

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.15.002

PCR 结合毛细管电泳技术用于 FMR1 基因前突变家系分析*

谢建红,余洁,胡利清,周玉球,陈兴,邱显荣
广东省珠海市妇幼保健院检验科,广东珠海 519001

摘要:目的 应用 PCR 结合毛细管电泳技术检测 FMR1 基因 CGG 重复数并对一个前突变家系进行分析。方法 采用 PCR 结合毛细管电泳方法检测 FMR1 基因前突变家系成员的 CGG 重复数。结果 咨询者 CGG 重复数为 54/55,父亲为 56,母亲为 32/55,妹妹为 33/58,弟弟为 54,丈夫为 37。结论 PCR 结合毛细管电泳技术能快速检测 FMR1 基因 CGG 重复数,并能对 FMR1 基因前突变进行准确诊断。

关键词:脆性 X 综合征; FMR1 基因; 前突变; PCR; 毛细管电泳

中图法分类号:R446.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)15-2117-03

Pedigree analysis of pre-mutation of FMR1 gene by PCR combined with capillary electrophoresis technique*

XIE Jianhong, YU Jie, HU Liqing, ZHOU Yuqiu, CHEN Xing, QIU Xianrong
Department of Clinical Laboratory, Zhuhai Municipal Maternity and Child
Healthcare Hospital, Zhuhai, Guangdong 519001, China

Abstract: **Objective** To detect the CGG gene repetition number of FMR1 gene by polymerase chain reaction (PCR) combined with capillary electrophoresis technique and to analyze a family of pre-mutation. **Methods** PCR combined with capillary electrophoresis technique was adopted to detect the CGG repetition number of the members in a family of FMR1 gene pre-mutation. **Results** The results; the CGG repetition number of consultant was 54/55, the father was 56, the mother was 32/55, the sister was 33/58, the brother was 54 and the husband was 37. **Conclusion** PCR combined with capillary electrophoresis technique can rapidly detect the CGG repetition number of FMR1 gene and conduct the accurate diagnosis of FMR1 gene pre-mutation.

Key words: fragile X syndrome; FMR1 gene; pre-mutation; PCR; capillary electrophoresis

脆性 X 综合征是一种发病率仅次于先天愚型(Down's 综合征)的遗传性先天智力低下综合征。脆性 X 综合征为 X 连锁不完全显性遗传,在人群中发病率男性约为 1/3 600,女性为 1/6 000~1/4 000,而在新生儿中发生率为 0.4‰~0.67‰^[1]。

1991 年 VERKERK 等^[2]发现了脆性 X 综合征相关疾病基因 FMR1,提出 FMR1 基因内(CGG)*n* 重复序列的不稳定性扩展及其上游 CpG 岛的异常甲基化是该病发生的分子基础。FMR1 基因位于 Xq 27.3,长度为 38 kb,有 17 个外显子和 16 个内含子,其 5' 端非编码区(CGG)*n* 具有高度多态性。根据重复序列的稳定性及其与脆性 X 综合征发生的关系可分为 4 种类型:(1)正常重复范围(*n*=6~44);(2)中间重复范围(*n*=45~54);(3)前突变(*n*=55~200);(4)全突变(*n*>200)。当重复超过 200 时,FMR1 基因启动子 CpG 岛常发生甲基化,导致 FMR1 转录受抑制或减弱,脆性 X 智力低下蛋白(FMRP)表达受阻。前突变一般不发生甲基化,并具有相对正常的转

录和蛋白水平;但再传给下一代时该结构极不稳定,有发展为全突变的潜能,且前突变均发生在母亲传给孩子时,极少发生在父亲传递给女儿的情况。

近年来基于 PCR 检测 CGG 重复数的方法得到了广泛的发展和应用。该法操作简便、费用低、易推广。本文采用 PCR 结合毛细管电泳技术检测 FMR1 基因 CGG 重复数并对一个前突变家系进行分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 咨询者,女,28 岁,已婚 1 年。因备孕来珠海市妇幼保健院遗传门诊咨询,其父母在其他检测机构检测 FMR1 基因均为前突变,但是该女性无脆性 X 综合征家族史,家族成员中无智力低下、发育不良的患者,笔者拟评估该女性妊娠时胎儿患脆性 X 综合征的风险。在知情同意的情况下,采集该女性及其家系成员包括父亲、母亲、丈夫、弟弟、妹妹的静脉血,进行 FMR1 基因 CGG 重复数测定和染色体核型分析。

1.2 方法

* 基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(A2016361)。

作者简介:谢建红,男,主任技师,主要从事遗传病分子诊断方面的研究。

1.2.1 引物设计 采用 Primer5.0 在 FMR1 基因 (CGG)*n* 重复区域两端设计引物,上游引物: 5'-TCA GGC GCT CAG CTC CGT TTC GGT TTC A-3';下游引物: FAM-5'-AAG CGC CAT TGG AGC CCC GCA CTT CC-3'。在下游引物的 5'端进行 FAM 标记,为蓝色荧光。产物长度=228+3*n*(*n* 为 CGG 重复数)。

1.2.2 DNA 提取 采用全自动核酸提取仪(厦门致善)提取全血基因组 DNA,生物紫外分光光度计(Eppendorf,德国)测定 DNA 浓度和纯度。

1.2.3 PCR 扩增 FMR1 基因 采用 TaKaRa LA Taq® with GC Buffer 系统(大连宝生物有限公司)扩增富含 GC 的基因产物。20 μL 体系各组分如下: DNA 模板 2 μL(约 100 ng),TaKaRa LA Taq(5 U/μL)0.2 μL,2×GC Buffer II 缓冲液 10 μL,dNTP Mixture(2.5 mmol/L)3.2 μL,引物 F 和 R 各 1 μL,2.0 mol/L甜菜碱(Sigma,美国)1 μL,dH₂O 1.6 μL。PCR 反应参数如下:95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,58℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,28 个循环;最后 72℃再延伸 10 min。

1.2.4 毛细管电泳 采用 ABI3500 DX 遗传分析仪(ABI,美国)50 cm 毛细管,POP7 胶进行毛细管电泳分析。取 10 μL 高纯甲酰胺和 0.5 μL 内标 Liz 1200 (ABI,美国)充分混合,加入 1 μL PCR 产物,瞬时离心数秒,95℃变性 3 min,-20℃急冻 2 min,自动上样电泳分析。数据由 ABI3500 DX 数据收集软件获取,通过 ABI GeneMapper 软件(version 4.0)进行分析。

1.2.5 染色体核型分析 染色体核型分析按照常规细胞培养,制片 G 显带,参照 ISCN(2009)标准进行核型分析。

2 结 果

家系成员 FMR1 基因检测电泳峰可见单峰或双峰。根据其产物长度,可计算出 FMR1 基因 CGG 重复数。除咨询者丈夫和弟弟外,其余家系成员均为前突变或前突变携带者。咨询者 CGG 重复数为 54/55,父亲为 56,母亲为 32/55,妹妹为 33/58,弟弟为 54,丈夫为 37(表 1)。所有家系成员染色体核型结果未见异常。

表 1 家系各成员 FMR1 基因 CGG 重复数结果			
家系成员	性别	年龄(岁)	CGG 重复数
咨询者	女	28	54/55
父亲	男	52	56
母亲	女	55	32/55
丈夫	男	30	37
弟弟	男	24	54
妹妹	女	27	33/58

3 讨 论

FMR1 基因 5'端的 (CGG)*n* 具有动态突变的遗传学特征。正常范围的 (CGG)*n* 在遗传过程中能够维持稳定性,而前突变和全突变的 (CGG)*n* 则可能在通过母亲向后代传递的过程中发生动态扩增,使得后代成为片段长度更大的前突变或者全突变^[3-4]。有研究报道 CGG 重复数为 56 的前突变母亲携带者生育了全突变的孩子(*n*=538)^[5]。研究发现 (CGG)*n*<50、50~75、76~100 和 >100 的前突变发生全突变的风险分别是 0%、5%、30% 和 100%^[6]。最近研究表明:女性前突变携带率为 1/259~1/113,男性为 1/280~1/260^[7-8]。虽然前突变不会表现为脆性 X 综合征,但携带者学习障碍、注意力缺陷、多动症和自闭症等的发生率均高于 CGG 未异常扩增者。而女性前突变者原发性卵巢功能不全发生率较高,携带者中发生率为正常的 20 倍^[8]。因此 FMR1 基因 CGG 重复数测定,特别是全突变和前突变的检测对脆性 X 综合征的筛查和诊断及遗传风险评估均具有重要的临床指导意义。

Southern-blot 是检测 FMR1 基因 CGG 重复数及甲基化水平的金标准,可检出全部前突变和全突变等位基因及嵌合状态,同时可了解甲基化水平^[2]。但该法不能给出准确的 CGG 重复数,且需要大量 DNA、同位素标记,操作复杂、耗时,因而不适用于人群筛查和基层普查。近年来基于 PCR 检测 CGG 重复数的方法得到了广泛的发展和应用。该法操作简便、费用低、易推广。但当重复数大于 200 时,扩增片段太长,且 CG 含量高,需要解链能量大,普通 PCR 不易扩增。为使更高 CGG 重复数片段得到扩增,在 PCR 体系中加入 7-脱氮-2-脱氧鸟苷三磷酸(7-deaza-dGTP)、二甲基亚砜(DMSO)、甜菜碱等物质,降低其解链温度,可扩增的 CGG 重复数在男性中可达 330,前突变女性中至少 160^[9]。周雅等^[10]进一步优化该体系后可检出 (CGG)*n* 大于 260 个拷贝数的全突变男性和达到 183 个拷贝数的前突变女性。该优化体系能分辨出相差 1 个 CGG 的两个等位基因,且能准确测出 (CGG)*n* 的重复数,明显降低对 Southern-blot 技术的依赖,可作为临床筛查 FMR1 基因突变的首选方法。

由于 (CGG)*n* 是富含 GC 的序列,对 PCR 扩增效率影响很大。普通 PCR 的扩增效率通常只能达到前突变的下限,对于大多数前突变标本无法检出。因此,本研究通过加入不同浓度梯度(0~2.5 mol/L)的甜菜碱对 PCR 反应体系进行优化。经过不同浓度甜菜碱的筛选,当浓度为 2.0 mol/L 时其扩增效率最好。本实验室建立了在 PCR 反应体系中加入甜菜碱(2.0 mol/L)用以扩增 FMR1 基因并结合毛细管电泳

的方法以准确检测 CGG 重复数。本研究采用该方法分析了一个 FMR1 基因前突变家系,结果显示,除咨询者的丈夫和弟弟外,其他家系成员均为前突变或前突变携带者。从比较父母和儿女的结果来看,存在动态突变的情形。即儿女的 CGG 重复数存在增加或减少的情况,其动态突变的范围为±3 左右。根据家系检测结果,可对咨询者孕后进行产前筛查和诊断的临床指导和风险评估。因此,笔者建议咨询者在怀孕后适当时期采用胎儿绒毛或羊水进行胎儿 FMR1 基因检测,根据胎儿 FMR1 基因 CGG 重复数,评估胎儿患脆性 X 综合征的风险。

参考文献

[1] CRAWFORD D J, SHERMAN S L. FMR1 and the fragile X syndrome human genome epidemiology review[J]. Genet Med, 2001, 3(5): 359-371.

[2] VERKERK A J, PIERETH M, SUTCLIFFE J, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome[J]. Cell, 1991, 65(5): 905-914.

[3] FU Y H, KUHL D P, PIZZUTI A, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox[J]. Cell, 1991, 67(6): 1047-1058.

[4] NOLIN S L, BROWN W T, GICKSMAN A, et al. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with pre-

mutation or intermediate alleles[J]. Am J Hum Genet, 2003, 2: 454-464.

[5] FERNANDEZ C, LOPEZ B, PAN R, et al. Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations[J]. J Mol Diagn, 2009, 11(4): 306-310.

[6] STORM C M, CROSSLEY B, REDMAN J B, et al. Molecular testing for fragile X syndrome: lessons learned from 119,232 tests performed in a clinical laboratory[J]. Genet Med, 2007, 9: 46-51.

[7] TOLEDANO A H, BASEL V L, MAGAL N, et al. Fragile-X carrier screening and the prevalence of permutation and full-mutation carriers in Israel[J]. Am J Hum Genet, 2001, 69: 351-360.

[8] FERNANDEZ C, WALICHIEWICZ P, XIAOSEN X, et al. Screening for expanded alleles of FMR1 gene in blood spots from newborn males in a Spanish population[J]. J Mol Diagn, 2009, 11(4): 324-329.

[9] SALUTO A, BRUSSINO A, TASSONE F, et al. An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation 1 gene[J]. J Mol Diagn, 2005, 7(5): 605-612.

[10] 周雅, 孙维, 肖冰, 等. 优化 PCR 体系结合毛细管电泳技术检测 FMR1 基因前突变与全突变[J]. 中华医学遗传学杂志, 2011, 28(4): 401-405.

(收稿日期: 2019-01-10 修回日期: 2019-06-14)

(上接第 2116 页)

[3] EL-ARMOUCHE A, SCHWOERER A P, NEUBER C, et al. Common MicroRNA signatures in cardiac hypertrophic and atrophic remodeling induced by changes in hemodynamic load[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e14263.

[4] 曾俊义, 张婉, 丁露, 等. miR-31 及其靶基因 LATS2 在大鼠肥大大肌细胞中的表达变化[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(11): 1537-1541.

[5] PEDROZO Z, CRIOLLO A, BATTIPROLU P K, et al. Polycystin-1 Is a cardiomyocyte mechanosensor that governs L-Type Ca²⁺ channel protein stability[J]. Circulation, 2015, 131(24): 2131-2142.

[6] LEWIS B P, SHIH I, JONES-RHOADES M W, et al. Prediction of mammalian microRNA Targets[J]. Cell, 2003, 115(7): 787-798.

[7] MOYLE R L, CARVALHAIS L C, PRETORIUS L S, et al. An optimized transient dual luciferase assay for quantifying microRNA directed repression of targeted sequences[J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1631-1638.

[8] LEE J Y, KIM S, HWANG D W, et al. Development of a dual-luciferase reporter system for in vivo visualization of

microRNA biogenesis and posttranscriptional regulation[J]. J Nucl Med, 2008, 49(2): 285-294.

[9] DUAN M J, YAN M L, WANG Q, et al. Overexpression of miR-1 in the heart attenuates hippocampal synaptic vesicle exocytosis by the posttranscriptional regulation of SNAP-25 through the transportation of exosomes[J]. Cell Commun Signa, 2018, 16(1): 91-98.

[10] PARK H, HUANG X, LU C M, et al. MicroRNA-146a and microRNA-146b regulate human dendritic cell apoptosis and cytokine production by targeting TRAF6 and IRAK1 proteins[J]. J Biol Chem, 2015, 290(5): 2831-2841.

[11] ZHOU J. An emerging role for Hippo-YAP signaling in cardiovascular development[J]. J Biomed Res, 2014, 28(4): 251-254.

[12] MCPHERSON J P, TAMBLYN L, ELIA A, et al. Lats2/Kpm is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity[J]. EMBO J, 2004, 23(18): 3677-3688.

(收稿日期: 2019-01-10 修回日期: 2019-06-14)