

· 短篇论著 ·

# MLPA 技术在 DMD 基因外显子拷贝数变异家庭基因诊断及产前诊断中的应用

曾玉坤, 刘玲, 罗晓辉, 丁红珂, 余丽华, 张彦<sup>△</sup>  
(广东省妇幼保健院医学遗传中心, 广东广州 511400)

**摘要:**目的 分析多重连接依赖探针扩增(MLPA)技术在 DXD 基因外显子拷贝数变异家庭基因诊断及产前诊断中的应用价值。方法 选取 2018 年 1 月至 2019 年 1 月就诊于该院产前诊断门诊, 基因检测结果明确为 DMD 基因缺失或重复突变的 14 例杜氏肌营养不良症患者(先证者)作为研究对象, 通过使用 MLPA 技术针对 DMD 基因全部 79 个外显子进行缺失和重复突变检测, 对先证者、先证者母亲及其再次妊娠所怀胎儿进行基因诊断及产前诊断。结果 DMD 基因 MLPA 检测结果显示, 先证者拷贝数缺失突变 13 例, 重复突变 1 例; 家系 1~8 先证者拷贝数缺失或重复片段遗传自其母亲; 胎儿拷贝数杂合缺失突变 3 例, 杂合重复突变 1 例, 其余 10 例胎儿未检测到外显子缺失或重复。结论 MLPA 技术是一种灵敏、准确、高效的分子诊断方法, 该方法能对 DMD 基因外显子拷贝数进行相对定量, 从而明确致病因素, 更好地为杜氏肌营养不良症家庭优生优育提供指导意义。

**关键词:**多重连接依赖探针扩增技术; 杜氏肌营养不良症; DMD 基因; 产前诊断; 基因诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.12.028

中图分类号: R746.2

文章编号: 1673-4130(2020)12-1524-03

文献标识码: B

杜氏肌营养不良症是一种由 DMD 基因缺失、重复或点突变导致的致死性 X 连锁隐性遗传神经肌肉疾病, DMD 基因位于 X 染色体短臂 Xp21 处, 是目前发现的人类最大的基因, 发病率为 1/3 500<sup>[1-3]</sup>。杜氏肌营养不良症一般以男性多发, 女性大多为致病基因携带者, 主要临床表现为进行性、对称性肌无力, Gower 征阳性, 腓肠肌假性肥大。大多数患者在 3~5 岁发病, 病情进展迅速, 6 岁以后出现行走困难, 约 10 岁时多数患者就需使用轮椅生活, 20~30 岁时患者可因呼吸衰竭而死亡<sup>[3-5]</sup>, 该病至今尚无治愈方法。目前, 针对有杜氏肌营养不良症家族史的家庭进行产前诊断是避免生育杜氏肌营养不良症患儿的重要方法。多重连接依赖探针扩增(MLPA)技术是一种在单一反应管内同时检测多达几十个不同核苷酸序列拷贝数变异的检测方法<sup>[6]</sup>。本研究采用 MLPA 技术对存在杜氏肌营养不良症生育史的家庭进行基因诊断和产前诊断, 进一步探讨了 MLPA 技术的应用价值, 现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2018 年 1 月至 2019 年 1 月就诊于本院产前诊断门诊, 临床表现为运动功能减退和进行性肌无力, 血清肌酸激酶(CK)水平显著升高, 基因检测结果明确为 DMD 基因缺失或重复突变的杜氏肌营养不良症患者(先证者)为研究对象, 纳入标准: 明确诊断为杜氏肌营养不良症的患儿, 且其母亲再次

妊娠, 并要求进行产前诊断。最终纳入 14 个家系包括先证者、先证者母亲及胎儿共 42 例作为研究组。同时选取血清 CK 及心电图正常, 临床诊断排除杜氏肌营养不良症的 3 例健康成年男性作为对照组(依据杜氏肌营养不良症为 X 连锁隐性遗传的特点, 排除该病的健康成年男性可排除患者及携带者的可能性, 适于作为检测时的内对照使用)。研究组一般资料见表 1。

表 1 研究组一般资料

家系	先证者性别	先证者年龄(岁)	先证者母亲年龄(岁)	产前诊断标本类型
家系 1	男	9	31	羊水
家系 2	男	12	31	羊水
家系 3	男	3	34	绒毛
家系 4	男	7	25	绒毛
家系 5	男	11	37	羊水
家系 6	男	14	37	羊水
家系 7	男	13	36	羊水
家系 8	男	15	40	羊水
家系 9	男	11	36	羊水
家系 10	男	9	36	羊水
家系 11	男	11	31	羊水
家系 12	男	9	31	羊水
家系 13	男	7	30	羊水
家系 14	男	5	31	羊水

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取** 抽取所有先证者及其母亲外周

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: zhangyan1981\_2003@aliyun.com.

静脉血各 2 mL,以乙二胺四乙酸二钾抗凝。采用血液基因组 DNA 提取试剂盒(厦门致善生物科技股份有限公司)提取外周血标本基因组 DNA,操作方法严格按照说明书进行。所有先证者母亲再次妊娠时在妊娠中期抽取羊水或绒毛标本进行产前诊断,羊水和绒毛标本均采用 Qiagen DNA MINI Kit 50 试剂盒进行 DNA 提取,操作方法严格按照说明书进行。对照组采集外周静脉血 2 mL,与研究组同批次、使用同种方法提取 DNA,于 -20 °C 中保存备用。上述提取的所有研究对象的全基因组 DNA 使用 NanoDrop 2000 分光光度计(美国 Thermo 公司)测得外周血 DNA 水平平均大于 100 ng/μL,羊水 DNA 和绒毛 DNA 水平平均大于 30 ng/μL,  $A_{260}/A_{280}$  为 1.8~2.0。

**1.2.2 羊水和绒毛标本污染鉴别** 提取的羊水 DNA 和绒毛 DNA 均采用荧光 PCR 毛细管电泳法检测母亲和胎儿第 13、18、21 号染色体上的 13 个微卫星多态标记位点,用以对羊水和绒毛标本进行污染鉴别,防止漏诊或因母源污染而引起的误诊。

**1.2.3 MLPA 检测及结果分析** 使用 SALSA MLPA P034-B2 和 P035-B1 DMD 试剂盒(荷兰 MRC Holland 公司)对研究对象进行拷贝数变异检测。操作流程及后续数据分析方法按照试剂盒说明书进行,主要操作步骤,(1)变性:依据提取的标本基因组 DNA 水平使用相应的试剂盒洗脱液将基因组 DNA 稀释至 5 μL(DNA 总量为 100~200 ng),95 °C 变性

5 min。(2)杂交:将变性后的基因组 DNA 冷却至 25 °C,分别加入 1.5 μL P034-B2 和 P035-B1 探针,再加入 1.5 μL MLPA Buffer,60 °C 杂交过夜(约 16 h)。(3)连接:将温度降至 54 °C,加入 32 μL 连接混合物(3 μL Buffer A、3 μL Buffer B、25 μL H<sub>2</sub>O、1 μL Ligase-65),54 °C 连接 15 min,然后 98 °C 5 min 终止连接反应。(4)PCR 扩增:温度降至 25 °C,加入 10 μL PCR 混合物(7.5 μL H<sub>2</sub>O、2 μL PCR Primer mix、0.5 μL SALSA Polymerase);PCR 扩增条件为:95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个扩增循环;循环完成后于 72 °C 再延伸 20 min。(5)毛细管电泳分离及数据分析:PCR 扩增产物通过 ABI 3500 毛细管电泳仪进行电泳分离,观察各扩增产物电泳后的峰形图,以对照组的检测结果作为内对照,对检测的原始结果使用 Coffalyser Net 软件(荷兰 MRC-Holland 公司)进行分析。

**2 结 果**

本研究利用 MLPA 技术对 14 例先证者、先证者母亲和胎儿进行了 DMD 基因所有外显子拷贝数变异检测,其中先证者拷贝数缺失突变 13 例,重复突变 1 例,10 例先证者发生 45~54 号区域内外显子半合子缺失;家系 1~8 先证者拷贝数缺失或重复片段遗传自其母亲;胎儿拷贝数杂合缺失突变 3 例,杂合重复突变 1 例,其余 10 例胎儿未检测到外显子缺失或重复,未重复先证者基因型。见表 2。

表 2 14 个家系 DMD 基因 MLPA 检测结果

家系	先证者 DMD 基因检测结果	先证者母亲 DMD 基因检测结果	胎儿 DMD 基因检测结果
家系 1	第 20~41 号外显子半合子缺失	第 20~41 号外显子杂合缺失	未检测到外显子缺失或重复
家系 2	第 50~52 号外显子半合子缺失	第 50~52 号外显子杂合缺失	第 50~52 号外显子杂合缺失
家系 3	第 46~51 号外显子半合子缺失	第 46~51 号外显子杂合缺失	第 46~51 号外显子杂合缺失
家系 4	第 49~50 号外显子半合子缺失	第 49~50 号外显子杂合缺失	未检测到外显子缺失或重复
家系 5	第 45~50 号外显子半合子缺失	第 45~50 号外显子杂合缺失	未检测到外显子缺失或重复
家系 6	第 45 号外显子半合子缺失	第 45 号外显子杂合缺失	未检测到外显子缺失或重复
家系 7	第 12~16 号外显子半合子重复	第 12~16 号外显子杂合重复	第 12~16 号外显子杂合重复
家系 8	第 44 号外显子半合子缺失	第 44 号外显子杂合缺失	第 44 号外显子杂合缺失
家系 9	第 45~50 号外显子半合子缺失	未检测到外显子缺失或重复	未检测到外显子缺失或重复
家系 10	第 45~50 号外显子半合子缺失	未检测到外显子缺失或重复	未检测到外显子缺失或重复
家系 11	第 20~41 号外显子半合子缺失	未检测到外显子缺失或重复	未检测到外显子缺失或重复
家系 12	第 46~50 号外显子半合子缺失	未检测到外显子缺失或重复	未检测到外显子缺失或重复
家系 13	第 48~50 号外显子半合子缺失	未检测到外显子缺失或重复	未检测到外显子缺失或重复
家系 14	第 48~54 号外显子半合子缺失	未检测到外显子缺失或重复	未检测到外显子缺失或重复

**3 讨 论**

杜氏肌营养不良症病死率高、预后不良,且至今尚无有效治疗方法,给患者家庭和社会带来了沉重的负担。为了避免杜氏肌营养不良症患儿的出生,针对有该患儿生育史的家庭,在明确先证者致病基因及类型的前提下进行产前诊断是预防该病发生的有效手段<sup>[7]</sup>。

DMD 基因位于染色体 Xp21 区,全长约 2.4 Mb,有 79 个外显子,编码了 3 685 个氨基酸,组成相对分

子质量约为  $427 \times 10^3$  的细胞骨架蛋白-抗肌萎缩蛋白<sup>[8]</sup>。DMD 基因突变类型多样,已报道的就有 7 000 余种<sup>[9]</sup>,其中主要以片段缺失最为常见,约占 65%;其次为片段重复,约占 10%;其他类型的致病突变包括点突变、微缺失等<sup>[10-11]</sup>。相关研究表明,虽然遗传所致的 DMD 突变约占 2/3,但新发突变占比高达 1/3<sup>[12]</sup>,所以无杜氏肌营养不良症生育史或家族史的家庭仍需要重视该病的可能发病风险。

本研究 14 个家系中先证者 DMD 基因拷贝数缺

失突变 13 例,重复突变 1 例,且所检测的拷贝数缺失、重复突变基本覆盖该基因所有外显子,其中第 45~54 号区域内外显子发生缺失的频率相对较高,本研究的 14 例先证者中有 10 例的拷贝数缺失突变与此区域内的外显子有关,这与国内相关文献报道的热点缺失区域相符<sup>[3,5]</sup>。8 个家系中先证者的 DMD 基因缺失或重复片段遗传自其母亲,另有 6 个家系先证者均明确存在 DMD 基因缺失突变,但其母亲并未携带相同的致病突变,这些患儿可能是由其母亲卵子形成时 DMD 基因发生新发突变或其母亲存在生殖细胞嵌合所致。按照《中国假肥大型肌营养不良症诊治指南》的建议,生育过杜氏肌营养不良症患儿的母亲再次妊娠时应进行产前基因诊断<sup>[1]</sup>。

MLPA 技术通过探针和靶序列 DNA 进行杂交、连接、PCR 扩增、毛细管电泳分离及数据收集,再到后续的结果分析、得出结论,整个操作仅需 1 次反应就可以检测几十个靶序列拷贝数的改变,因而相较于传统针对 79 个外显子区域进行逐个序列检测的分析方法有了极大简化,检测效率得到了明显提高。此外,由于特殊的检测原理,MLPA 技术检测灵敏度与特异性也非常高,相关数据表明其检测准确度高达 99%<sup>[13]</sup>。MLPA 检测试剂盒的商业化生产也使其检测操作变得更加简便、稳定、重复性好。

MLPA 技术虽然具备较多优点,但仍存在不能检测未知的点突变及平衡易位等局限性,如果探针结合序列内存在点突变或微缺失等情况会导致外显子缺失,检测出现假阳性结果<sup>[14]</sup>,因而对于临床症状明显,MLPA 检测阴性的受检者,后续仍需要进行 DNA 测序以排除包括点突变、微缺失、微重复等其他突变类型。此外,鉴于 MLPA 技术会由于 DNA 变性不完全、盐污染等因素而导致探针检测信号的降低,使检测结果所显示的拷贝数比值处于临界值区间内,此种情况也需要进行重复检测验证,以保证结果的准确性<sup>[15]</sup>。

综上所述,运用 MLPA 技术能快速、准确且相对简便地检测 DMD 基因所有外显子拷贝数变异,这为有杜氏肌营养不良症患儿生育史的家庭明确致病因素提供了有效手段,同时为这类具有再生育意愿的家庭避免再次生育杜氏肌营养不良症患儿提供了科学的指导依据。

## 参考文献

[1] 中华医学会神经病学分会. 中国假肥大型肌营养不良症诊治指南[J]. 中华神经科杂志, 2016, 49(1): 17-20.  
 [2] 冯善伟,梁颖茵,操基清. 假肥大型肌营养不良症的基因型与临床表型关系分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2012, 29(6): 653-657.  
 [3] 钟青燕,严提珍,曾婷,等. MLPA 技术在假肥大型肌营养

不良症基因检测和产前诊断中的应用[J]. 中国儿童保健杂志, 2017, 25(4): 342-345.

- [4] KURAOKA M, KIMURA E, NAGATA T, et al. Serum osteopontin as a novel biomarker for muscle regeneration in duchenne muscular dystrophy[J]. *Am J Pathol*, 2016, 186(5): 1302-1312.  
 [5] 刘晶,黄志. 假性肥大型肌营养不良症发病机制及治疗进展[J]. 儿科药学杂志, 2014, 20(7): 53-56.  
 [6] EVERS L J, ENGELEN J J, HOUBEN L M, et al. The use of two different MLPA kits in 22q11. 2 deletion syndrome[J]. *Eur J Med Genet*, 2016, 59(4): 183-188.  
 [7] 王蕾,朱宝生,郭晶晶. 多重连接依赖探针扩增技术在假肥大型肌营养不良症基因诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(4): 301-303.  
 [8] NALLAMILI B R, ANKALA A, HEGDE M. Molecular diagnosis of duchenne muscular dystrophy[J]. *Curr Protoc Hum Genet*, 2014, 83(1): 179-185.  
 [9] BLADEN C I, SALGADO D, MONGERS, et al. The TREAT-NMD DMD global database: analysis of more than 7 000 duchenne muscular dystrophy mutations[J]. *Hum Mutat*, 2015, 36(4): 395-402.  
 [10] FLANIGAN K M, DUNN D M, 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.  
 [11] TUFFERY-GIRAUD S, BEROUD C, LETURCQ F, et al. Genotype-phenotype analysis in 2 405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase[J]. *Hum Mutat*, 2009, 30(6): 934-945.  
 [12] ROUCHER B F, MENASSA R, STREICHENBERGER N, et al. A splicing mutation in the DMD gene detected by next-generation sequencing and confirmed by mRNA and protein analysis[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 448: 146-149.  
 [13] SAXENA S, GOWDHAMAN K, KANI P, et al. Improved multiplex ligation-dependent probe amplification (i-MLPA) for rapid copy number variant(CNV) detection[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 450: 19-24.  
 [14] KONDRASHOVA O, LOVE C J, LUNKE S, et al. High-throughput amplicon-based copy number detection of 11 genes in formalin-fixed paraffin-embedded ovarian tumour samples by MLPA-seq [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143006.  
 [15] GOUAS L, KEMENY S, BEAUFRERE A M, et al. Prenatal screening of 21 microdeletion/microduplication syndromes and subtelomeric imbalances by MLPA in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2015, 146(1): 28-32.