

uretic Peptide in the Early Evaluation of Suspected Acute Myocardial Infarction[J]. Am J Med, 2011, 124(8): 731-739.

[10] Cai B, Wang L, Liu J, et al. N-terminal pro-Brain natriuretic peptide as a useful biomarker for monitoring prognosis in patients with cardiac valve replacement[J]. J Clin Lab Anal, 2011, 25(3): 149-155.

[11] Chandrakala AN, Sukul D, Selvarajan K, et al. Induction of brain natriuretic peptide and monocyte chemoattractant protein-1 gene expression by oxidized low-density lipoprotein; relevance to ischemic heart failure[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2012, 302(1): C165-C177.

[12] Januzzi JL Jr, Rehman SU, Mohammed AA, et al. Use of amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide to guide outpatient therapy of patients with chronic left ventricular systolic dysfunction [J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 58(18): 1881-1889.

[13] Andersson SE, Edvinsson ML, Björk J, et al. High NT-proBNP is a strong predictor of outcome in elderly heart failure patients[J]. Am J Geriatr Cardiol, 2008, 17(1): 13-20.

[14] Asanin M, Stankovic S, Mrdovic I, et al. B-type natriuretic peptide predicts new-onset atrial fibrillation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention[J]. Peptides, 2012, 35(1): 74-77.

[15] van Diepen S, Roe MT, Lopes RD, et al. Baseline NT-proBNP and biomarkers of inflammation and necrosis in patients with ST-segment elevation myocardial infarction; insights from the APEX-AMI trial[J]. J Thromb Thrombolysis, 2012, 34(1): 106-113.

[16] Leistner DM, Klotsche J, Pieper L, et al. Prognostic value of NT-pro-BNP and hs-CRP for risk stratification in primary care: results from the population-based DETECT study[J]. Clin Res Cardiol, 2013, 102(4): 259-268.

[17] Hong YJ, Ahn Y, Sim DS, et al. Relation between N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and coronary plaque components in patients with acute coronary syndrome; virtual histology-intravascular ultrasound analysis[J]. Coron Artery Dis, 2009, 20(8): 518-

524.

[18] Patton KK, Ellinor PT, Heckbert SR, et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide is a major predictor of the development of atrial fibrillation; the Cardiovascular Health Study[J]. Circulation, 2009, 120(18): 1768-1774.

[19] Komoda T, Hetzer R, Knosalla C, et al. Increase in N-terminal fragment of the prohormone brain-type natriuretic peptide as a measure for predicting outcome after urgent heart transplantation [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2010, 37(4): 864-869.

[20] Patel UD, Garg AX, Krumholz HM, et al. Preoperative serum brain natriuretic peptide and risk of acute kidney injury after cardiac surgery[J]. Circulation, 2012, 125(11): 1347-1355.

[21] Medina AM, Marteles MS, Sáiz EB, et al. Prognostic utility of NT-proBNP in acute exacerbations of chronic pulmonary diseases [J]. Eur J Intern Med, 2011, 22(2): 167-171.

[22] Lajer M, Tarnow L, Jorsal A, et al. Polymorphisms in the B-type natriuretic peptide (BNP) gene are associated with NT-proBNP levels but not with diabetic nephropathy or mortality in type 1 diabetic patients [J]. Nephrol Dial Transplant, 2007, 22(11): 3235-3239.

[23] Tarnow L, Hildebrandt P, Hansen BV, et al. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide as an Independent predictor of mortality in diabetic nephropathy[J]. Diabetologia, 2005, 48(1): 149-155.

[24] Saenger AK, Dalenberg DA, Bryant SC, et al. Pediatric brain natriuretic peptide concentrations vary with age and sex and appear to be modulated by testosterone [J]. Clin Chem, 2009, 55(10): 1869-1875.

[25] Lorgis L, Cottin Y, Danchin N, et al. Impact of obesity on the prognostic value of the N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) in patients with acute myocardial infarction[J]. Heart, 2011, 97(7): 551-556.

(收稿日期: 2013-12-10)

• 综 述 •

## 杜氏肌营养不良分子诊断技术的研究进展\*

王 晶 综述, 贺 勇<sup>△</sup> 审校

(重庆医科大学附属永川医院检验科, 重庆 402160)

**关键词:** 肌营养不良, 杜氏; 突变; 原位杂交, 荧光; 原位标记; 基因, dystrophin

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 10. 032

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2014)10-1307-03

杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是一种 X 连锁隐性遗传致死性神经肌肉系统疾病, 发病率高, 占男性活婴的 1/3 500。临床表现为全身骨骼肌萎缩, 进行性无力和小腿腓肠肌假性肥大, 走路呈鸭形步态, 30% 患儿有不同程度的智力障碍。一般 3~5 岁隐袭发病, 9~12 岁丧失站立和行走能力, 多于 20 岁左右因心、肺功能衰竭而死亡<sup>[1]</sup>。现阶段对 DMD 尚无有效的治疗方法, 控制 DMD 的发生主要在于防止患儿的出生, 阻断缺陷基因的传递。因此, 产前诊断及母体携带者筛查是预防 DMD 发生的有效手段<sup>[2]</sup>。目前, DMD

的分子诊断方法多样且各有优、缺点, 本文就 DMD 分子诊断技术的研究进展做一综述。

### 1 DMD 基因突变和抗肌萎缩蛋白

抗肌萎缩蛋白即 Dystrophin 蛋白, 为 DMD 致病基因, 位于染色体 Xq21. 2 上, 是目前已知的人类最大基因, 长达 2 400 kb, 由 79 个外显子和 78 个内含子构成。1987 年 Ahn 等<sup>[3]</sup>测定全序列后, 确定了抗肌萎缩蛋白由 3 685 个氨基酸组成, 相对分子质量为 427 000。该蛋白广泛分布于肌肉组织和神经组织中, 在结构上可分为氨基端区、中央区、半胱氨酸富含

\* 基金项目: 重庆市教委科研课题资助项目(KJ100314); 重庆医科大学附属永川医院科研课题资助项目(YJYB2011011)。 作者简介: 王晶, 女, 在读硕士研究生, 主要从事遗传性疾病的分子生物学诊断研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: yonghe1968@sina. com。

区和羧基端区 4 个区域,分别包含 1~8 号外显子、9~63 号外显子、64~68 号外显子、68~79 号外显子。*DMD* 基因突变的特点在于频率高、形式多样,其中 1/3 突变为当代新生突变而无遗传性<sup>[4]</sup>。*DMD* 的基因突变以缺失突变最常见,占 55%~65%,点突变约占 25%,重复突变约占 5%~10%,其他微小缺失和微小重复约占 8%,此外,还包括少量复杂突变和内含子突变,其突变位置无固定规律,突变长度不定<sup>[5]</sup>。*DMD* 基因发生缺失和重复突变主要有 2 个热点区,即 5'端缺失热区,位于 2~20 号外显子区,占 30%;中央热区位于 44~51 号外显子,占 70%;点突变随机分布于整个基因上,无显著分布特点。*DMD* 基因大且复杂,突变大小不一,突变位置无规律,给 *DMD* 诊断增加了难度。

## 2 *DMD* 基因诊断方法

鉴于 *DMD* 基因突变特点,现阶段 *DMD* 的基因诊断方法主要有以下几种:

### 2.1 多重聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)

*Dystrophin* 基因的缺失主要集中于缺失热点区域,1988 年,Chamberlain 等<sup>[6]</sup>设计缺失热点区域的 9 对外显子(4、8、12、17、19、44、45、48 及 51)引物,对 *DMD* 患者的基因进行 PCR 扩增,约 80% 的患者检出基因缺失。后来,Beegs 等<sup>[7]</sup>在新增 9 对外显子(3、6、13、43、47、50、52、60 及 49)引物后,缺失检出的整体敏感性达 98%。此技术仅需极少样本并在较短时间内即可完成全面分析,但也存在局限性,对于非热区的外显子缺失、非缺失突变(如重复突变)和女性携带者不能检测。

### 2.2 逆转录 PCR (reverse transcriptase-PCR, RT-PCR)

*DMD* 基因内含子序列较长且与外显子交替分布,RT-PCR 通过剪切除去内含子,在 mRNA 水平上筛查整个编码序列上各种类型的基因突变。此技术高度特异、灵敏,是国内、外研究 *DMD* 基因突变的重要手段。不过对于许多具有内含子突变的 *DMD* 家系也不能检测。

### 2.3 短串联重复序列 (short tandem repeats, STR) 连锁分析

STR 也称微卫星 DNA 序列,*DMD* 基因 3'端非翻译区的 (CA)<sub>n</sub>STR 序列具有长度多态性,是重要的遗传标记<sup>[8]</sup>。*DMD* 基因有 13 个 STR,分布于 5'端和 3'端的非翻译区和中央区,应用 STR-PCR 技术进行连锁分析已成为非缺失型 *DMD* 家系产前诊断的首选技术,亦可用于缺失型家系中的携带者检出,若先证者为新基因突变,则其家族成员不能获得单体连锁分析信息。

### 2.4 多重连接探针扩增技术 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)

MLPA 是对核酸靶序列进行定性和相对定量分析的一种高通量技术。因其具有分辨率高、操作简便、设备要求低等诸多优势,而被广泛用于检测人类基因组内拷贝数变异。MLPA 是在多重可扩增探针杂交 (multiplex amplifiable probe hybridization, MAPH) 技术基础上改进并优化的<sup>[9-10]</sup>,利用简单的杂交、连接及 PCR 技术,在 2 个反应管中同时杂交和扩增 79 个 *DMD* 基因外显子,同时检测缺失和重复突变。Gatta 等<sup>[11]</sup>通过对因 *DMD* 基因重排致病的男性患者的检测证实,MLPA 敏感性高达 100%,还能检测出断点缺失。但当基因出现微小改变,如缺失、重复、点突变等,均会导致检测结果假阳性。因此,通常还需结合其他检测方法才能确诊<sup>[12]</sup>。

**2.5 基因芯片** 基因芯片技术是将目的基因与一组已知序列的核酸探针杂交,通过检测杂交信号的强弱,从而获取样品中靶基因的数量和序列信息。Hegde 等<sup>[13]</sup>采用基于芯片平台的

微阵列比较基因组杂交技术,检测 102 份 *DMD* 样本,其中 40% 缺失,25% 重复,33% 点突变,联合检测率达 98%。有着较高的敏感性和特异性,能成功检测出肌营养不良蛋白基因组区域的重复和缺失。由于此技术固定于支持物上的寡核苷酸探针数量大,所以可一次性对样品大量序列进行检测和分析,而且,通过设计不同的探针阵列、使用特定的分析方法可使该技术具有多种不同的应用价值,但此技术不能检测拷贝数量不发生改变的突变,因此,具有一些局限性。

### 2.6 荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH)

FISH 是以非放射性荧光素标记已知单链核酸为探针,根据碱基互补原则,经变性后与待检材料中未知的单链核酸进行特异性结合,形成可被检测的杂交双链核酸,在染色体基因具体位点上直观显示基因缺失与重复的一种方法<sup>[14]</sup>。在诊断应用中,可以快速、直观地对患者与携带者进行检测<sup>[15]</sup>。Ligon 等<sup>[16]</sup>建立了系统的针对缺失热区 *DMD* 携带者的 FISH 检测方法。Hermanová 等<sup>[17]</sup>采用多探针杂交检测 *DMD* 基因缺失型携带者,并增加阳性对照使结果更为可信。该技术现已广泛应用于染色体数目畸变、缺失等所致疾病的诊断<sup>[18]</sup>。然而,此技术具有标本制作要求高,探针长,制备耗时、费力且探针不易透过细胞膜屏障等缺点。

### 2.7 引物原位标记 (primed in situ labeling, PRINS) 技术

PRINS 是在 FISH 技术的基础上发展而来,将原位 DNA 合成和 PCR 技术结合起来,从而直接、快速地标记靶标序列。PRINS 技术通过结合特异性引物,在染色体原基因位点进行 PCR,将已经用荧光素标记的核苷酸结合至相应基因位置,通过系列信号处理,观察到相应信号的缺失,即可诊断 *DMD* 基因缺失<sup>[19]</sup>。此技术具有步骤简单、高度易控的特性,对 DNA 的定位和检测省时、省力,且成本较低。1989 年 Koch 等<sup>[20]</sup>首次建立 PRINS 技术后,Gosden 等<sup>[21]</sup>对 PRINS 步骤进行优化,并建立了人类基因组中所有染色体的特异性引物。Cinti 等<sup>[22]</sup>于 2001 年用重复 PRINS 技术扩增并显示了 *Dystrophin* 基因外显子 8,提高了检测低拷贝或单拷贝基因的能力。Pellestor 等<sup>[23]</sup>用 PRINS 技术在原位检测固定的中期染色体和间期细胞核的单个 *DMD* 基因外显子,鉴别女性携带者 *DMD* 基因小的外显子缺失。该技术继承了 FISH 敏感性高、直观化的特点,克服了 FISH 探针特异性差及不易透过细胞膜等缺点<sup>[24]</sup>。PRINS 技术降低可探针长度,能快速、准确地结合至染色体相应基因位点,从而提高标记效率和特异性,并且能够产生多个独立信号,检测部分单基因缺失。PRINS 技术是检测染色体数目异常和结构重排的有效方法,有望成为筛查 *DMD* 患者及携带者的新方法。

## 3 小 结

*DMD* 基因结构复杂多变,且无有效治疗手段。因此,对携带者进行筛查和早期产前诊断,进行详细的遗传咨询,是预防此病的有效方法。目前,基因缺失、内含子突变及微小突变等的研究仍是各个实验室需面临的挑战。新兴的 PRINS 技术由于结合了细胞学分析和分子遗传学技术,使其广泛应用于 *DMD* 临床诊断成为可能,值得国内、外学者进一步探索和研究。

## 参考文献

- [1] Freund AA, Scola RH, Arndt RC, et al. Duchenne and becker muscular dystrophy: a molecular and immunohistochemical approach[J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2007, 65(1): 73-76.

- [2] Nadkarni JJ, Dastur RS, Viswanathan V, et al. Duchenne and Becker muscular dystrophies: an Indian update on genetics and rehabilitation[J]. *Neurol India*, 2008, 56(3): 248-253.
- [3] Ahn AH, Kunkel LM. The structural and functional diversity of dystrophin[J]. *Nat Genet*, 1993, 3(4): 283-291.
- [4] Prior TW, Bridgeman SJ. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy [J]. *J Mol Diagn*, 2005, 7(3): 317-326.
- [5] Shiga N, Takeshima Y, Sakamoto H, et al. Disruption of the splicing enhancer sequence within exon 27 of the dystrophin gene by a nonsense mutation induces partial skipping of the exon and is responsible for Becker muscular dystrophy [J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(9): 2204-2210.
- [6] Chamberlain JS. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy[M]. New York: Academic Press, 1990.
- [7] Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, et al. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction[J]. *Hum Genet*, 1990, 86(1): 45-48.
- [8] Beggs AH, Kunkel LM. A polymorphic CACA repeat in the 3' untranslated region of dystrophin [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(7): 1931.
- [9] Kousoulidou L, Sismani C, Patsalis PC. Multiplex Amplifiable Probe Hybridization (MAPH) methodology as an alternative to comparative genomic hybridization (CGH) [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 653: 47-71.
- [10] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(12): e57.
- [11] Gatta V, Scariolla O, Gaspari AR, et al. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA)[J]. *Hum Genet*, 2005, 117(1): 92-98.
- [12] Willis AS, van den Veyver I, Eng CM. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis[J]. *Prenat Diagn*, 2012, 32(4): 315-320.
- [13] Hegde MR, Chin EL, Mülle JG, et al. Microarray-based mutation detection in the dystrophin gene[J]. *Hum Mutat*, 2008, 29(9): 1091-1099.
- [14] Volpi EV, Bridger JM. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique[J]. *Biotechniques*, 2008, 45(4): 385-386, 388, 390 passim.
- [15] Velázquez-Wong AC, Hernández-Huerta C, Márquez-Calixto A, et al. Identification of Duchenne muscular dystrophy female carriers by fluorescence in situ hybridization and RT-PCR[J]. *Genet Test*, 2008, 12(2): 221-223.
- [16] Ligon AH, Kashork CD, Richards CS, et al. Identification of female carriers for Duchenne and Becker muscular dystrophies using a FISH-based approach[J]. *Eur J Hum Genet*, 2000, 8(4): 293-298.
- [17] Hermanová M, Lukás Z, Kroupová I, et al. Detection of carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy using the fluorescence in situ hybridization method[J]. *Cesk Patol*, 2002, 38(1): 18-23.
- [18] Lev D, Daniely M, Zudik A, et al. Automatic scanning of interphase FISH for prenatal diagnosis in uncultured amniocytes[J]. *Genet Test*, 2005, 9(1): 41-47.
- [19] Stuppia L, La Sala D, Cinti C. Combined fluorescence in situ hybridization and PRINS for the analysis of the Dystrophin gene[J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 334: 115-122.
- [20] Koch JE, Kølvrå S, Petersen KB, et al. Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA in situ[J]. *Chromosoma*, 1989, 98(4): 259-265.
- [21] Gosden J, Hanratty D, Starling J, et al. Oligonucleotide-primed in situ DNA synthesis (PRINS): a method for chromosome mapping, banding, and investigation of sequence organization[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1991, 57(2/3): 100-104.
- [22] Cinti C, Stuppia L, Maraldi NM. Combined use of PRINS and FISH in the study of the dystrophin gene[J]. *Am J Med Genet*, 2002, 107(2): 115-118.
- [23] Pellestor F. Development and adaptation of the PRINS technology: an overview[J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 334: 211-220.
- [24] Werner M, Wilkens L, Nasarek A, et al. Detection of karyotype changes in interphase cells: oligonucleotide-primed in situ labelling versus fluorescence in situ hybridization[J]. *Virchows Arch*, 1997, 430(5): 381-387.

(收稿日期: 2013-12-23)

## • 综 述 •

## ChIP-chip 及 ChIP-seq 的应用现状及其发展前景\*

孔令雯<sup>1</sup>综述, 董竞成<sup>2△</sup>审校

(复旦大学附属华山医院: 1. 中西医结合科; 2. 中西医结合科, 上海 200040)

**关键词:** 染色质免疫沉淀法; 芯片分析技术; 寡核苷酸序列分析; 组蛋白类; DNA 结合蛋白质类**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.033**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2014)10-1309-04

目前主要应用染色质免疫共沉淀-芯片(chromatin immunoprecipitation-chip, ChIP-chip)与 ChIP-测序(ChIP-sequencing, ChIP-Seq)技术在全基因组范围内分析组蛋白修饰、转录因子结合位点(transcription factor binding site, TFBS)、核小体的定位或其他染色质蛋白结合位点的表观遗传机制, 组蛋白修

饰是控制基因转录的关键因素之一, 乙酰化、甲基化、磷酸化等共价修饰的形式共同构成了可以通过特殊解码蛋白解读的组蛋白密码, 在解码过程中每个环节的异常都会影响基因的表达<sup>[1-2]</sup>, 随着 ChIP-chip 与 ChIP-Seq 等高通量技术的出现, 组蛋白修饰的检测变得快捷、高效<sup>[3]</sup>, 但技术应用中的问题也相继

\* 基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目(973 计划)(2009CB523001); 国家自然科学基金资助项目(81173390)。 作者简介: 孔令雯, 女, 在读博士研究生, 主要从事肺部炎症性疾病的研究。 △ 通讯作者, E-mail: jcdong@126.com。