

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00493

· 论 著 ·

外显子组测序在抗肌萎缩蛋白基因检测到一个新的剪接供体位点突变

丘丽萍[△], 林炎鸿[△], 郑德柱, 曾 健, 严爱贞, 兰风华*

第二军医大学福州临床医学院(南京军区福州总医院)遗传病分子诊断中心, 福州 350025

[摘要] **目的** 应用外显子组捕获和第2代测序技术检测抗肌萎缩蛋白基因(*dystrophin*)中的微小突变。**方法** 通过外显子组捕获和第2代测序技术对1例具有典型杜氏肌营养不良症(DMD)临床表现但没有外显子缺失或重复的患者进行*dystrophin*基因突变检测,并用Sanger测序证实检测结果。以生物信息学预测基因突变所致该基因编码情况的改变。以患者母亲和100名体检正常者作为对照。**结果** 在患者*dystrophin*基因内含子50的第1个碱基检测到1个碱基改变:G>C,其母亲在相同的位置发生了杂合改变。生物信息学预测此改变将使内含子50原有的5'剪接位点消失,导致其相应肽链C端氨基酸序列改变、终止密码提前出现。Sanger测序进一步证实了该突变的存在,且在正常对照未检测到该突变。这是在*dystrophin*基因上新发现的致病性剪接供体位点突变。**结论** 外显子组测序技术可有效检测*dystrophin*基因微小突变,其应用可进一步完善DMD分子诊断体系。

[关键词] 杜氏肌营养不良;抗肌萎缩蛋白基因;外显子组测序;生物信息学

[中图分类号] R 596 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)05-0493-05

Exome sequencing discovered a novel splice donor mutation in *dystrophin* gene

QIU Li-ping[△], LIN Yan-hong[△], ZHENG De-zhu, ZENG Jian, YAN Ai-zhen, LAN Feng-hua*

Center for Molecular Diagnosis of Genetic Diseases, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou Clinical Medicine School of Second Military Medical University, Fuzhou 350025, Fujian, China

[Abstract] **Objective** To detect subtle mutations in the *dystrophin* gene by exome capturing using second-generation sequencing technique. **Methods** Exome capturing using second-generation sequencing technique was used to detect mutations of *dystrophin* gene in a patient with typical clinical manifestations of Duchenne muscular dystrophy (DMD), but without deletions or duplications in the *dystrophin* gene. The mutations were verified by Sanger sequencing, and bioinformatics was employed to predict its influence on the coding. The patient's mother and 100 healthy volunteers were taken as controls. **Results** A base change in the first base of intron 50 (G>C) was found in *dystrophin* gene of the patient, and his mother was heterozygosis at the same site. Bioinformatics predicted that the 5' donor splicing site of intron 50 would disappear due to this base change, which would alter the amino acid sequence at the C terminal of corresponding peptide and result in the appearance of premature termination codon. Sanger sequencing confirmed that the base change was a novel pathogenic mutation in the *dystrophin* gene, and it was absent in normal controls. **Conclusion** It is demonstrated that exome sequencing technique can effectively detect the subtle mutations in the *dystrophin* gene, which may contribute to better molecular diagnosis of DMD.

[Key words] Duchenne muscular dystrophy; *dystrophin* gene; exome sequencing; bioinformatics

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(5):493-497]

杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD; MIM 300377)是最常见的X连锁隐性致死性神经肌肉遗传疾病,其发病机制主要为抗肌萎缩蛋白基因(*dystrophin*)的突变导致编码产物发生结构和功能的改变^[1]。DMD主要累及男性,在新生男婴中的发病率为1/3 500,患者一般在3岁时出

现步行障碍,进行性腓肠肌无力伴假性肥大,血清肌酸激酶水平明显高于正常值,多在20岁左右死亡^[1]。*Dystrophin*基因定位在人染色体Xp21.2上,长2.4 Mb,至少含有79个外显子(NG_012232.1 GI:256355061),是目前已知最大的人类基因。*Dystrophin*基因(Gene ID: 1756)包含

[收稿日期] 2013-03-10

[接受日期] 2013-05-04

[作者简介] 丘丽萍,硕士生。E-mail: 108108qiu@163.com; 林炎鸿,技师。E-mail: 116235639@qq.com

[△]共同第一作者(Co-first authors)。

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 0591-22859617, E-mail: 116235639@qq.com

有8个独立的组织特异性启动子和2个多聚腺嘌呤位点。约75%的DMD患者存在一个或多个外显子大片段缺失或重复,剩余患者被认为存在微小突变,如小的插入/缺失和点突变等^[2]。我们利用外显子组捕获和第2代测序技术在1例具有典型DMD临床表现、但未检测到外显子缺失或重复的患者中发现1个剪接供体位点突变,现报告如下。

1 对象和方法

1.1 对象 患者为男性,年龄9岁,7岁时出现步行障碍,进行性腓肠肌无力伴假性肥大,血清肌酸激酶明显升高(6 292 U/L),肌电图检查示肌源性损伤,病理活检镜下可观察到萎缩肌纤维周围被脂肪和结缔组织填充,初步诊断为DMD。患者父母体健,非近亲婚配。正常对照100名,均来自我院体检中心体检正常者,男女各50名。

1.2 基因组DNA的提取 患者及其父母、正常健康成人的外周抗凝血按试剂盒(德国Qiagen公司)说明提取基因组DNA,以AE液溶解。DNA纯度和浓度均在核酸定量仪(德国Eppendorf公司)上检测。

1.3 多重连接依赖性探针扩增(MLPA)技术检测 *dystrophin* 基因外显子缺失或重复 采用MLPA技术^[3]进行 *dystrophin* 基因外显子缺失或重复检测。根据试剂盒(SALSA MLPA Kit P034/035,荷兰MRC-Holland公司产品)说明进行变性、杂交、连接和PCR反应。PCR产物在3100-Avant型遗传分析仪(美国ABI公司)上进行毛细管电泳,所得数据应用GeneScan软件进行处理,用Coffalyser V9.4软件进行结果分析,并与正常人的处理数据相比较。

1.4 外显子组捕获及第2代DNA序列分析 DNA样本送中山生物工程有限公司,应用SureSelect Human All Exon试剂盒(美国Agilent公司,G3362B-XT)制备外显子组文库,使用Genome Analyzer II x(Illumina)测序系统对外显子组区域进行高通量测序。整个样品制备过程包括杂交文库制备、杂交洗脱以及杂交后测序文库制备,通过Genome Analyzer II x测序系统获得外显子序列信息。使用SAMtools 0.1.16软件^[4]分别检测点突变(包括单核苷酸变异和插入缺失),并用该软件自带脚本进行简单过滤。应用现有的NCBI中单核苷酸多态

性(SNP)数据库(build 135)和千人基因组计划数据库的资源,排除与母亲样品中不同的突变和健康人群中频率大于1%的突变(下载自UCSC的Common SNPs, <http://hgdownload.soe.ucsc.edu/goldenPath/hg19/snp135Mask/>),剩下的突变作为候选致病突变。

1.5 *Dystrophin* 基因的生物信息学分析 利用NCBI最新的SNP数据库(build 135)和专门收录DMD突变的数据库(UMD-DMD France mutations database; http://www.umd.be/DMD/W_DMD/index.html)对 *dystrophin* 基因的SNP和结构变异等筛选,再使用在线工具(http://fruitfly.org/seq_tools/splice.html)^[5]对突变后的序列预测其剪切供体位点及可能的一些功能改变。

1.6 突变位点的验证 采用Primer 5.0软件设计PCR引物,其扩增片段横跨患者突变所在位点,上游引物序列为:5'-TTTTATGGTTGGAGGAAG-3',下游引物序列为:5'-AATAACCTAATGGGCA-GA-3'。PCR反应条件:94℃预变性5 min;94℃ 30 s,59℃ 30 s,72℃ 30 s,共35个循环;72℃再延伸7 min。以正常人、患者及其母亲基因组DNA为模板扩增后,纯化产物直接送深圳华大基因研究院进行Sanger测序分析。

2 结果

2.1 *Dystrophin* 基因缺失或重复的检测 对于 *dystrophin* 基因而言,患者存在1个拷贝,母亲存在2个拷贝,正常男性对照存在1个拷贝。MLPA分析结果显示:患者唯一的DMD等位基因未检测到缺失或重复;其母亲DMD等位基因也未检测到缺失或重复(结果略)。

2.2 外显子组测序结果 利用第2代测序平台对疑似患者及其母亲的 *dystrophin* 基因外显子进行微小突变分析。外显子组测序采用双端(paired-end, PE)测序技术,每个测序读长为115 bp,产生的原始测序数据经过过滤,最终获得总计31 052 466条双端序列,并发现样品中位于捕获区域的碱基数目均在2.69 G以上,捕获率均在54%以上,测序覆盖度为10倍的区域占捕获区域总长度的比例可达90%。约有700个核苷酸突变被发现,其中位于 *dystrophin* 基因中的只有1个:IVS50+1 G>C。测序数

据在参考基因组上的比对结果显示: 患者共有 68 条高质量测定的序列 (reads) 覆盖了该位置, 有力地证明了该位置为突变型, 其母亲在该位置则表现为杂合状态。考虑到 DMD 是 X 连锁隐性遗传病, 且患者多为男性, 可以认定患者从其母代中继承了该致病突变^[6]。

2.3 突变位点的验证 患者、患者母亲及正常人突变区 3 次双向 Sanger 测序结果一致。患者在关键的 5' 剪切位点上呈碱基 C 纯合状态, 患者母亲呈 C/G 杂合状态, 正常对照则为正常碱基 G。部分测序结果见图 1。另外, 为了排除该突变位点是多态性位点的可能性, 对 100 名正常人进行该突变位点的测序分析, 结果未检测到该位点纯合或杂合突变 (结果略)。

2.4 生物信息学分析 以 DMD-209 转录本为例, 通过软件预测发现 DMD-209 的内含子 47 (*dystrophin* 基因 NG_012232.1 GI:256355061, 包含 85 个外显子, 此处内含子 47 即为内含子 50) 原有的 5' 剪切位点消失。这可能会导致 3 种结果: 内含子保留 (intron retention)、替代性的供体位点 (alternative donor site) 或者外显子跳跃 (exon skipping)^[7]。这 3 种结果的可能性依次增加, 外显子跳跃可能性最大^[8]。若为内含子保留, 内含子 47 不被剪切, 从而参与蛋白翻译, 但蛋白翻译过程于原剪切供体位点后 39 bp 处会遇上终止密码子, 翻译过程提前终止; 若为替代性的供体位点, 无论是使用预测得到的最近的剪切供体位点 (原剪切供体位点下游 95 bp 处), 还是信号最强的剪切供体位点 (原剪切位点下游 1 866 bp), 蛋白翻译过程均会在原剪切供体位点后 39 bp 处遇上终止密码子, 翻译过程提前终止; 若为外显子跳跃, 内含子 46 的 5' 剪切位点和内含子 47 的 3' 剪切位点组合进行剪切, 47 号外显子被跳过 (因为 47 号外显子原长 148 bp, 非 3 倍数), 导致后续外显子编码框移位, 在翻译完 46 bp 后也会遇上终止密码子。生物信息学预测的 *dystrophin* 基因转录方式见图 2。为验证生物信息学所预测的结果, 我们应用杂种小基因剪接试验 (hybrid minigene splicing assay)^[9], 结果表明突变点所在的剪接位点确实消失, 并导致内含子保留和替代性供体位点的出现 (结果略)。

3 讨论

研究表明在约 25%~30% 的 DMD 患者中存在 *dystrophin* 基因的微小突变^[1,10]。因此, 如果患者临床表现典型, 但未能检出 *dystrophin* 基因外显子的缺失或重复, 应考虑存在 *dystrophin* 基因点突变的可能。迄今为止, 共有 500 多种点突变被鉴定 (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), 其中包括错义、无义、移码突变等, 这些点突变的类型和分布与 DMD 的表型严重程度密切相关^[11-12]。

本研究中, 在 1 例 DMD 患者 *dystrophin* 基因的剪接供体位点发生 G>C 突变, 该突变造成原有的 5' 剪接位点失效, 从而导致相应蛋白质功能的改变。查阅国内外文献及有关电子数据库, 未见有关于 *dystrophin* 基因 IVS50+1 G>C 突变的报道。这个点突变虽然不在 *dystrophin* 基因的编码区, 但为内含子的第 1 个碱基, 即 5' 剪接供体位点, 可直接导致内含子的保留、替代性供体位点的使用及外显子跳跃等情况的发生。

当前, 受技术限制, 仍有大约 20% 的 DMD 家系无法检测, 且 *dystrophin* 基因存在的高发新生突变也是目前研究的一个难点^[13-14]。目前应用的基因突变检查方法包括单链构象多态性分析 (single-strand conformation polymorphism, SSCP)^[15]、变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)^[16]、多重 PCR^[17]、Sanger 测序^[18]、变性高效液相色谱法 (denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)^[19]、MLPA^[20] 和微阵列比较基因组杂交 (array-based comparative genomic hybridization, array-CGH)^[21] 等。近年来, 随着包括内含子的全基因组被测通后, 外显子组测序成为遗传病分子诊断领域中迅速发展起来的一项高新技术, 这是对传统检测的一次革命性改变, 具有广阔的临床应用前景^[2]。

本研究将外显子组测序分析、生物信息学分析及杂种小基因剪接试验应用于患者 *dystrophin* 基因微小突变的检测及鉴定, 并发现了致病的新的剪接供体位点突变。证明该方法可有效检测 *dystrophin* 基因微小突变, 能进一步完善 DMD 分子诊断体系, 并可为 DMD 家系提供更完整、可靠的遗传咨询。

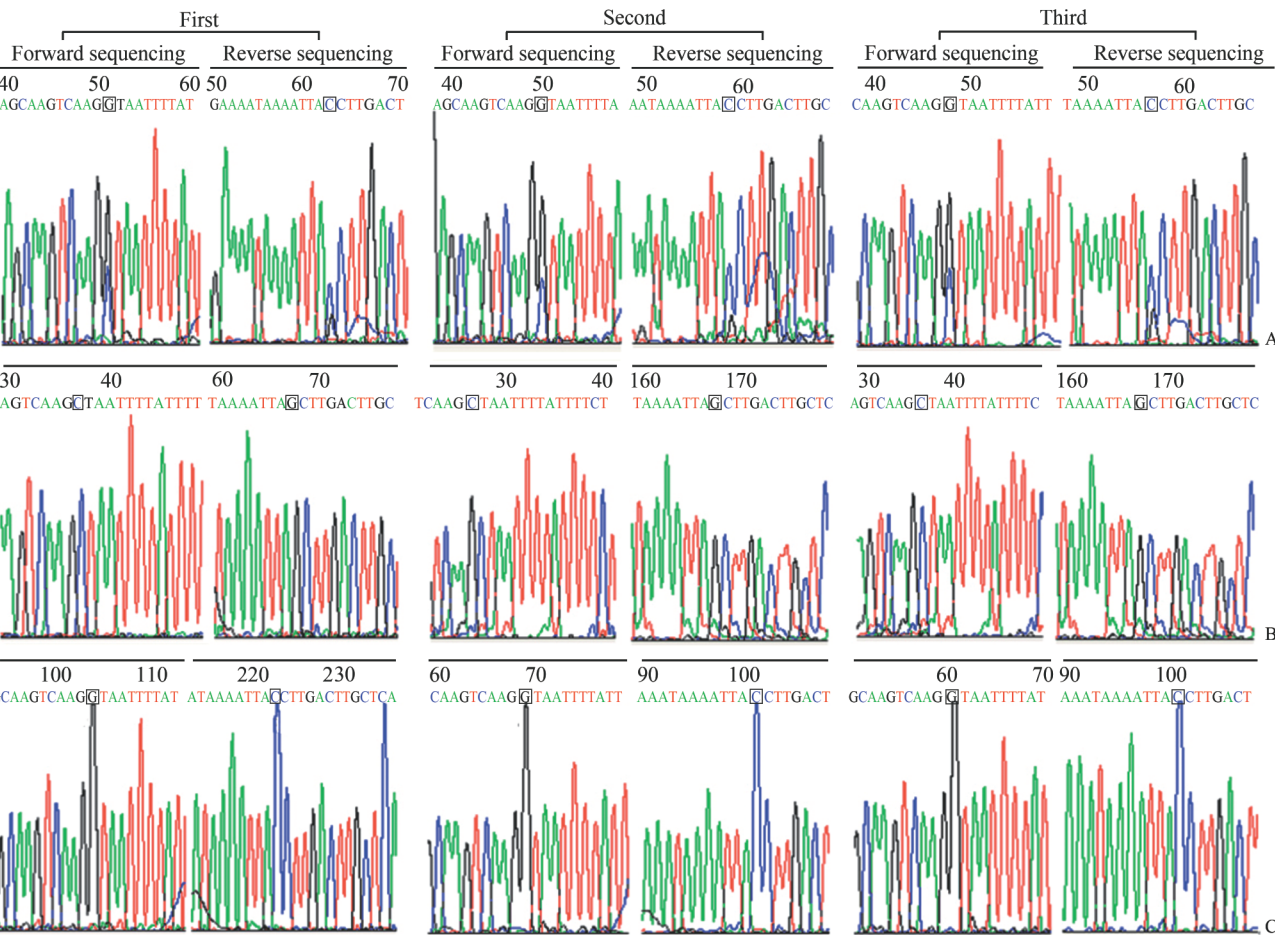


图 1 突变位点双向测序结果

Fig 1 Bi-directional DNA sequencing results of mutation site

A: The mother had a heterozygous mutation with “C” and “G” ; B: The patient had a homozygous mutation “C”; C: Normal person had a homozygous “G”

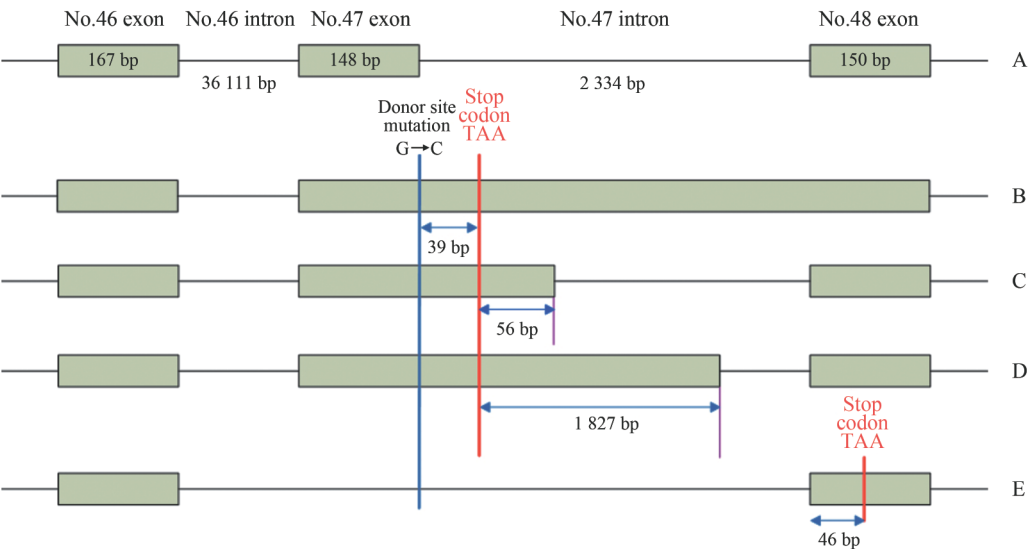


图 2 生物信息学预测的 *dystrophin* 基因转录方式

Fig 2 The predicted transcripts of *dystrophin* gene from the patient

The border between blue line and green squares represents the position of donor site mutation, the border between red line and green squares represents the position of stop codon. A: Normal alternative spliced product of *dystrophin* gene;B: Intron retention; C: Use nearest alternative donor site; D: Use strongest alternative donor site; E: Alternative spliced product with exon skipping

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 陆国辉,李巍,黄艳仪,庞伟. 产前遗传病诊断[M]. 广州:广东科技出版社,2002:411-417.
- [2] Abbs S, Tuffery-Giraud S, Bakker E, Ferlini A, Sejersen T, Mueller C R. Best practice guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/Becker muscular dystrophies[J]. Neuromuscul Disord, 2010, 20: 422-427.
- [3] Schouten J P, McElgunn C J, Waaijer R, Zwijsenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30: e57.
- [4] Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools[J]. Bioinformatics, 2009, 25: 2078-2079.
- [5] Reese M G, Eeckman F H, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie[J]. J Comput Biol, 1997, 4: 311-323.
- [6] Musunuru K, Pirruccello J P, Do R, Peloso G M, Guiducci C, Sougnez C, et al. Exome sequencing, AN-GPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia[J]. N Engl J Med, 2010, 363: 2220-2227.
- [7] Vreken P, Van Kuilenburg A B, Meinsma R, Smit G P, Bakker H D, De Abreu R A, et al. A point mutation in an invariant splice donor site leads to exon skipping in two unrelated Dutch patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency[J]. J Inherit Metab Dis, 1996, 19: 645-654.
- [8] Sammeth M, Foissac S, Guig R. A general definition and nomenclature for alternative splicing events[J]. PLoS Comput Biol, 2008, 4: e1000147.
- [9] Li J, Chen X, Lin W, Li L, Han Y, Xu P. Establishment and application of minigene models for studying pre-mRNA alternative splicing[J]. Sci China C Life Sci, 2004, 47: 211-218.
- [10] Wang Q, Li-Ling J, Lin C, Wu Y, Sun K, Ma H, et al. Characteristics of *dystrophin* gene mutations among Chinese patients as revealed by multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2009, 13: 23-30.
- [11] Kerr T P, Sewry C A, Robb S A, Roberts R G. Long mutant dystrophins and variable phenotypes: evasion of nonsense-mediated decay? [J]. Hum Genet, 2001, 109: 402-407.
- [12] Sedláčková J, Vondráček P, Hermanov M, Zámečník J, Hrubá Z, Haberlová J, et al. Point mutations in Czech DMD/BMD patients and their phenotypic outcome[J]. Neuromuscul Disord, 2009, 19: 749-753.
- [13] Abbs S, Bobrow M. Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers in the dystrophin gene[J]. J Med Genet, 1992, 29: 191-196.
- [14] van Essen A J, Kneppers A L, van der Hout A H, Scheffer H, Ginjaar I B, ten Kate L P, et al. The clinical and molecular genetic approach to Duchenne and Becker muscular dystrophy: an updated protocol[J]. J Med Genet, 1997, 34: 805-812.
- [15] Mendell J R, Buzin C H, Feng J, Yan J, Serrano C, Sangani D S, et al. Diagnosis of Duchenne dystrophy by enhanced detection of small mutations[J]. Neurology, 2001, 57: 645-650.
- [16] Hofstra R M, Mulder I M, Vossen R, de Koning-Gans P A, Kraak M, Ginjaar I B, et al. DGGE-based whole-gene mutation scanning of the dystrophin gene in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients[J]. Hum Mutat, 2004, 23: 57-66.
- [17] Beggs A H, Koenig M, Boyce F M, Kunkel L M. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction[J]. Hum Genet, 1990, 86: 45-48.
- [18] Flanigan K M, von Niederhausern A, Dunn D M, Alder J, Mendell J R, Weiss R B, et al. Rapid direct sequence analysis of the *dystrophin* gene[J]. Am J Hum Genet, 2003, 72: 931-939.
- [19] Bennett R R, den Dunnen J, O'Brien K F, Darras B T, Kunkel L M. Detection of mutations in the dystrophin gene via automated DHPLC screening and direct sequencing[J]. BMC Genet, 2001, 2: 17.
- [20] Todorova A, Todorov T, Georgieva B, Lukova M, Guer-gueltcheva V, Kremensky I, et al. MLPA analysis/complete sequencing of the DMD gene in a group of Bulgarian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients[J]. Neuromuscul Disord, 2008, 18: 667-670.
- [21] Baskin B, Gibson W T, Ray P N. Duchenne muscular dystrophy caused by a complex rearrangement between intron 43 of the DMD gene and chromosome 4[J]. Neuromuscul Disord, 2011, 21: 178-182.

[本文编辑] 商素芳