

脊髓性肌萎缩症单体型连锁分析和单细胞扩增 方法的建立及应用研究

研究生：苏峻峰

导 师：王 柠 教授

吴志英 教授

摘 要

目的：1、优化脊髓性肌萎缩症（SMA）产前基因诊断体系。

2、建立单细胞扩增技术平台。

3、应用单细胞扩增方法对 SMA 进行基因诊断研究。

方法：1、应用聚合酶链反应-聚丙烯酰胺凝胶电泳（PCR-PAGE）技术对和运动神经元生存基因（SMN）紧密连锁的短串联重复（STR）位点进行等位频率分析。

2、联合运用 PCR-限制性酶切、变性高效液相色谱（DHPLC）、STR 连锁分析及基因扫描技术对 SMA 家系进行产前诊断。

3、应用巢式 PCR、引物延伸预扩增（PEP）及荧光 PCR 对单个淋巴细胞进行扩增。

4、应用 PCR-限制性酶切技术对正常人及 SMA 患者单个淋巴细胞进行 SMN1 缺失检测。

结果：1、从 11 个与 SMN 基因连锁的 STR 位点中优选出了 3 个多态信息含量丰富、杂合率高的位点。

2、应用优选出的 3 个 STR 位点（D5S435、D5F149、D5S351）进行 SMA 家系连锁分析，并联合应用基因扫描、PCR-限制性酶切及 DHPLC 进行产前基因诊断，结果准确、可靠。

3、用巢式 PCR、引物延伸预扩增法扩增单细胞，扩增率分别为 90%和 85%。

4、巢式 PCR、引物延伸预扩增单细胞 SMN 基因 7、8 号外显子，PCR 产物进行限制性酶切，结果和从全血中抽提 DNA 后 PCR-限制性酶切结果一致。

结论：1、联合 PCR-限制性酶切、DHPLC、STR 连锁分析及基因扫描技术使 SMA 产前诊断结果更准确、可靠。

2、用单细胞 PCR-限制性酶切方法可以对 SMA 患者进行基因诊断，为 SMA 植入前诊断奠定了基础，并为其它的神经遗传病植入前诊断提供了技术支持。

关键词：脊髓性肌萎缩症（SMA）；短串联重复序列（STR）；单体型连锁分析；单细胞扩增；基因扫描

Establishment and Application of Haplotype Analysis and Single Cell PCR in Spinal Muscular Atrophy

Master Candidate: Jun-feng Su

Supervisors: Prof. Ning Wang

Prof. Zhi-Ying Wu

Abstract

Objectives: 1.To optimize the prenatal diagnosis system of spinal muscular atrophy (SMA).

2.To establish the technique of single cell PCR.

3.To apply single cell PCR in the gene diagnosis of SMA.

Methods: 1.PCR-PAGE was applied to analyze the polymorphisms of STR loci that tightly linkage to survival motor neuron (SMN) gene.

2.PCR-restriction enzyme digestion, DHPLC, STR linkage analysis and GeneScan were applied to prenatal diagnosis of SMA.

3.Nest-PCR, PEP and fluorescent PCR were applied to amplify single lymphocyte.

4.PCR-restriction enzyme digestion technique was applied to detect the deletion of SMN1 gene in single cell.

Results: 1.Three STR loci picked out from eleven STR loci tightly linkage to SMN gene had abundant polymorphism and high rate of heterozygosis.

2.Three STR loci (D5S435, D5F149, D5S351) were applied in linkage analysis, which made the results of prenatal diagnosis more accurate and reliable.

3.Amplification rate of nest-PCR and PEP was 90% and 85%, respectively.

4.Exon 7 and 8 of SMN1 gene in single cell were amplified by nest-PCR and PEP, then the PCR products were digested by restriction enzyme, the results of single cell were consistent with those of whole blood.

Conclusions: 1.Prenatal diagnosis of SMA was more accurate and reliable by the combination of PCR-restriction enzyme digestion, DHPLC, STR linkage analysis and GeneScan.

2.PCR-restriction enzyme digestion of single cell can be applied in gene diagnosis of SMA, which is the basis of implantation genetic diagnosis of SMA and also provides the technical support for implantation genetic diagnosis of other genetic disease.

Keywords: Spinal Muscular Atrophy (SMA), Short Tandem Repeat (STR), Haplotype Analysis, Single Cell PCR, GeneScan

前 言

脊髓性肌萎缩症 (spinal muscular atrophy, SMA) 是一类较常见的遗传性疾病, 儿童期起病的 SMA 呈常染色体隐性遗传, 群体发病率为 1/6000-1/10000。临床表现为进行性对称性肌无力及肌萎缩, 近端重于远端, 下肢重于上肢, 其主要病理变化为脊髓前角 α -运动神经元退行性变。根据起病年龄和病情程度, 临床上将儿童期起病的 SMA 分为 3 型: I 型即 Werdnig-Hoffman 病, 是婴儿期最常见的致死性遗传病之一, 患儿通常在出生后 6 个月内发病, 表现为严重的全身肌无力和肌张力低下, 不能独坐, 多在 2 岁内死于呼吸肌麻痹; II 型为中间型, 多在生后 6-18 个月间发病, 患儿能独坐, 但不能独自站立和行走, 大多能存活至 2 岁以上; III 型又称 Kugelburg-Welander 病, 多在出生 18 个月后发病, 症状较轻, 可存活至成年。成人型 SMA 常于 30 岁以后起病, 肌无力、肌萎缩常不对称, 无明确的遗传规律, 该型不在本研究范围之内。

1995 年, 国外学者先后在 5q11.2-13.3 区域确定了 4 个与 SMA 有关的基因^[1-4]: 运动神经元生存 (survival motor neuron, SMN) 基因、神经元调亡抑制蛋白 (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein, NAIP) 基因、基本转录因子 Iip44 亚单位 (the basal transcription factor p44 Subunit, BTF2P44) 基因及 H4F5 基因。这 4 个基因及其中心粒侧的假基因在 5q11.2-13.3 区域呈镜像样排列 (如图 1 所示), 其中 SMN 为 SMA 的致病基因, 其余均为修饰基因。SMN 基因存在 SMN1、SMN2 两个拷贝, 二者之间仅有 5 个碱基的差异。94% SMA 患者 SMN1 基因缺失而 SMN2 存在^[5, 6], 因此可通过判断 SMN1 基因缺失与否来进行 SMA 基因诊断。有 35% 的正常人缺乏 SMN2 基因, 而 SMN1 正常, 提示 SMN2 虽不重要, 但可能干扰 SMN1 的缺失检测。另有研究发现, SMN2 拷贝数与 SMA 严重程度呈负相关, 表明在 SMN1 缺失的情况下, SMN2 可能起到一定的代偿作用^[7]。

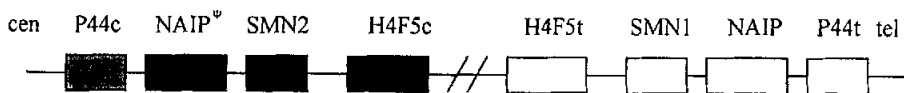


图 1 5q13 区域基因结构模式图

SMA 目前尚无肯定有效的治疗方法, 患者生活质量明显下降, 给社会和家庭带来沉重负担, 因此进行准确产前诊断尤其重要。目前产前诊断一般是通过采集孕早期或中期的

羊水、绒毛、脐带血或宫颈脱落滋养层细胞来进行。但这些方法存在母血污染的可能,为排除母血污染,国内外采取了不同的方法,如羊水细胞培养、短串联重复(Short Tandem Repeat, STR)位点单体型连锁分析等。羊水细胞培养耗时较长,且成功率不高。STR连锁分析是一种传统的产前基因诊断方法,不仅可进行快速产前诊断,而且可有效地排除母血污染,检测携带者。但STR位点在不同人种、不同地域之间存在差异。国内也有运用STR连锁分析进行产前诊断排除母血污染的报道^[8,9],但所选STR位点携带的遗传信息量较少,聚丙烯酰胺凝胶电泳时带型难以有效区分。因此优选多态信息量丰富、带型能有效区分并适合于中国人群的STR位点对完善SMA产前基因诊断体系具有极其重要的意义。本研究第一部分从GeneBank及文献报道中挑选出11个与SMN基因紧密连锁的STR位点,从中优选出遗传信息量丰富的位点进行SMA家系连锁分析,并联合应用我们前期建立的PCR-限制性酶切、变性高效液相色谱(Denaturing High Performance Liquid Chromatography, DHPLC)^[10,11]及基因扫描等技术进行SMA产前基因诊断,使产前基因诊断体系进一步完善,确保产前诊断的结果准确、可靠。

另一方面,绒毛取样,羊膜腔穿刺,胎儿脐带穿刺等手术操作有出血、流产、宫腔感染等并发症,当产前诊断为患病胎儿后必须进行人工流产以阻止患儿的出生,这也将给孕妇造成巨大的身心创伤。1990年,Handyside等应用植入前诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)技术对胚胎进行性别诊断并选择性地植入女性胚胎,避免了有高危X染色体连锁疾病的发生,开创了PGD应用于人类的先河。植入前诊断,即指对体外受精(in vitro fertilization, IVF)发育至6~8细胞期的胚胎,在显微操作下活检1~2个单卵裂球细胞或直接获取受精前后的极体,通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)或荧光原位杂交(FISH)分析,进行快速的遗传学诊断,选择正常的胚胎植入子宫内,从而获得健康的胎儿。它既可为遗传病高危妇女提供尽可能大的选择范围,又可为实行IVF的夫妇提高受孕率,把遗传性疾病控制在胚胎发育的最早阶段,减少了病人的痛苦,且在伦理上也比较容易接受。但由于受检标本仅为1~2个细胞,其DNA量极少,因此必须建立成熟的单细胞扩增方法,以确保植入前诊断的成功。目前国内尚未见单细胞扩增技术在SMA基因诊断中应用的报道。本研究第二部分采用巢式PCR、引物延伸预扩增及荧光PCR等技术进行SMA单细胞扩增研究,并将巢式PCR、引物延伸预扩增应用到SMA的基因诊断中,为SMA植入前诊断建立可靠的技术平台。

第一部分 脊髓性肌萎缩症 STR 位点的优选及 其在产前基因诊断中的应用研究

脊髓性肌萎缩症(Spinal Muscular Atrophy, SMA)是一种发病率较高的常染色体隐性遗传病。目前尚无肯定有效的治疗方法,因此进行准确的产前基因诊断防止患儿出生对提高人口素质具有重要意义。目前SMA产前基因诊断大多是通过采集羊水来进行,在操作过程中存在母血污染的可能。STR连锁分析是一种传统的产前基因诊断方法,不仅可进行快速产前诊断,还可判断有无母血污染存在,检测携带者。自1994年以来,文献报道共有10余种STR位点被应用于SMA产前诊断中^[12, 13],但STR位点在不同人种、不同地域之间差异较大,上述这些位点不一定都适合我国人群。目前国内现有的报道中所选用的STR位点携带的遗传信息量较少,且聚丙烯酰胺凝胶电泳时带型难以有效区分。本研究从11个与SMN1基因紧密连锁的STR位点中优选出遗传信息量丰富的位点进行SMA家系连锁分析,并联合应用我们前期建立的PCR-限制性酶切、DHPLC及基因扫描等技术进行SMA产前基因诊断,确保结果准确、可靠。

材料与方法

一、研究对象

1、100名正常人均均为福建医科大学2004级体检的研究生,分别来自福建,山西,山东,湖北,湖南等省,以福建为主。

2、6个SMA家系均来自我院神经内科门诊,6例先证者中,男5例,女1例,起病年龄1~12个月,其中I型2例,II型4例,完全符合1992年SMA国际协作会议制定的临床诊断及分型标准^[14],且均经PCR-限制性酶切及DHPLC确诊为SMN1基因缺失的患者。6名胎儿也均经PCR-限制性酶切及DHPLC证实为无SMN1基因缺失,为进一步明确是否为基因携带者并排除母血污染而进行STR连锁分析。

二、主要实验材料、试剂及仪器

(一) 主要实验材料和试剂

- 1、丙烯酰胺及甲叉双丙烯酰胺(上海博亚生物技术有限公司)
- 2、尿素(厦门泰京生物技术有限公司)
- 3、过硫酸铵粉剂(上海博亚生物技术有限公司)
- 4、TEMED (N, N, N, N' -四甲基乙二胺)(上海博亚生物技术有限公司)

- 5、Taq酶及10x缓冲液（上海博亚生物技术有限公司）
- 6、10mM dNTP（上海博亚生物技术有限公司）
- 7、PGEM-3Zf(+)DNA/HaeIII Marker(上海博亚生物技术有限公司)
- 8、GFX™基因组DNA抽提试剂盒（Amersham Biosciences公司）
- 9、POP-4™ 310基因分析仪分离胶(美国Applied Biosystems公司)
- 10、GeneScan™-500 荧光标记分子量内标及去离子甲酰胺(美国ABI公司)
- 11、硝酸银粉剂(广东汕头市西陇化工厂)

(二) 主要仪器

- 1、9700型PCR仪（美国Applied Biosystems公司）
- 2、310型基因分析仪（美国Applied Biosystems公司）
- 3、DYC-2813型电泳槽(北京市六一仪器厂)
- 4、DYY-8B型稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂)
- 5、HH-2型数显恒温水浴锅（江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司）
- 6、TS-I型脱色摇床:(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司)

三、实验方法

(一) 基因组DNA的抽提：取2~4mL外周血，用GFX™DNA抽提试剂盒抽提基因组DNA，按试剂盒说明操作。羊水DNA抽提：在妇产科医师协助下收集SMA携带者孕4~5个月羊水30~50mL，注意不要混有孕妇血液或组织，2000rpm离心10分钟收集沉淀组织，GFX™DNA抽提试剂盒抽提基因组DNA。

(二) STR单体型连锁分析

1、PCR扩增：在5q11.2-13.3区域挑选与SMN基因紧密连锁的11个STR位点进行PCR扩增，部分引物参照美国国家医学图书馆数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，部分引物自行设计。反应体系25uL，10xPCR 缓冲液 2.5uL，10mmol/LdNTP mix 0.5uL，25umol/L上下游引物 0.5uL，TaqDNA聚合酶 1.25单位，双蒸水21uL，DNA模板100ng，反应条件为：94℃预变性2min，94℃变性30s，退火30s，72℃延伸45s，30个循环，最后72℃延伸5min。引物序列及退火温度见表1。

表1 11个STR位点引物序列及退火温度

STR位点	正向引物序列 (5' →3')	反向引物序列 (5' →3')	退火温度
D5S435	caagagcacagtttgagtgag	tggtcctaagatagggtgat	55°C
D5F153	gtttcactggatggaacggc	ggcttcctcctgagtatgca	56°C
D5F151	atcgccctcgaatgctatg	ctgttcactatgaagctatg	55°C
D5S637	tgaatctcaggagttgtgaa	ctgcatttaatactgcaatgaa	53°C
D5S464	caattcccatcatcagcctc	ttgaggaaattaaggcaggg	57°C
D5S1556	atttacttttccaagggggagg	catgttgcttaggcctcgtct	57°C
D5F149	cctccaccctgggtgataag	gctgatgaagttgtaggagcc	60°C
D5S351	accagcttatggcaacacagc	gatgagcattgccactttagc	62°C
MAP1B-5'	tccttcttccaaaaccagggtg aagcctc	aaatttctaggatgcttgcgggat ctcttc	55°C
D5S1413	gctacagccagatgagggaaatag	aaaataggttgtgaaaccaacgc	59°C
D5S125	aagaggactcccatgcttgttg	tagaaaatactacagtcttcttggg	57°C

2、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染

(1) 配制40%丙烯酰胺母液及固定液、显色液、染色液

①分别称取丙烯酰胺 38g 和甲叉双丙烯酰胺 2g 混合，加双蒸水定容至 100ml，即为 40%丙烯酰胺母液。

②固定液：无水乙醇 105ml+冰醋酸 5ml，定容至 1000ml。

③染色液：硝酸银 2g，加双蒸水定容至 1000ml，置棕色广口瓶中避光保存。

④显色液：称取氢氧化钠 15g，双蒸水 800ml 彻底溶解，加入 10.8ml 甲醛溶液后，再定容至 1000ml。

(2) 组装28B型电泳槽，插好梳子。

(3) 配制变性聚丙烯酰胺凝胶混合液：根据模具的容积，配制一块胶约需 40ml 混合液。分别取 40%丙烯酰胺母液 8ml、5xTBE 4ml 及尿素 20g，加双蒸水定容至 40ml，混匀，加入 10%过硫酸铵 400ul 及 TEMED 8ul，即配制成 8%的变性聚丙烯酰胺凝胶混合液。

(4) 倒胶，室温下放置 1-2 个小时使之聚合。

(5) 预电泳：电泳缓冲液为 0.5xTBE，温度 55°C，电压 500V，预电泳半小时。预电泳前先冲洗加样孔。

(6) 上样电泳。

①变性上样液：取 PCR 产物 5ul+加样缓冲液（甲苯青 FF 0.0083g, 溴酚蓝 0.0083g , 0.5mol/1EDTA PH8.0 100ul 加去离子甲酰胺至 10ml ）3ul, 95℃变性 5 分钟, 冰浴聚冷, 短暂离心。

②冲洗加样孔:取 50ml 注射器, 吸取电泳缓冲液后针头垂直深入加样孔底逐个冲洗。

③上样电泳: 500V 恒压, 55℃恒温电泳。电泳时间根据片段大小而定。

(7) 聚丙烯酰胺凝胶银染显色:

①固定: 停止电泳, 取出电泳槽中的玻璃模具, 小心撬起长玻板, 把胶倒入盛有固定液的瓷盘中, 置摇床上摇晃 15 分钟。

②染色: 弃固定液, 用双蒸水漂洗凝胶 2 次, 倒入染色液, 继续摇晃 15 分钟。

③显色: 用双蒸水漂洗凝胶 2 次, 每次不要超过 10 秒, 加显色液, 摇至条带显出停止。

④终止: 弃显色液, 漂洗凝胶 2-3 次, 倒入固定液终止反应, 约需 15 分钟。弃固定液, 继续漂洗凝胶 2-3 次。

⑤将凝胶移至滤纸上, 拍照保存。

3、基因扫描分析

(1) PCR扩增: 针对优选出的3个STR位点 (D5S435、D5F149、D5S351) 重新设计5' 端标记荧光染料FAM的引物, PCR扩增体系为25uL, 10xPCR 缓冲液2.5uL, 10mmol/LdNTP mix 0.5uL, 25umol/L上下游引物 0.5uL, TaqDNA聚合酶1.25单位, 双蒸水21ul, DNA模板100ng。反应条件为: 94℃预变性2min, 94℃变性30s, 退火30s, 72℃延伸45s, 30个循环, 最后72℃延伸5min。引物序列及退火温度如表2。

表2 3个STR位点荧光引物序列及退火温度

STR位点	正向引物序列 (5' -3')	反向引物序列 (5' -3')	退火温度
D5S435	FAMtggtcctaagatagggtgat	caagagcacagtttgagtgag	55℃
D5F149	FAMggaggctaaagtggaggat	aggaggcaatgtaataaatgttc	60℃
D5S351	FAMaagaccagtctatggcaacac	gtgagaccgaaaatgctgatg	62℃

(2) 310基因分析仪检测: 取PCR产物1uL、去离子甲酰胺10uL、荧光内标 (GeneScan™-500) 0.8uL混匀, 95℃变性5min, 迅速冰浴5min后上样于310基因分析仪进行电泳, 电压15KV, 胶温度60℃, 电泳28分钟, 用仪器自带的Data Collection software version 3.0进行数据收集, 结果用GeneScan analysis sofoware 3.7分析。

结 果

一、STR位点在正常中国人群中的等位频率分析及优选

1、STR 位点 PCR 扩增及变性聚丙烯酰胺凝胶电泳初步分析

我们利用小样本（30 名正常人）对 11 个 STR 位点进行 PCR 扩增，PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测为一条带，特异性好（图 2），PCR 产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测后，发现 3 个位点（D5S464、D5F153、D5S125）出现两条以上的带型（图 3），考虑为此 3 个位点在基因组中存在源性序列错配所致，无法进行等位频率分析，也不适宜进行 SMA 的连锁分析，遂首先将此 3 个位点剔除。



图2 11个STR位点琼脂糖电泳检测照片

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 分别代表 D5S435, D5F153, D5F151, D5S637, D5S1413, D5S125, D5S464, D5S1556, D5F149, D5S351, MAP1B-5' ; M 为 D2000 Marker

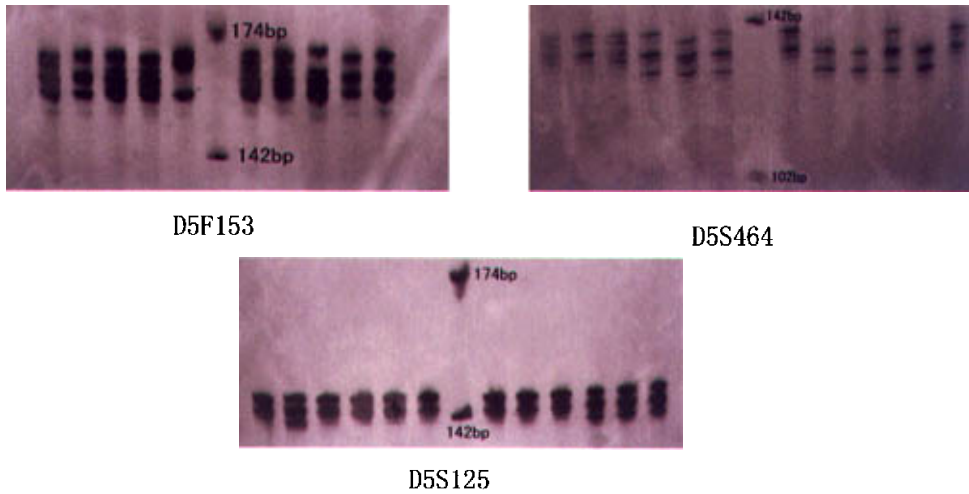


图3 D5S464、D5F153、D5S125位点变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测照片
Marker为pGEM-3Zf(+)/HaeIII

2、8 个 STR 位点在正常中国人群中的等位频率分析

我们对其余的 8 个位点进行正常人的多态频率检测, 总结出这 8 个 STR 位点在中国人群中的等位片段频率分布特征(表 3)。D5S435 位点有 7 种等位片段, 预期杂合率为 0.844, 实际观察值为 0.80, 多态性信息量(PIC)为 0.838; D5F149 位点有 14 种等位片段, 预期杂合率为 0.875, 实际观察值为 0.86, 多态性信息量(PIC)为 0.873; D5S351 位点有 13 种等位片段, 预期杂合率为 0.888, 实际观察值为 0.57, 多态性信息量 (PIC)为 0.886, 其余位点详见表 4、5。

该结果表明 8 个 STR 在中国人中具有长度多态性, 其中 D5S435、D5F149、D5S351 三个位点较其它位点多态性信息含量更丰富, 杂合率更高。图 4 是 8 个 STR 位点的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果照片。从图中同样可以看出 D5S435、D5F149、D5S351 三个 STR 位点较其它位点多态性信息量更丰富, 杂合率更高, 且在胶上带型容易区分。

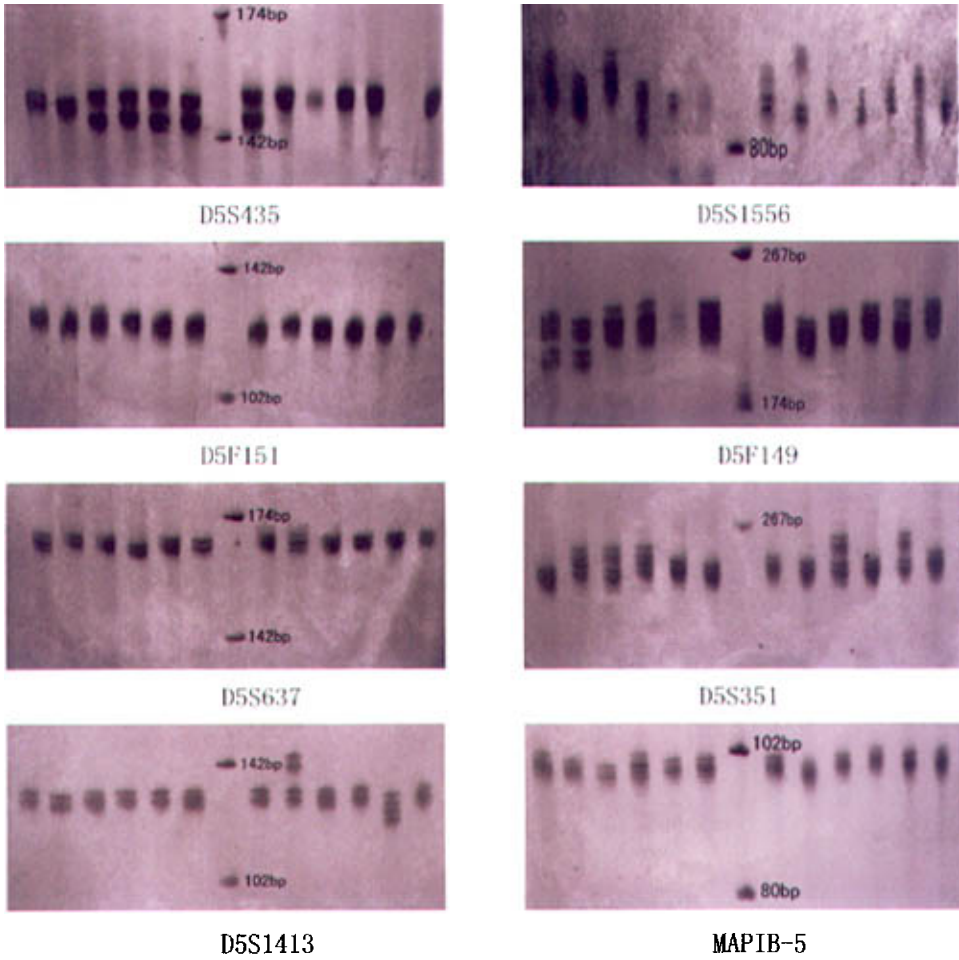


图4 8个STR位点的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测照片
Marker为pGEM-3Zf(+)DNA/HaeIII

表3 D5S435、D5F149、D5S351在30个正常中国人群中的等位频率分布

D5S435			D5F149			D5S351					
等位片段	长度 (bp)	数目	频率 (pi)	等位片段	长度 (bp)	数目	频率 (pi)	等位片段	长度 (bp)	数目	频率 (pi)
1	147	6	0.100	1	211	1	0.017	1	164	7	0.117
2	149	12	0.200	2	213	1	0.017	2	166	1	0.017
3	151	6	0.100	3	215	2	0.033	3	168	4	0.067
4	153	7	0.117	4	219	4	0.067	4	170	2	0.033
5	155	8	0.133	5	221	7	0.117	5	172	2	0.033
6	157	13	0.217	6	223	11	0.183	6	174	3	0.050
7	159	8	0.133	7	225	1	0.017	7	176	4	0.067
				8	227	12	0.200	8	178	7	0.117
				9	229	6	0.100	9	180	4	0.067
				10	231	7	0.117	10	182	2	0.033
				11	233	5	0.083	11	184	7	0.117
				12	235	1	0.017	12	186	13	0.217
				13	237	1	0.017	13	188	4	0.067
				14	239	1	0.017				
预期杂合率值 (Hi)			0.844				0.875				0.888
实际观察值			0.80				0.86				0.57
PIC值			0.838				0.873				0.886

$$H_i = 1 - \left(\sum_{j=1}^n P_j^2 \right), \quad i=1, 2, 3, \dots, n$$

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \sum_{j=i+1}^n \sum_{i=1}^n (2P_i^2 P_j^2), \quad i=1, 2, 3, \dots, n$$

表 4: D5S1413、MAPIB-5、D5S1556 在 30 个正常中国人人群中的等位频率分布

D5S1413			MAPIB-5'			D5S1556		
等位片段长度 (bp)	数目	频率 (pi)	等位片段长度 (bp)	数目	频率 (pi)	等位片段长度 (bp)	数目	频率 (pi)
1	130	0.017	1	96	0.050	1	83	0.017
2	132	0.183	2	98	0.217	2	85	0.117
3	134	0.450	3	100	0.583	3	87	0.633
4	136	0.300	4	102	0.150	4	89	0.150
5	138	0.017				5	91	0.067
6	140	0.017				6	93	0.017
7	144	0.017						
预期杂合率 (HI)		0.673			0.588			0.558
实际观察值		0.57			0.17			0.33
PIC 值		0.623			0.540			0.529

表 5: D5F151、D5S637 在 30 个正常中国人人群中的等位频率分布

D5F151			D5S637		
等位片段长度 (bp)	数目	频率 (pi)	等位片段长度 (bp)	数目	频率 (pi)
1	128	0.48	1	170	0.67
2	130	0.52	2	172	0.33
预期杂合率 (HI)		0.499			0.442
实际观察值		0.17			0.07
PIC 值		0.375			0.344

表6: D5S435、D5F149、D5S351在100个正常中国人人群中的等位频率分布

D5S435			D5F149			D5S351					
等位片段长度 (bp)	数目	频率 (pi)	等位片段长度 (bp)	数目	频率 (pi)	等位片段长度 (bp)	数目	频率 (pi)			
1	147	21	0.105	1	203	2	0.010	1	164	19	0.095
2	149	33	0.165	2	205	1	0.017	2	166	12	0.060
3	151	19	0.095	3	207	4	0.020	3	168	27	0.135
4	153	29	0.145	4	209	1	0.017	4	170	10	0.050
5	155	26	0.130	5	211	2	0.010	5	172	6	0.030
6	157	47	0.235	6	213	1	0.017	6	174	9	0.045
7	159	22	0.110	7	215	15	0.075	7	176	5	0.025
8	161	2	0.010	8	217	4	0.020	8	178	13	0.065
				9	219	17	0.085	9	180	11	0.055
				10	221	22	0.110	10	182	15	0.075
				11	223	18	0.090	11	184	24	0.120
				12	225	10	0.050	12	186	18	0.090
				13	227	13	0.065	13	188	8	0.040
				14	229	15	0.075	14	190	2	0.010
				15	231	28	0.140	15	192	11	0.055
				16	233	23	0.115	16	194	1	0.017
				17	235	13	0.065	17	196	7	0.035
				18	237	4	0.020	18	198	3	0.015
				19	239	7	0.035				
预期杂合率 (Hi)			0.847				0.914				0.921
实际观察值			0.79				0.85				0.62
PIC值			0.842				0.913				0.920

3、STR位点的优选及大样本分析

根据各个位点的PIC值、杂合率及等位基因的数量，优选出3个PIC值、杂合率高及等位基因数量多的STR位点（D5S435、D5F149、D5S351），并将样本数扩大到100个正常人（包括前期的30份样本），观察这3个位点的等位片段频率分布的变化。从表6中可以看出3个STR位点等位片段分别增加1、5、5个，PIC值及杂合率均有上升，充分说明了这3个位点的多态信息量丰富。在正常中国人群中D5S435位点以157bp片段多见，其它片段散在分布，D5F149位点多态性片段主要集中于219bp~235bp之间，其他片段出现频率较低，而D5S351位点以164、168bp、178bp~186bp片段出现的频率较高（图5、6、7）

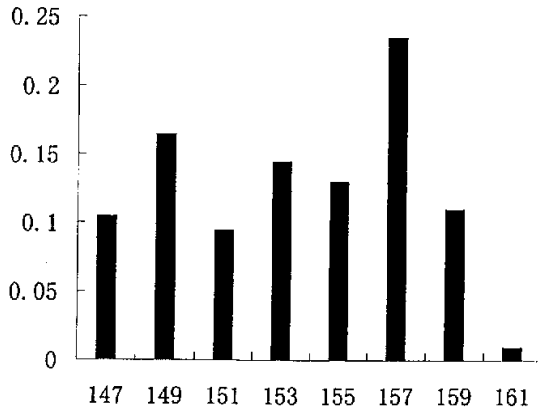


图5 D5S435在正常中国人群中的等位片段频度分布图

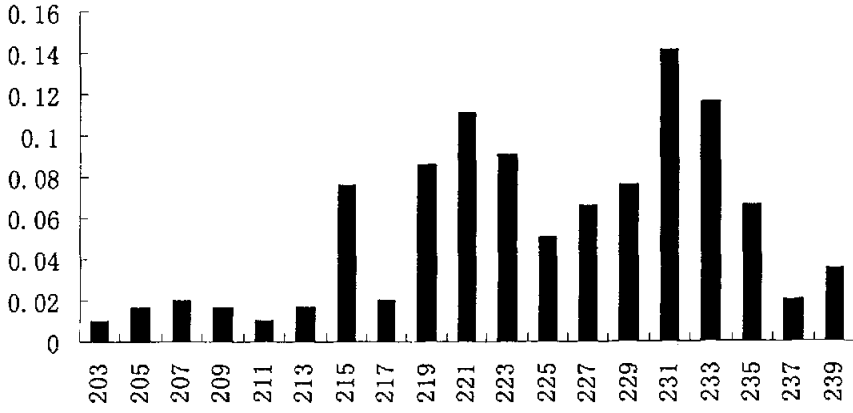


图6 D5F149在正常中国人群中的等位片段频度分布图

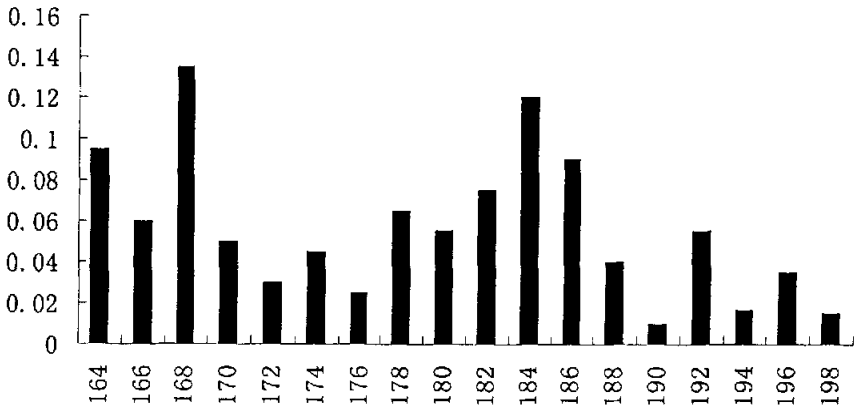


图7 D5S351在正常中国人群中的等位片段频度分布图

二、STR单体型连锁分析在SMA家系产前诊断中的应用

1、应用PCR-PAGE对SMA家系的单体型连锁分析。

我们应用3个STR位点对6个SMA家系成员进行单体型分析，均能得出每个家系成员的单体型。所有胎儿单体型均与先证者不完全相同，表明无SMN1基因缺失，结果与PCR-限制性酶切及DHPLC一致。图8为家系一的3个STR位点变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及单体型分析结果。在该家系中，STR多态均呈孟德尔遗传学分离，结合D5S435、D5F149、D5S351三个位点进行连锁分析，可以判断胎儿为携带者，且胎儿的单体型与母亲的单体型不一致，因此可以排除母血污染。用同样的方法我们在其余家系5名胎儿中发现3名携带者和2名正常人，且未发现母血污染。

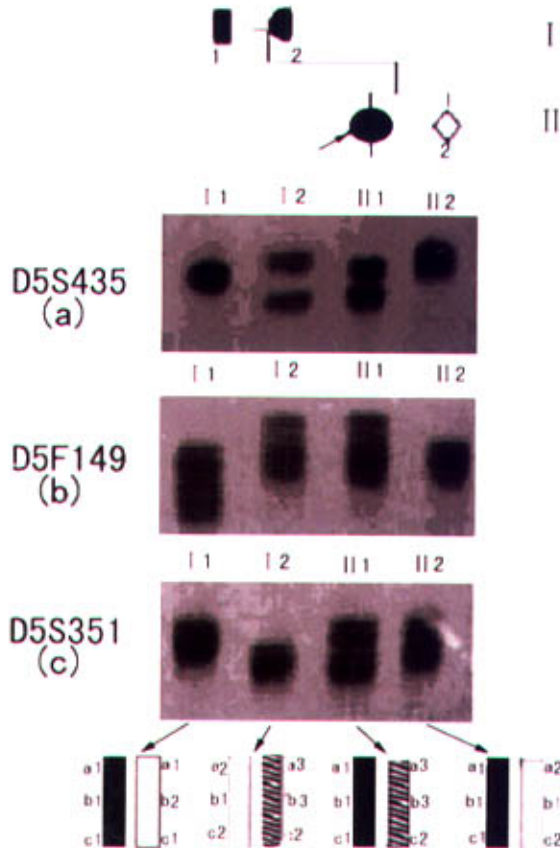


图8 SMA家系3个STR变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及连锁分析结果

2、应用基因扫描对SMA家系进行单体型连锁分析

3个STR位点基因扫描均能对SMA家系作出明确的单体型分析，且结果与PCR-PAGE结果一致，如图9中A为D5S435位点家系一连锁分析图，父亲为153bp纯合子，母亲为145bp, 157bp杂合子，而患者也为杂合子，一条来自父亲的153bp片段，一条来自母亲的157bp片段，胎儿为杂合子，145bp片段来自母亲，153bp片段来自父亲，因只有一条153bp片段的致病染色体，所以为携带者。胎儿的片段中不包括母亲的157bp片段，因此可以排除母血污染。D5F149、D5S351同样可以判断胎儿为携带者，排除母血污染。

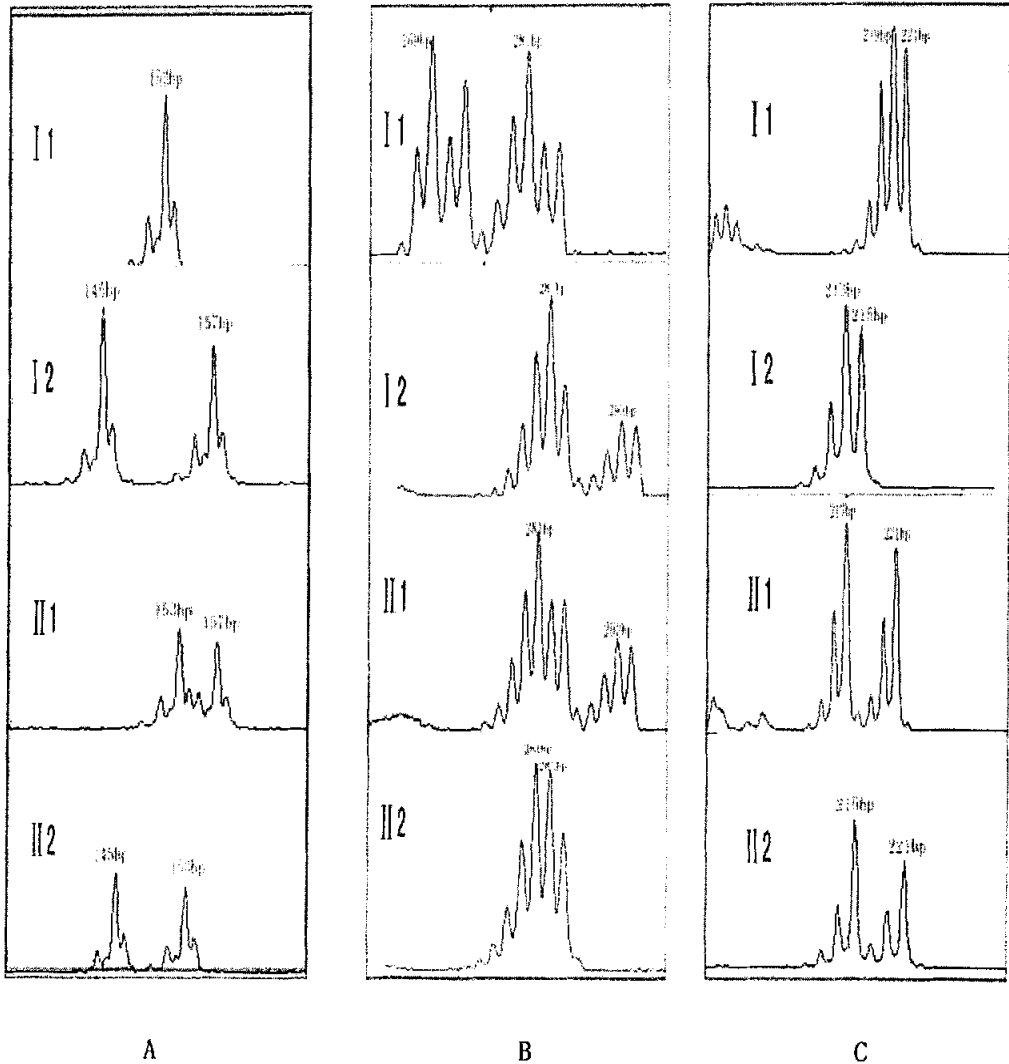


图9 SMA家系3个STR位点基因扫描图

A、B、C分别代表D5S435、D5F149、D5S351三个位点

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/318062142104007004>