

• 论 著 •

BestSeq™ 技术在进行性肌营养不良症基因突变检测中的应用

李宗杰^{1,2}, 宫瑾瑾^{1,2,△}, 金星星³, 代 稳²

(1. 郑州大学第三附属医院科研中心 450000; 2. 中国人民解放军第 153 中心医院检验科, 郑州 450042;

3. 武警河南总队医院检验科, 郑州 450000)

摘 要:目的 应用 BestSeq™ 新一代致病基因检测技术对进行性肌营养不良患者进行基因检测, 验证该方法的敏感度和特异性。方法 应用 BestSeq™ 新一代致病基因检测技术, 对 2 例肢带型肌营养不良患者、6 例杜氏肌营养不良患者进行基因测序, 对发现的点突变应用 Sanger 测序进行验证。结果 研究完成了上述 8 例患者的基因检测, 共检测出大片段缺失变异 2 个, 微小突变 10 个, 其中 8 个微小突变为首次发现的新突变, 经 Sanger 测序验证。结论 BestSeq™ 新一代致病基因检测利用高密度叠瓦式探针及多重标签技术大大提高了检测效率, 具有很好的临床应用前景。

关键词: 进行性肌营养不良; 基因检测; 微小突变

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.14.013

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)14-1933-03

Application of BestSeq™ technology in the genetic mutation detection of progressive muscular dystrophy

LI Zongjie^{1,2}, GONG Cuicui^{1,2,△}, JIN Xingxing³, DAI Wen²

(1. Scientific Research Center, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou,

Henan 450000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, 153 Hospital of PLA, Zhengzhou, Henan 450042, China;

3. Department of Clinical Laboratory, General Hospital of Henan Armed Police Corps, Zhengzhou, Henan 450000, China)

Abstract: Objective To apply the BestSeq™ new generation pathogenic gene detection technology to perform the genetic detection in the patients with progressive muscular dystrophy (PMD) validating its sensitivity and specificity. **Methods** The BestSeq™ new generation pathogenic gene detection technology was used to perform the gene sequencing in 2 cases of limb-girdle muscular dystrophy (LGMD) and 6 cases of Duchenne's muscular dystrophy (DMD), and the found point mutations were confirmed by the Sanger sequencing method. **Results** This study completed the genetic detection in above 8 cases, 2 cases of large fragment deletion and 10 cases of micromutations were detected, in which 8 micromutations were the new mutation discovered for the first time and verified by the Sanger sequencing. **Conclusion** The BestSeq™ new generation pathogenic gene detection technology greatly increases the detection efficiency by using the high density imbricate type probe and multiple tag technology, and has the better clinical application prospects.

Key words: progressive muscular dystrophy; genetic testing; micromutation

进行性肌营养不良 (PMD) 是一组异质性肌肉退化的遗传性疾病, 最常见的肌营养不良是 Duchenne 型肌营养不良 (DMD), 其他肌营养不良包括肢带型肌营养不良 (LGMD)、Emery-Dreifuss 肌营养不良 (EDMD) 等, 目前尚无有效的根治方法, 对个人、家庭和社会造成沉重的心理和经济压力^[1-2]。近年来, 随着对遗传性肌营养不良症分子遗传学研究的不断深入, 大大提高了疾病诊断的准确性。但由于遗传性肌营养不良症的基因庞大而复杂, 存在着多种可变的剪接方式, 自发突变率高。因此对于探索简便、准确、快速、经济的基因突变检测技术就显得尤为重要。本文应用 BestSeq™ 新一代致病基因检测技术对遗传性肌营养不良患者进行基因检测, 探索了 BestSeq™ 新一代致病基因检测技术对遗传性肌营养不良症的诊断价值, 为遗传性肌营养不良症的基因诊断和治疗提供了实验手段。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 5 月至 2015 年 9 月在郑州大学第三附属医院小儿科及神经内科门诊就诊, 临床拟诊断为进行性肌营养不良的 8 例患儿, 家族史均阴性, 其中 6 例拟诊断为杜氏肌营养不良患儿均有运动发育障碍, 主要表现为摇曳步态, Gower's 征阳性, 下肢病变早于上肢呈对称性发展, 下肢近

心端肌肉萎缩明显, 肌肉活检示不透明肌纤维交错现象, 细胞质内囊泡非边缘分部, 血清肌酸激酶 (CK) 水平明显升高, 提示肌营养不良性肌病。2 例拟诊断肢带型肌营养不良患者, 表现为近端肌无力, 肌腱反射减弱, 累及骨盆及肩带肌, CK 水平明显升高, 病理检查显示营养不良性肌病。

1.2 方法

1.2.1 基因芯片捕获和第二代基因测序 提取患者 gDNA, 按试剂盒 (QIAamp DNA blood Midi Kit Qiagen, Hilden, Germany) 说明操作。二代测序 gDNA 建库, 取 gDNA 1 μg 经自适应高聚焦超声 (Covaris S2, Covaris 公司) 随机打断成 200~300 bp 的片段, 用试剂盒 (AMPure Kit, Agencourt 公司) 对片段样本进行纯化, 应用 T4 聚合酶、T4PNK 和大肠杆菌聚合酶 Klenow 片段进行 DNA 片段的末端修补及在 3' 端加 A 尾, 通过 Paired-end 链接接头反应建立文库, 以 Illumina 公司提供的与接头相配套的引物进行扩增, 并插入 Index 序列, 利用 Agilent (美国 Agilent 公司) SureDesign 在线设计工具, 设计针对目标基因外显子及侧翼序列 (±10 bp) 的靶向捕获探针, 定制专门的目标基因捕获试剂盒, 经杂交捕获后, 对捕获后文库进行 LM-PCR 扩增和纯化, 使用 Agilent Bioanalyzer 2100 仪器 (美国 Agilent 公司) 对测序文库的 DNA 样本进行检测, 再按照捕

获文库 DNA 样本浓度及测序深度要求,应用 NEXTSEQ500 测序仪(美国 Illumina 公司)上机测序。用 Sanger 法对患者样本进行测序验证。

1.2.2 读序原始结果生物信息学处理 二代测序后产生的原始图像经 Illumina Pipeline 软件分析,作出评估和预判。通过质量控制,去除不可靠读数,通过 BWA 比对软件包将读序比对至 NCBI 数据库参考序列上,评估外显子捕获的情况。比对后结果应用 SOAPsnp 进行 SNP 分析,用 GATK Indel Genotyper 软件发现目标区域的插入或缺失。将得到的突变信息与遗传性疾病致病突变数据库,如 HGMD、UMD-DMD、the leiden open variation Database 等及正常人群 SNP 数据库,如 NCBI dbSNP 数据库、HapMap 数据库、Genome 1000 数据库等进行关联分析。用 SIFT 软件通过对单氨基酸替换的改变进行功能预测,判断其是否对蛋白质功能造成不良影响,预测

结果还需要结合基因与临床的关联信息进行综合分析判断。

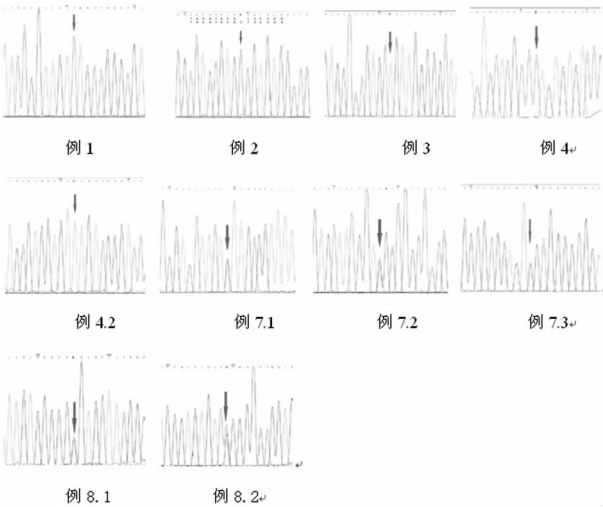
2 结 果

8 例患儿均因出现运动发育障碍来院检查,均发现有致病基因变异。在 6 例拟诊断为杜氏肌营养不良的患者中,有 4 例发现了致病基因 DMD 基因点突变,包括 4 个半合子变异(c. 9739C>T;c. 8038_8039insC;c. 7217G>A;c. 3532G>T)和 1 个内含子剪切变异(c. 10785+10G>A);2 例发现大片段缺失(49~50 号外显子缺失变异;45~49 号外显子缺失变异)见表 1、图 1。在 2 例拟诊断肢带型肌营养不良的患者中,发现致病基因 TTN 基因 2 对复合杂合突变(c. 42958A>G ,c. 2310G>T ;c. 53660G>A,c. 25488T>G),致病基因 LMNA 一个杂合突变(c. 1490T>A),见表 1。上述变异中 DMD 基因 c. 9739C>T 与 c. 3532G>T 为已经报道的致病基因,其他变异均为首次发现新突变,例 3 中 c. 7217G>A 为新生变异(De Novo)。

表 1 8 例进行性肌营养不良患者致病基因变异情况

编号	表型	致病基因	基因位置	核酸改变	氨基酸改变	突变类型	文献报道	突变致病预测
1	DMD	DMD	Xp21.1	c. 9739C>T	p. Gln3247Ter	无义突变	已报道	* * *
2	DMD	DMD	Xp21.1	c. 8038_8039insC	p. Arg2680fs	移码变异	未报道	可致病
3	DMD	DMD	Xp21.1	c. 7217G>A	p. Trp2406Ter	无义突变	未报道	可致病
4	DMD	DMD	Xp21.1	c. 3532G>T	p. Glu1178Ter	无义突变	已报道	* * *
		DMD	Xp21.1		c. 10785+10G>A	剪切变异	未报道	可致病
5	DMD	DMD	Xp21.1	49~50 外显子插入缺失变异	—	—	—	—
6	DMD	DMD	Xp21.1	45~49 外显子插入缺失变异	—	—	—	—
7	LGMD	TTN	2q31	c. 42958A>G	p. Lys14 320Glu	错义突变	未报道	可致病
				c. 2310G>T	p. Glu770His	错义突变	未报道	可致病
		LMNA	1q22	c. 1490T>A	p. Ile497Asn	错义突变	未报道	可致病
8	LGMD	TTN	2q31	c. 53660G>A	p. Arg17887His	错义突变	未报道	可致病
				c. 25488T>G	p. Ile8496Met	错义突变	未报道	可致病

注:DMD 为杜氏肌营养不良;LGMD 为肢带型肌营养不良。突变致病预测仅对未见报道基因预测,* * * 表示未预测。—表示无数据。



注:例 1 为 DMDc. 9739C>T;例 2 为 DMDc. 8038_8039insC;例 3 为 DMD c. 7217G>A;例 4.1 为 DMD c. 3532G>T,例 4.2 为 c. 10785+10G>A;例 7.1 为 TTN c. 42958A>G,例 7.2 为 TTN c. 2310G>T,例 7.3 为 LMNA c. 1490T>A;例 8.1 为 c. 53660G>A;例 8.2 c. 25488T>G。

图 1 进行性肌营养不良突变位点二代测序图

3 讨 论

遗传性肌营养不良症是一组主要累及骨骼肌系统的遗传性单基因病,其临床表现复杂,病情轻重悬殊,具有高度的临床

异质性。如:Duchenne 型(DMD)临床特点为发病早(3 岁左右),进展快,起病后 10 年左右即失去行走能力,预后极差,多于 20 岁前死于呼吸衰竭、心力衰竭或呼吸道感染;又如 Emery-Dreifuss 型,早期出现肘关节、颈椎挛缩,有心肌传导障碍,病情进展慢,预后相对较好,可存活至老年^[3]。

遗传性肌营养不良症根据近年来分子遗传学、免疫组织化学及超微病理学的研究结果发现,所涉及的致病基因位点众多,相同基因位点或不同基因位点所引起的临床症状可差异悬殊或极为相似,具有高度的基因异质性。本研究完成了 8 例患者的遗传性肌肉病 125 个基因检测包的基因测序,共发现了 10 个微小突变,2 个片段缺失突变。在肢带型肌营养不良家系中,例 7 的 TTN 基因新发现 c. 42958A>G、c. 2310G>T 的复合杂合核苷酸变异,上述变异分别导致第 14 320 号氨基酸由 Lys 变为 Glu(p. Lys14 320Glu)、第 770 号氨基酸由 Gln 变为 His(p. Gln770His),均为错义变异。受检者其父在位点 c. 2310 发现 G>T 的杂合变异,其母该位点未见异常;受检者其母在位点 c. 42958 发现 A>G 的杂合变异,其父该位点未见异常。另外,例 7 还伴有致病基因 LMNA 一个杂合新突变(c. 1490T>A),该变异导致第 497 号氨基酸由 Ile 变为 Asn(p. Ile497Asn),为错义变异。

在肢带型肌营养不良家系的例 8 中,新发现了致病基因 TTN 的 2 对复合杂合突变(c. 53660G>A,c. 25488T>G),2 对变异分别导致第 17887 号氨基酸由 Arg 变为 His(p.

Arg17887His), 第 8496 号氨基酸由 Ile 变为 Met (p. Ile8496Met), 均为错义变异。受检者其父在位点 c. 53660 发现 G>A 的杂合变异, 其母该位点未见异常; 受检者其母在位点 c. 25488 发现 T>G 的杂合变异, 其父该位点未见异常。TTN 基因是肢带型肌营养不良 2J 型 (Muscular dystrophy, limb-girdle, type 2J) 的致病基因, 为常染色体隐性遗传方式 (AR)。对于该类遗传方式, 复合杂合变异可能导致发病。在患者 TTN 基因所发现的复合杂合变异分别遗传自受检者其父母, 父母均为杂合子, 符合常染色体隐性遗传方式。

在杜氏肌营养不良例 1 患者的 DMD 基因发现 c. 9739C>T 的核苷酸变异, 该变异导致编译第 3247 号氨基酸 Gln 的密码子变为终止密码子 p. Gln3247Ter), 为无义变异。该变异的致病性已有文献报道^[4], 与杜氏肌营养不良相关, 该变异不属于多态性变化, 在人群中发生的频率极低。其母为杂合子, 符合 X 连锁隐性遗传方式。

在例 2 患者的 DMD 基因发现新的 c. 8038_8039insC 的核苷酸变异, 该变异导致从第 2680 号氨基酸 Arg 开始的氨基酸合成发生改变 (p. Arg2680fs), 为移码变异。该变异可能导致蛋白质功能受到影响。受检者其父该位点未见异常, 其母该位点为杂合子。但与该变异同一位置变异 c. 8038C>T 的致病性已经文献报道^[5]。DMD 基因是杜氏/贝氏肌营养不良 (DMD/BMD) 的致病基因, 为 X 连锁隐性遗传方式 (XR)。对于该类遗传方式, 所发现的变异可能导致发病。

例 3 患者发现 c. 7217G>A 的核苷酸变异, 该变异导致编译第 2406 号氨基酸 Trp 的密码子变为终止密码子 (p. Trp2406Ter), 从而使肽链合成提前终止, 为无义变异。患者父母 DMD 基因均未发现上述变异, 该变异为新生变异 (De Novo)。

例 4 患者发现 c. 10785+10G>A 的剪切变异和 c. 3532G>T 的无义变异。其父上述位点均未见异常, 其母上述位点均为杂合子。变异 c. 10785+10G>A 的致病性尚未见文献报道, 变异 c. 3532G>T 的致病性已经文献报道, 与杜氏肌营养不良相关^[6], 上述变异均不属于多态性变化, 在人群中发生的频率极低。

例 5 和例 6 患者发现大片段缺失, 分别发生 49~50 号外显子缺失变异和 45~49 号外显子缺失变异, 这与文献报道的突变区域相符, 中央热区位于 44~51 号外显子, 占 70%^[7-8]。例 6 患者的母亲和姐姐 DMD 基因检测也存在同样的 45~49 号外显子的缺失变异, 其母和姐姐很可能均为致病变异携带者。DMD 病历中散发病例较多, 它可能是因为: (1) 隐匿传递的致病基因的“暴露”; (2) 母亲卵细胞减数分裂的“差错”; (3) 母亲生殖腺细胞有丝分裂差错, 卵巢中有相当一部分卵母细胞携带变异基因, 即“生殖腺嵌合”。

虽然现在已将基因测序检测列入遗传性肌营养不良的诊断指标之一, 但目前所用的检测方法还存在许多不尽人意的地方。在准确率方面, Sanger 测序法是世界公认的最准确的检测方法, 可以达到 100%。但由于 Sanger 测序法测序流程复杂, 对于没有明确候选基因和候选基因数目较大的大样本病例筛查是难以完成的。另外, 此法不能检测出大片段缺失或拷贝数变异等基因突变类型对于与此相关的遗传性疾病还不能做出基因学诊断。

BestSeq™ 是在第二代基因测序的基础上研发的新一代致病基因检测技术。在样品制备阶段, 应用具有实用新型专利的独特技术设计的样品制备试剂盒, 根据致病基因突变特点及序列特征, 结合本实验室自主研发的探针优化设计方案, 在试剂盒内设计了独特的高密度特异性捕获探针, 保证了高精度、高准确率定点靶向捕获; 提高样品捕获通量通过独特的多重标签技术, 给每个待检样品打上了“条形码”, 可以准确稳定的一次捕获多个样品的全部待检基因。利用这一技术创新, 与世界同类技术如 SMRT 测序方法相比, BestSeq™ 致病基因检测技术可以在相同的时间能够准备最多的待检样品; 对手工操作过程建立了标准化质量控制程序, 有效保障检验质量的稳定性和可重复性, 结合独特的高密度叠瓦式探针及多重标签技术可以将高通量测序平台的数据通量大优势发挥到极致, 大大提高检测效率, 可以达到一次上机同时检测 300 个样品, 平均测序深度可以达到 200X, 目标捕获能力可以达到 99.9%, 测序精确度可以达到 99.99%, 而成本大大降低; 同时, 使用该技术, 对每一个样本最多可以做到同时完成对 100 余种疾病的所有已知致病基因的全部位点 (约 50 万个位点) 的检测。从而使 BestSeq™ 致病基因检测技术成为一项可以应用于临床检验的稳定、高效的标准化检测技术。

综上所述, BestSeq™ 致病基因检测技术具有很好的准确性、经济性和高效性。

参考文献

- [1] 李晶, 毛萌. 进行性肌营养不良基因治疗研究进展与展望[J]. 中国实用儿科杂志, 2014, 29(7): 555-558.
- [2] 柯青, 张利. Duchenne 型肌营养不良症自然病程演变规律[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2015, 15(5): 355-359.
- [3] 金润铭, 费洪宝. 进行性肌营养不良的研究进展[J]. 国外医学: 儿科学分册, 1998, 25(2): 16-19.
- [4] Hofstra RM, Mulder IM, Vossen R, et al. DGGE-based whole-gene mutation scanning of the dystrophin gene in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients[J]. Hum Mutat, 2004, 23(1): 57-66.
- [5] Tuffery-Giraud S, Saquet C, Chambert S, et al. The role of muscle biopsy in analysis of the dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy: experience of a National referral centre[J]. Neuromuscul Disord, 2004, 14(10): 650-658.
- [6] Flanigan KM, Dunn DM, Von Niederhausern A, et al. Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort[J]. Hum Mutat, 2009, 30(12): 1657-1666.
- [7] Oudet C, Hanauer A, Clemens P, et al. Two hot spots of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions[J]. Hum Mol Genet, 1992, 1(8): 599-603.
- [8] 高杨洁, 吕俊兰. 杜氏肌营养不良携带者的诊断与早期干预[J]. 中国实用儿科杂志, 2015, 30(1): 47-50.

(收稿日期: 2016-02-17 修回日期: 2016-04-28)