cells of the spinal cord. The reported prevalence is 1/10 000 live births with a carrier rate of one in 50. It is important in genetic counseling to identify the carriers with one copy deletion for the survival motor neuron (SMN₁) gene. However, the duplication of the SMA locus makes the detection of SMA carriers difficult. This study aimed to determine the potential of the quantitative PCR analysis in the identification of SMA carriers. **Methods** The SMN₁ gene copy number was detected by real-time PCR with TaqMan technology in 109 SMA parents of affected children and 40 normal controls. **Results** The average copy numbers of SMN₁ in the individuals with known one copy of the SMN₁ gene and with the two copies were 0.777 ± 0.035 (CV = 4.5%) and 2.064 ± 0.120 (CV = 5.8%) respectively. The average copy number of SMN₁ in all of the parents with affected individuals was 0.798 ± 0.108 (CV = 13.5%), and that of normal controls was 2.106 ± 0.18 (CV = 8.5%). About 98% of SMA patients' parents carried 1 copy SMN₁, and 95% of normal controls carried 2 copies. **Conclusions** The gene copy numbers for SMN₁ were one and two for SMA carriers and non-carriers, respectively. Our results suggested that the quantitative PCR analysis can distinguish the SMN₁ deletion carriers from non-carriers. [Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(5): 457-460]

Key words: Spinal muscular atrophy; Carrier; SMN₁; Real time PCR

脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy, SMA)是以脊髓前角运动神经元退化变性为特征, 临床表现为进行性、对称性肢体近端和躯干肌肉无力、萎缩和瘫痪的一种常染色体隐性遗传病。国外发病率约

[收稿日期]2006-12-15; [修回日期]2007-02-12
[作者简介]卢丽萍,女,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,教授,中国医科大学附属盛京医院发育儿科。邮编:110004。

1/10 000。正常人群携带频率为1/40~1/60^[1]。由于SMA的致死率和携带者频率较高,对于检测SMN₁缺失携带者在SMA遗传咨询中的作用就尤为重要。当夫妻双方家族均有脊髓性肌肉萎缩症病史,则应于怀孕前进行基因检测以确定两人是否为携带者。如果夫妻均确诊为脊髓性肌肉萎缩症携带者或曾经是脊髓性肌肉萎缩症患者,则需在妊娠时进行产前诊断。所以,通过检测SMA携带者并对其进行婚姻及生育指导,配合产前诊断,就可以从第一胎起防止重型患儿出生,这不仅降低了本病的发病率,而且防止了不良基因在群体中播散。目前所采用的SMA的基因诊断方法^[2,3,6]仅能定性地检测SMN₁基因是否存在或缺失。然而,SMA携带者和正常人均存在SMN₁基因,因此也不能区分SMA携带者。我们应用TaqMan技术的实时荧光定量PCR方法,检测了正常人和SMA患者父母的SMN₁基因拷贝数的变化,旨在通过SMN₁基因定量检测得出正常人和SMA携带者的基因谱变化的特点,以此区分SMA携带者和非携带者。

1 对象与方法

1.1 对象

SMA患者父母109例。正常人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 实验方法

1.2.1 DNA制备 抽取受试者外周静脉血5 mL,EDTA抗凝,常规酚/氯仿法提取白细胞基因组DNA,并在UV-300紫外分光光度仪上测定260 nm及280 nm处的光密度(optical density, OD)值。并根据此OD值计算DNA的浓度和纯度。

1.2.2 微卫星多态标记C212基因型分析

(1)微卫星多态位点的选择:选择SMN基因所在的染色体区域内的一个二核苷酸重复的微卫星多态标记C212,该多态标记来自基因组数据库(Genome Database, GDB),扩增片段长度196~222 bp。

(2)PCR扩增按常规方法,在PE-9600型DNA热循环仪上进行,反应体系25 μL,含有基因组DNA 50 ng, dNTP各200 mmol/L,引物各0.2 μmol/L,1×缓冲液,Taq酶1 U。扩增条件:94℃预变性3 min,然后以94℃40 s,65℃40 s,72℃1 min,循环35次,72℃延伸7 min。PCR产物8 μL加6×载样缓冲液(0.25%溴酚蓝,40%蔗糖)2 μL,上样于2%琼脂糖凝胶电泳,电泳缓冲液为1×TBE,100 V电

泳40 min,EB染色,紫外透射仪中照射,如出现一条特异性亮带表明PCR扩增成功。

(3)变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等位基因 6%变性聚丙烯酰胺凝胶(19:1)电泳,含尿素7 mol/L。银染显带,各等位基因根据电泳谱带出现的位置,由阳极向阴极以1,2,3...,依次命名。

1.2.3 实时荧光定量PCR检测SMN₁基因拷贝数

SMN₁引物及探针^[4],上游引物5'-AAT-GCTTTTAAACATCCATATAAAGCT-3'下游引物5'-CCTTAATTTAAGGAATGTGAGCACC-3'探针针对SMN₁基因外显子7的6位设计,序列为:CAGGGTTTCAGACAAA,用FAM荧光素作为荧光基团,TAMRA作为淬灭基团。以上引物、探针及PCR检测试剂盒由广州达安基因公司合成。标准的确定^[5]:首先采用等位基因特异性扩增方法^[6]在健康人中检测出SMN₂基因外显子7纯合缺失的个体,将其作为测定SMN₁基因拷贝数标准的研究对象,然后根据C212基因分型结果选择有2条C212标记的DNA样本作外标,并将其看作含有2个拷贝的SMN₁基因。准确量取该DNA样品10 mL定为2个拷贝,20 mL,5 mL,2.5 mL分别相当4,1,0.5个拷贝。用标准计算回归曲线,根据回归曲线推断每个未知样品的拷贝数。PCR扩增:反应体系25 mL:基因组DNA 2.5 mL,5×buffer 5 mL,25 mmol/L,dNTPs 0.25 mL,10 pM引物0.5 mL,SMN₁探针0.5 mL,TaqDNA聚合酶(IU/mL)1 mL。PCR反应条件:93℃2 min;93℃1 min,55℃1 min,40循环。

1.2.4 数据分析 用ABI 7000SDS分析软件分析定量数据。

(1)SMN₁基因拷贝数测定值的校正:校正SMN₁拷贝数=样本SMN₁荧光定量检测拷贝数×标准品的OD值÷样品的OD值

(2)实时荧光定量检测SMN₁基因方法的稳定性验证:采用重复性实验即分别选择肯定携带者和正常对照各1例,每日检测同一份DNA样本的SMN₁拷贝数一次(为减少吸样误差每份样品重复检测两次取其平均值),共测定10日,计算其均值、标准差和变异系数。

(3)实时荧光定量检测SMN₁基因方法的可靠性验证:分别测定4例肯定携带者和3例SMA患者的SMN₁基因拷贝数,计算平均值,然后与重复性实验所测得的结果比较。采用SMN₁特异性探针测定纯合缺失SMN₁基因的SMA患者的SMN₁基因;根据SMA患者是否存在SMN₁基因扩增验证测定方法的可靠性。

2 结果

2.1 SMN₁ 基因阳性标准品扩增曲线及荧光扩增回归曲线

见图 1,2。

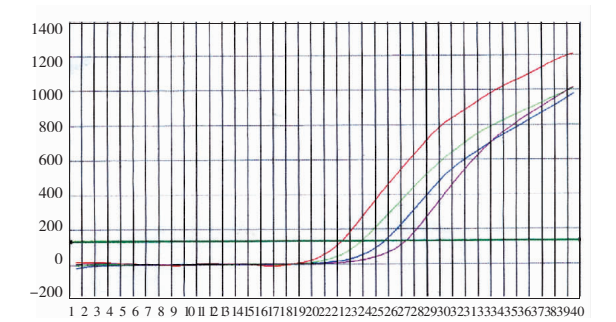


图1 SMN₁ 阳性标准品扩增曲线 纵坐标代表荧光强度,横坐标代表循环数;不同颜色曲线分别代表含不同拷贝 SMN₁ 的标准品;绿色横线代表设定的荧光强度阈值。

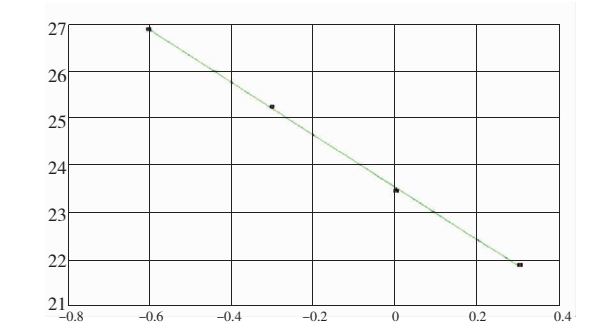


图2 SMN₁ 阳性标准品荧光扩增回归曲线 纵坐标代表 Ct 值,横坐标代表起始拷贝数的对数。Ct 值与标准样品起始拷贝数的对数呈线性相关,相关系数 0.997 095,根据待测样品的 Ct 值得出其起始拷贝数。

2.2 荧光定量 PCR 检测 SMN₁ 基因外显子 7 方法的稳定性验证

从表 1 可见,肯定携带者(含 1 个拷贝 SMN₁ 基因)SMN₁ 平均拷贝数为 0.777 ± 0.035;正常人(含 2 个拷贝 SMN₁ 基因)SMN₁ 平均拷贝数为 2.064 ± 0.120;变异系数分别为 4.5% 和 5.8%,提示该方法比较稳定。见表 1。

表 1 荧光定量分析 SMN₁ 方法的重复性(10 次)

分组	预计拷贝数	平均拷贝数 ($\bar{x} \pm s$)	变异系数 (%)
正常人	2	2.064 ± 0.120	5.8
肯定携带者	1	0.777 ± 0.035	4.5

2.3 荧光定量 PCR 检测 SMN₁ 基因外显子 7 方法的可靠性验证

从表 2 可见,肯定携带者(含 1 个拷贝 SMN₁ 基因)SMN₁ 平均拷贝数为 0.769 ± 0.048;3 例 SMA 患者均未测得 SMN₁ 扩增。见表 2。

分组	预计拷贝数	例数	平均拷贝数 ($\bar{x} \pm s$)	变异系数 (%)
患者	0	3	0	-
肯定携带者	1	4	0.769 ± 0.048	6.2

2.4 正常人、SMA 患者父母 SMN₁ 拷贝数变化

从表 3 可见,患者父母 SMN₁ 基因平均拷贝数为 0.798 ± 0.108,预计其含有 1 个拷贝 SMN₁ 基因。而正常人中 38/40 例 SMN₁ 基因平均拷贝数为 2.106 ± 0.18,预计其含有 2 个拷贝 SMN₁ 基因。见表 3。

表 3 正常人及 SMA 患者父母 SMN₁ 基因拷贝数变化

分组	预计拷贝数	例数	平均拷贝数	变异系数(%)
对照者	1	1	1.052	8.5
	2	38	2.106 ± 0.18	
	3	1	2.95	
患者父母	1	109	0.798 ± 0.108	13.5

2.5 正常人、患者父母 SMN₁ 拷贝的分布

从表 4 可见,患者父母有 98.2% (107/109) 携带 1 个拷贝 SMN₁ 基因。正常人则以携带 2 个拷贝 SMN₁ 基因为主,占 95% (38/40)。见表 4。

表 4 正常人、患者父母 SMN₁ 拷贝数的分布

	SMN ₁ 基因拷贝数的分布(%)					合计
	0	1	2	3	4	
正常人	0(0)	1(2.5)	38(95)	1(2.5)	0(0)	40
患者父母	0(0)	107(98.2)	2(1.8)	0(0)	0(0)	109

3 讨论

致病基因携带者是指表现型正常,但携带致病遗传物质,能传递给后代使其发病者。从临床水平进行致病基因携带者的检出,一般只能提供线索,不能准确检出,故已基本弃用。随着分子遗传学的发展,可以从分子水平即利用 DNA 或 RNA 分析技术直接检出杂合子,而且准确,特别是对一些致病基因的性质和异常基因产物还不清楚的遗传病,或用一般生化方法不能准确检测的遗传病。因此,对遗传性疾病的预防具有重要意义。目前,用基因分析检测携带者的方法日益增多,本研究采用的实时荧光

定量 PCR,利用 Ct 值(每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数)在反应的指数扩增起始阶段进行检测,因此具有极好的重复性^[7]。由于定量 PCR 反应应该以相同质量的 DNA 模板加入反应体系,但如果每份标本的浓度不同,则在反应结束后需根据浓度的差异对加入相同体积的 DNA 进行校正(校正 SMN_1 拷贝数 = 样本 SMN_1 荧光定量检测拷贝数 $\times$ 标准品的 OD 值 $\div$ 样本的 OD 值),校正后的值作为最终比较值。本研究通过重复性试验分别得出了含 1 ~ 2 个拷贝 SMN_1 基因的平均 SMN_1 基因拷贝数的定量范围。结果表明经重复性实验所测得的 SMN_1 基因平均拷贝数的 CV 值与文献报道相符^[4,5],证明该方法是稳定的。为了检验该方法的可靠性我们分别采用 SMN_1 特异探针,测定了纯合缺失 SMN_1 基因但存在不同拷贝 SMN_2 的 SMA 患者的 SMN_1 基因,结果患者未见 SMN_1 基因扩增。说明该探针能特异地识别 SMN_1 和 SMN_2 基因外显子 7,同时对 4 例肯定携带者的 SMN_1 基因进行了测定,其平均 SMN_1 基因拷贝数与重复性实验所测得的肯定携带者的 SMN_1 基因平均拷贝数相符,其提示应用定量方法检测 SMN_1 是可靠的。

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 204 个氨基酸。在一条染色体上该基因有两个高度同源的拷贝(SMN_1 ,端粒拷贝和 SMN_2 ,着丝粒拷贝)。目前多采用单链构象多态性分析法(SSCP)、限制性片段长度多肽(RFLP)技术,利用外显子 7 和 8 的碱基差别区分 SMN_1 和 SMN_2 ,检测 SMN_1 外显子 7,8 的纯合缺失确定 SMA 诊断^[2,3]。由于上述定性基因诊断方法仅能检测 SMN_1 是否存在或缺失,不能区分 SMN_1 丢失的真正原因是基因缺失还是由于转换所致,也不能区分 SMA 携带者和正常人及杂合缺失 SMN_1 基因的 SMA 患者。所以精确定量 SMN_1 拷贝数具有特别重要的意义^[8]。本研究患者父母有 98.2% 携带 1 个拷贝 SMN_1 基因,有 1.8% 携带 2 个拷贝 SMN_1 基因。此结果与文献报道一致^[9~11]。由于该方法尚不能检测那些一条染色体上有 2 个拷贝 SMN_1 拷贝,另一条染色体上有缺失或转化突变的携带者(“2+0” SMN_1 基因型)或新生突变和微小基因内突变的携带者(占 SMN_1 突变的 4%)^[12~14]。所以,上述病例还需进一步进行连锁分析或测序分析等检测确定。正常对照者则以携带 2 个拷贝 SMN_1 基因为主,占 95% (38/40)。表明通过 SMN_1 基因定量检测可得出正常人、SMA 携带者基因拷贝数变化和分

布,以此可区分 SMA 携带者和非携带者。另外,有文献报道^[8]当临床诊断为 SMA 而 PCR 定性 SMN_1 基因没有缺失的患者,有必要进一步进行 SMN_1 的定量检测,可确定是否 SMN_1 基因为杂合缺失。所以,对于 SMA 携带者、 SMN_1 基因杂合缺失的 SMA 患者、 SMN_1 基因内微小突变的筛查以及 SMA 风险评估等均有必要进行 SMN 基因定量分析^[14]。

[参 考 文 献]

[1] Ogino S, Leonard DG, Rennert H, Ewens WJ, Wilson RB. Genetic risk assessment in carrier testing for spinal muscular atrophy [J]. Am J Med Genet, 2002, 110(4): 301-307.

[2] 张丽芳,杨晓苏,肖波. 儿童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.

[3] 吴志国,肖波,杨晓苏,张丽芳,梁静慧. 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析技术在儿童型脊髓性肌萎缩症基因诊断中的应用 [J]. 中华神经科杂志, 2003, 36(6): 425-427.

[4] Anhuf D, Eggermann T, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K. Determination of SMN_1 and SMN_2 copy number using TaqMan technology [J]. Hum Mutat, 2003, 22(1): 74-78.

[5] Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN_1 and SMN_2 based on real-time light-Cycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy [J]. Am J Hum Genet, 2002, 70(2): 358-368.

[6] 卢丽萍,麻宏伟,姜俊. 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 [J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(3): 228-230.

[7] Cusco I, Barcelo MJ, Baiget M, Tizzano EF. Implementation of SMA carrier testing in genetic laboratories: comparison of two methods for quantifying the SMN_1 gene [J]. Hum Mutat, 2002, 20(6): 452-459.

[8] 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.

[9] Chen KL, Wang YL, Rennert H, Joshi I, Mills JK, Leonard DGB, et al. Duplications and de novo deletions of the SMN gene demonstrated by fluorescence-based carrier testing for spinal muscular atrophy [J]. Am J Med Genet, 1999, 85(5): 463-469.

[10] 陈万金,吴志英,王柠,林珉婷,慕容慎行. 脊髓性肌萎缩症 SMN_1 基因定量研究及基因携带者的筛查(英文) [J]. 中华医学遗传学杂志, 2005, 22(6): 599-602.

[11] Chan V, Yip B, Yam I, Au P, Lin CK, Wong V, et al. Carrier incidence for spinal muscular atrophy in southern Chinese [J]. J Neurol, 2004, 251(9): 1089-1093.

[12] Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN_1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA) [J]. Hum Mutat, 2000, 15(3): 228-237.

[13] Ogino S, Wilson RB. Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2004, 4(1): 15-29.

[14] Ogino S, Wilson RB. Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy (SMA) [J]. Hum Genet, 2002, 111(6): 477-500.

(本文编辑:吉耕中)