21-羟化酶缺陷症基因诊断方法的建立及应用

张 丽, 焦 凯[△], 张 菊(第四军医大学唐都医院内分泌科, 西安 710038)

【摘要】 目的 建立一种荧光偏振检测技术联合直接测序法诊断先天性肾上腺皮质增生症中 21-羟化酶缺陷症的新方法,并对中国人群中常见的 2 种基因缺失和 8 种点突变进行检测。**方法** 收集 40 例健康者及 2 例患者外周血,提取基因组 DNA。设计通用引物,同时扩增 CYP21A2 和 CYP21A1P 等位基因片段,然后用序列特异的 TAMRA 荧光标记探针针对扩增产物进行杂交检测,利用荧光偏振仪检测扩增杂交的荧光偏振值,确定是否存在该基因的缺失,同时用直接测序法验证检测结果;对 Exon3 Del 8 bp(GAGACTAC)缺失进行检测时,将缺失的 8 个碱基设计在引物上,确保引物的特异性。同时根据 CYP21A2 基因与其假基因序列差异,设计 5 对特异性引物扩增 CYP21A2 基因,PCR 后直接测序检测中国人群中常见的 8 种点突变,包括 P30L、i2g、I172N、E6Cluster、V281L、920-921insT、Q218X、R356W。**结果** 荧光偏振法未检测到 CYP21A2 基因大片段缺失,检测结果与直接测序法结果对比差异无统计学意义($P > 0.05$),一致率达 100%,40 例健康者未检测到点突变,1 例患者检测出 Exon1 G56R、Exon7c. 920-921InsT 插入杂合突变,1 例患者检测出 Exon4 I172N、Exon8 Q318X 杂合突变。**结论** 荧光偏振检测法联合直接测序法诊断 21-OHD 是一种高效的检测手段,可以广泛用于临床,不仅能对患者基因突变类型进行分析,在指导遗传咨询及产前诊断方面亦发挥重要作用。

【关键词】 先天性肾上腺皮质增生症; 21-羟化酶缺乏症; 荧光偏振; CYP21A2 基因

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.17.025 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)17-2545-03

Establishment and application of a method for gene diagnosis of 21-hydroxylase deficiency ZHANG Li, JIAO Kai[△], ZHANG Ju (Department of Endocrinology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

【Abstract】 **Objective** To establish a new method for detecting 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia(CAH) by using the fluorescence polarization technology combined with direct sequencing, and to detect 2 most common gene deletions and 8 point mutations of CYP21A2 gene in Chinese population. **Methods** The peripheral blood samples in 40 normal people and 2 patients were collected and genomic DNA were extracted. To detect the gene deletion of CYP21A2, at first, universal primers were designed to amplify CYP21A2 and CYP21A1P allele fragments, and then the specific TAMRA fluorescence labeled probe was used to hybrid with amplification products, at last, the fluorescence polarization instrument was adopted to test FP value for determining whether the gene deletion was happened. The sequence GAGACTAC was designed on the primer which was specific to CYP21A2 to detect the Exon3 Del 8 bp(GAGACTAC) deletion. To detect point mutations, 5 pairs highly specific primers for CYP21A2 gene were designed according to the sequence differences between CYP21A2 and its pseudogene. The whole CYP21A2 gene was amplified and sequenced to detect the most common type of 8 kinds of point mutations in Chinese people, including P30L, i2g, I172N, E6Cluster, V281L, 920-921insT, Q218X and R356W. **Results** CYP21A2 gene deletion was not detected by the fluorescence polarization method, the results had no statistical differences compared with the direct sequencing method, the consistency rate reached up to 100%. No point mutation of CYP21A2 gene was found in the 40 healthy people. The two patients, one case was detected with Exon1 G56R, Exon7 c. 920-921 insert T heterozygous mutations, another patient carried Exon4 I172N, Exon8 Q318X heterozygous mutations. **Conclusion** The fluorescence polarization method combined with direct sequencing in the diagnosis of 21-OHD is an effective way, which can be widely used in clinic, not only can analyze the type of gene mutation, but also can play an important role in genetic counseling and prenatal diagnosis.

【Key words】 congenital adrenal hyperplasia(CAH); 21-hydroxylase deficiency; fluorescence polarization; CYP21A2 gene

先天性肾上腺皮质增生症(CAH)是一组由于肾上腺皮质激素合成途径中的必需酶基因的缺陷所引起的一种常染色体隐性遗传病,是引起两性畸形最常见的病因^[1]。其中,90%~95%的 CAH 由 21-羟化酶基因缺陷所致^[2]。由 21-羟化酶缺陷引起的先天性肾上腺皮质增生症的发病率为 1:16 000~1:20 000,如果没有早期诊断及治疗,CAH 会导致休克,低血钠及高血钾,从而引起新生儿死亡。在美国及其他一些发达国

家,CAH 列入新生儿疾病筛查目录^[3]。目前对于 21-羟化酶基因缺陷征(21-OHD)的诊断主要是通过临床症状和生化检测,此方法不仅存在容易发生误诊或漏诊的弊端,而且无法对患者的基因型进行分析。因此对 CAH 开展分子诊断非常有必要,不仅能为临床提供明确的诊断依据,还可避免发生误诊和漏诊。本试验采用荧光偏振方法联合直接测序法对中国人群中 21-OHD 患者常见的 10 种突变进行检测,分别为 30 kb 缺失,

Exon1, P30L(CCG→CTG), Intron2, nt656A/C>G(i2g), Exon3, nt707-714 del (△8bp GAGACTAC), Exon4, I172N(ATC→AAC), Exon6, 簇状突变, Exon7, V281L, nt1757 ins T, Exon8, Q318X, R356W, 通过检测以验证本方法的准确性, 特异性及临床可实施性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 5~10 月在第四军医大学附属唐都医院内分泌科就诊的患者, 在知情同意的原则下, 取患者外周血 5 mL(本研究中所有患者及健康对照组人员均签署知情同意书)。严格按照 TIANamp Blood DNA Kit 说明书按步骤提取 DNA, 用紫外分光光度计测定产物 DNA 的浓度和纯度, 置于-20℃保存。

1.2 仪器与试剂 荧光偏振检测仪 Victor2 Wallac 1420 (Perkin Elmer), verti 96well PCR 扩增仪(东胜创新生物科技公司), 台式离心机(德国 Eppendorf 公司), 恒温水浴锅(美国思伯明公司), 凝胶成像仪, 稳压电泳仪(美国 Thermo 公司)。血液基因组 DNA 提取试剂盒(Tiagen), pUCm-T 载体, Taq DNA 多聚酶, 普通质粒小提取试剂盒, DNA 胶回收试剂盒(sangon)等。

1.3 方法

1.3.1 荧光偏振检测法 (1)引物与探针设计: 根据 GenBank 确定 CYP21A2 及 CYP21A1P 的基因片段序列, 按照引物设计原则, 结合荧光偏振反应的特殊要求设计引物和探针(见表 1), 并由上海生工有限公司合成。(2)标准品的构建: 用特异性引物将获得的 DNA 进行 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳后将目的片段切下进行胶回收, 回收后的产物与 PUCm-T 载体进行连接并转化入 DH5α 感受态细胞中, 挑取单克隆后构建重组质粒, 同时测序验证。将只载有 CYP21A1P 序列的质粒用作阳性标准品, 同时载有 CYP21A2 和 CYP21A1P 的质粒用作阴性标准品。使用 PUCm-T 空载体分别作为以上两个标准品的阴性对照。(3)建立荧光偏振的检测反应: 荧光偏振检测反应体系为(25 μL): 10×PCR Buffer(含 MgCl₂) 2.5 μL, 4×dNTPs 0.5 μL, 上下游引物(10 μM)各 0.5 μL, 探针(5 μM) 0.25 μL, DNA 模板 2.5 μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 去离子水 17.75 μL。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 35 个循环, 72℃ 延伸 3 min。将构建的两个标准品质粒按浓度梯度分别进行稀释, 从 1.0×10⁷ copy/μL 稀释至 1.0 copy/μL, 与 PUCm-T 阳性标准品、阴性标准品以及样本分别按以上条件进行检测, 每个标本均设置副孔。(4)荧光偏振检测与直接测序法对比: 将荧光偏振检测的样本同时进行 PCR 后送测序, 对比两者检测结果的一致性, 同时验证荧光偏振法的灵敏性和特异性。

表 1 荧光偏振检测分析的通用引物及探针

名称	序列 Sequence(5'→3')
引物 F	TGCATTTCCCTTCCTTGCTTC
引物 R	CCCTGAGGTGCCACTTATAGC
CYP21A2 probe	TTGAAATACGGACGTCCCAAGGCC
CYP21A1P probe	CTGTGGGTGGGTGGTGGGAA

1.3.2 点突变的检测 针对要检测的 CYP21A2 基因上的点突变设计特异性引物, 见表 2, 共进行 5 个 PCR 扩增反应。其中, 第二对引物针对 CYP21A2 基因外显子 3 的特殊序列将与 CYP21A1P 相区别的 8 个碱基设计在引物上, 保证了引物的特异性(下划线)。点突变 PCR 反应体系(25 μL): 10×PCR Buffer(含 MgCl₂) 2.5 μL, 4×dNTPs 2 μL, 上下游引物(10 μM)各 1 μL, cDNA 模板 5 μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 去离

子水 13 μL。PCR 反应条件 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 35 个循环, 72℃ 延伸 3 min。引物 1 Tm 为 59℃, 引物 2 和引物 3 Tm 为 61℃, 引物 4 和引物 5 Tm 为 58℃, 其余反应条件均一致。将扩增的大小不同的片段送上海生工公司进行测序, 并且与 GenBank 对比, 检测点突变。直接测序结果不满意者可进行克隆后再测序。

表 2 扩增 CYP21 基因的 PCR 引物

引物名称	位置	序列
1F	-7~11	TCTCGCCATGCTGCTCCT
1R	633~651	TGGAGGGTGGGAAGTGTATG
2F	695~719	CCGACCTGTCTTGGGAGACTACT
2R	1 188~1 210	AAGTTGTCGTCCTGCCAGAAAAG
3F	1 188~1 211	CTTTTCTGGCAGGACGACAACTTA
3R	1 645~1 667	GAGGCTCTCTGCAGAGGGTGAA
4F	1 662~1 681	AGCCTCGTGGCAGGCCAGTG
4R	2 073~2 095	TTCGTGGTCTAGCTCCTCTGCA
5F	1 854~1 872	CCTGAGGTGCGTCTGGGG
5R	2 449~2 469	GCCTCCACCACATTTTCACGG

注: CYP21A2 标准参照序列为 GenBank, GeneID 1589, NG_007941.2; CYP21A1P 标准参考序列为 GeneID 1590, AL645922.12; 起始密码子 ATG 中 A 的核苷酸位置定为 1。

1.4 统计学处理 荧光偏振法及测序法之间的比较采用 χ² 检验, 统计经 SPSS19.0 软件处理, P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标准品的验证 将 PCR 扩增的目的片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行验证, 紫外光凝胶成像系统可见到 213 bp 大小的目的片段条带。同时, 重组质粒送上海生工公司测序, 测序结果与 GenBank 序列一致。

2.2 荧光偏振检测反应的 FP 临界值的建立 对荧光偏振检测反应所得的 FP 值用 t 检验, 可以发现阳性对照的 FP 值分布与阴性对照的 FP 值存在显著差异。在 Victor2 Wallac 荧光偏振检测仪分别于激发光波长 535 nm、吸收波长 590 nm 检测每个对照品及样本反应产物的 TMARA 荧光偏振值(FP), 以 mp 为单位。空白对照 TMARA 为(236.3±6.9)mp, CYP21A2 缺失 TAMRA 为(116.8±6.2)mp, CYP21A2/TAMRA 未缺失为(222.6±5.8)mp。

2.3 荧光偏振法与直接测序法比较 Fisher 精确概率法得两种方法检测效率差异无统计学意义(P=0.753)。两者符合率达到 100%。荧光偏振检测结果 2 例患者荧光偏振检测 FP 值分别为 228、232 mp, 检测结果为阴性, 表明未发生 CYP21A2 基因的缺失。

2.4 点突变的检测 健康对照者均未检测出基因突变。2 例患者, 男性患儿基因突变类型为 G56R/920-921insT 杂合突变, 女性患儿基因突变分析提示为 I172N/Q318X 杂合突变。

3 讨论

先天性肾上腺皮质增生症是最常见的遗传性疾病之一, 常见的潜在突变存在于编码 21-羟化酶的基因中, 占 CAH 的 90%~95%。其他能引起缺陷的酶还包括 11β-羟化酶、17α-羟化酶、3β-类固醇脱氢酶等。21-羟化酶是肾上腺类固醇激素合成的关键酶之一, 也称为 CYP21 或 P450c21, 是存在于肾上腺皮质内质网中的一种细胞色素 P450 酶, 主要的生物作用是将孕酮和 17-羟孕酮转化为脱氧皮质醇和 11-脱氧皮质醇。21-OHD 的临床表现由基因突变所致的残余酶的活性决定, 包括经典和非经典(NC), 前者又根据有无失盐表现分为失盐型(SW)和单纯男性化型(SV)。失盐型、单纯男性化型和非经

典型在本质上定性划分,但在出生时没有高雄激素血症表现的男性中鉴别 SV 和 NC 是很困难的,必须借助于基因型检测,对于其他难以判断的病例也要依靠基因诊断。基因检测分析,不仅可以对疾病进行早期诊断,并且可以对患者的基因类型进行鉴别,是一种基于病因检测的确证手段,对临床具有重要的诊断价值。

目前用于检测 21-OHD 的方法有直接测序法,多重连接依赖性探针扩增技术和位点特异性 PCR-限制性酶切分析等,这些方法不同程度的存在低通量、技术操作复杂,标本易污染和成本高的缺点,不易推广到临床大规模应用。荧光偏振检测技术是一种荧光标记检测技术,利用荧光标记的探针与目的片段的扩增产物进行杂交,用荧光偏振仪检测 FP 值,阳性对照发生扩增反应,荧光标记探针与扩增产物中待测靶基因单链分子同源互补杂交,FP 值会随荧光标记分子的相对分子质量增加而增加,反之阴性对照品与荧光探针分子未发生同源杂交,荧光标记分子的相对分子质量保持不变,FP 值较阳性对照低^[4]。FP 法不需分离游离和结合的示踪物,而且所有测定均在溶液中进行,结果判断只需数字比较,不需高精度的实时荧光强度检测设备与图像分析,FP 值的大小与荧光强度无关,易实现标准化和自动化,因而具有快速、简单和准确灵敏等特点^[5]。本方法已广泛用于包括单核苷酸多态性(SNPs)和单倍型在内的基因变异研究^[6]。

本研究共收集到 2 例患者,通过本体系检测,男性患儿基因突变类型为 G56R/ 920-921insT 杂合突变,女性患儿基因突变分析提示为 I172N/Q318X 杂合突变。上述 4 种基因突变中,920-921insT 和 Q318X 为酶活性完全丧失的突变。G56R 是一种罕见的突变,保有正常酶活性的 0.7%~1.4%,表现为单纯男性化型^[7]。I172N 为中等程度的突变,保有正常酶活性 2%,为单纯男性化型中最常见的类型。21-OHD 中,95%是由于基因间重组所致,仅有 5%为自发突变^[8]。本研究中该女性患儿 I172N 为自发突变,其父母均未检测到携带此致病突变。

本研究中建立了一种基于荧光偏振的检测体系,同时联合直接测序法,对于中国人群常见的 10 种 21-OHD 进行检测,荧光偏振检测技术与直接测序法相比,两者没有明显差别,符合率高达 100%。荧光偏振检测技术是一种简单、敏感和特异的检测方法,其高通量及低廉的价格给试验带来诸多方便。先天性肾上腺皮质增生症的临床表现缺乏特异性,在新生儿时期易

与幽门狭窄,食道闭锁等疾病混淆,婴幼儿时期易与性早熟,引起两性畸形的其他疾病相混淆,经典型 CAH 严重者可出现肾上腺危象、休克等严重危害生命的并发症,为防止并发症的产生,降低病死率,早期诊断及合理治疗至关重要。基因诊断对于 21-OHD 患者的遗传咨询和产前诊断是唯一可靠的方法,本研究旨在建立一种简便、价廉、准确,可广泛应用于临床的 21-OHD 检测手段,荧光偏振检测联合直接测序法为 21-OHD 的诊断提供了新思路。

参考文献

[1] Ma D, Chen Y, Sun Y, et al. Molecular analysis of the CYP21A2 gene in Chinese patients with steroid 21-hydroxylase deficiency[J]. Clin Biochem, 2014, 47(6): 455-463.
 [2] 郁婷婷,王剑,余永国,等.先天性肾上腺皮质增生症基因突变位点诊断方法的建立[J].中华检验医学杂志,2010, 33(7):1236-1237.
 [3] White PC. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia[J]. Nat Rev Endocrinol, 2009, 5(9): 490-498.
 [4] 姜英浩,张滢,俞青苗,等.宫颈癌中 EGFR 启动子甲基化荧光偏振技术检测方法研究[J].现代生物医学进展, 2014, 18(11): 2162-2165.
 [5] 李丁,张菊,颜真,等.荧光偏振技术分析全血 XPD 基因单核苷酸多态性的研究[J].分析化学, 2010, 9(4): 585-588.
 [6] Kwok PY, Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms[J]. Curr Issues Mol Biol, 2003, 5(2): 43-60.
 [7] Soardi FC, Barbaro M, Lau IF, et al. Inhibition of CYP21A2 enzyme activity caused by novel missense mutations identified in Brazilian and Scandinavian patients[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(6): 2416-2420.
 [8] Massimi A, Malaponti M, Federici L, et al. Functional and structural analysis of four novel mutations of CYP21A2 gene in Italian patients with 21-hydroxylase deficiency [J]. Horm Metab Re, 2014, 46(7): 515-520.

(收稿日期:2015-04-16 修回日期:2015-05-15)

(上接第 2544 页)

栓栓塞症的前瞻性随机对照研究[J].中华创伤骨科杂志, 2010, 12(12): 1130-1134.
 [7] 张开放,郭忠卫,宋焕瑾,等.利伐沙班和低相对分子质量肝素钙在人工关节置换术后预防深静脉血栓形成的效果比较[J].中国康复理论与实践, 2011, 17(12): 1148-1151.
 [8] 程文俊,王俊文,任义军,等.利伐沙班与低分子肝素在初次全髋关节置换术后深静脉血栓形成防治中的比较研究[J].中华创伤骨科杂志, 2012, 14(6): 480-483.
 [9] 王倩,王臻,郭征,等.切/刮除膝关节周围原发骨肿瘤置入假体或钢板后抗凝:利伐沙班的效果[J].中国组织工程研究, 2014, 18(22): 3456-3462.
 [10] 王昌耀,王英振,周东生,等.口服利伐沙班预防老年患者全膝关节置换术后深静脉血栓形成的随机对照研究[J].中华关节外科杂志, 2013, 7(3): 336-340.

[11] Huisman MV, Quinlan DJ, Dahl OE, et al. Enoxaparin versus dabig-atran or rivaroxaban for thromboprophylaxis after hip or knee arthroplasty: results of separate pooled analyses of phase III multicenter randomized trials [J]. Circ Cardiovasc Qual Outcomes, 2010, 3(6): 652-660.
 [12] 张建宇,金云珠.利伐沙班与低分子肝素钙预防髋关节置换术后深静脉血栓形成的疗效分析[J].医学综述, 2014, 20(16): 3028-3030.
 [13] 李佩佳,高玉镭,王东辰,等.利伐沙班与低分子肝素在预防人工全膝关节置换术后深静脉血栓形成的分析[J].中国矫形外科杂志, 2012, 20(11): 998-1000.

(收稿日期:2015-03-10 修回日期:2015-05-25)