

· 临床研究 ·

三种脊髓性肌萎缩症携带者筛查方法的性能评估

孙瑞红¹, 蒋 祝², 邵彬彬², 谭建新^{2*}¹南京医科大学第一临床医学院医学检验学系, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学附属妇产医院(南京市妇幼保健院)遗传医学中心, 江苏 南京 210004

[摘要] 目的: 比较3种分子遗传技术在脊髓性肌萎缩症基因携带者筛查检测中的检测性能。方法: 采用微滴数字PCR(droplet digital PCR, ddPCR)、高分辨率熔解曲线(high-resolution melting, HRM)与多重竞争性PCR联合毛细管电泳(PCR-based capillary electrophoresis, PCR/CE)技术检测516例样本中SMN基因拷贝数, 并通过多重连接依赖探针扩增(multiple ligation-dependent probe amplification, MLPA)方法作为金标准技术验证结果。结果: ddPCR、HRM和PCR/CE检测SMN1第7号外显子的拷贝数与MLPA分析结果一致, 灵敏度和特异度均为100.0%。HRM检测SMN1基因第8号外显子单拷贝的灵敏度和特异度为100.0%和99.5%, 双拷贝的灵敏度和特异度为99.4%和100.0%, 而大于双拷贝的灵敏度和特异度为100.0%和100.0%。PCR/CE可以同时检测SMN1和SMN2基因的第7、8号外显子, 检测结果与MLPA结果完全一致, 灵敏度和特异度均为100.0%。结论: 本研究比较了3种分子遗传技术在SMA携带者筛查检测中的效能, 为建立大规模人群的脊肌萎缩症携带者筛查技术选择提供依据。

[关键词] 脊髓性肌萎缩症; 携带者筛查; ddPCR; HRM; PCR/CE**[中图分类号]** R446.7**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2023)10-1402-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20231011

脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)是一种常染色体隐性遗传病, 是由于脊髓前角运动神经元变性导致的进行性近端肌肉萎缩和无力的的一组疾病^[1]。其发病率为1/6 000~1/10 000, 人群携带率为1/40~1/50, 在导致儿童死亡的常染色体遗传病中排名第2^[2]。SMA致病基因为运动神经元存活基因1(survival motor neuron, SMN1), 其纯合缺失是引起SMA的主要原因^[3]。SMN2基因与SMN1高度同源, 作为修饰基因, 影响疾病的严重程度^[4]。通常情况下, SMA的发生95%~98%是由SMN1基因第7号外显子的纯合缺失导致, 2%~5%是由SMN1基因点突变或部分缺失导致^[5-6]。鉴于SMA人群携带率高, 病情严重和治疗费用昂贵, 美国医学遗传学会建议对所有育龄夫妇进行SMA携带者筛查^[7]。

目前检测SMN基因拷贝数的方法较多, 如多重连接探针依赖扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)^[8]、实时定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)^[9]、

变性高效液相色谱法(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)^[10]、基质辅助激光解析-电离飞行时间质谱法(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF)^[11]、微滴数字PCR(droplet digital PCR, ddPCR)^[12], 以及下一代测序法(next generation sequencing, NGS)^[8]。MLPA是检测SMN基因拷贝数的金标准, 但其耗材贵且检测周期长, 导致MLPA不适合大规模携带者筛查^[13]。qPCR操作简单, 成本较低, 是人群SMA筛查最常使用的方法之一, 但由于DNA片段非特异性扩增, 可能会出现假阳性结果, 临床开展有一定的局限性^[14]。

本研究对516例样本同时使用MLPA、ddPCR、高分辨率熔解曲线(high-resolution melting, HRM)与多重竞争性PCR联合毛细管电泳(PCR-based capillary electrophoresis, PCR/CE)技术对SMN拷贝数进行检测并对这些方法的性能进行比较。

1 对象和方法

1.1 对象

收集2020年3月—2021年10月在南京市妇幼

[基金项目] 江苏省妇幼保健协会科研课题(FYX202008)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: tanjx@njmu.edu.cn

保健院使用qPCR方法进行SMA携带者筛查的患者共516例,其中,男12例,女504例,平均年龄为(31.0±4.0)岁。所有受检者接受遗传咨询后自愿选择SMA筛查,并排除SMA家族史。每名受检者签署知情同意书,本研究经南京市妇幼保健院伦理委员会批准(编号:2020KY004)。

1.2 方法

抽取每名受检者外周血2 mL,使用自动核酸提取仪(厦门芮宝生医股份有限公司)提取基因组DNA,用下列方法对SMN拷贝数进行检测。

1.2.1 MLPA

MLPA分析使用SALSA MLPA试剂盒(P060-050R,MRC公司,荷兰)按照标准操作流程进行检测。该试剂盒包含2个针对SMN1第7号和第8号外显子的序列特异性探针和1个针对SMN2第7号和第8号外显子的探针。DNA变性后与MLPA探针混合物杂交过夜,然后进行探针连接和扩增。使用ABI 3500分析仪(赛默飞世尔科技公司,美国)对扩增产物进行检测,并使用Coffalyser.Net软件(MRC公司,荷兰)分析数据。探针相对峰面积增加或减少30%分别表示重复或删除。

1.2.2 HRM

采用2次多重探针PCR反应检测SMN1基因拷贝数。20 μL反应体系包含100~200 ng基因组DNA、1×PCR缓冲液、0.5 μmol/L引物、KlenTaq1聚合酶和LCGreen染料。PCR反应在LightCycler 480(罗氏诊断公司,德国)上扩增:95 °C 5 min,95 °C 5 s,64 °C降温至60 °C 30 s,共10个循环,随后95 °C 10 s,60 °C 15 s,共25个循环。扩增后产物95 °C预热60 s,40 °C孵育60 s收集熔解曲线进行分析。

1.2.3 PCR/CE检测

使用PCR/CE试剂盒(厦门百欧迅公司)检测SMN1基因拷贝数。该试剂盒包含SMN1和SMN2基因第7号和第8号外显子的引物,β-globin和β-actin作为内参。20 μL反应体系包含15 μL PCR混合物,3 μL引物,0.16 μL DNA聚合酶,和2 μL基因组DNA。使用热循环仪,条件如下:95 °C初始孵化5 min,然后进行25个扩增循环(95 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 30 s),最后在72 °C下延伸30 min。然后,将PCR产物与Hi-Di Formamide(赛默飞世尔科技公司,美国)和GeneScan 500 LIZ Size Standard混合。变性后,混合物在ABI 3500遗传分析仪(赛默飞世尔科技公司,美国)上分离。通常情况下,得到的电泳图包括6个峰(β-globin、SMN1-EX7、

SMN2-EX7、SMN1-EX8、SMN2-EX8和β-actin)。

1.2.4 ddPCR

使用ddPCR SMN1拷贝数测定试剂盒(Bio-Rad Laboratories,美国)按照标准操作流程进行操作。18 μL体系中含有2×ddPCR Supermix for Probes、20×ddPCR SMN1 Assay和Hae III,并加入4 μL DNA样品。然后,取20 μL混合物与70 μL的Bio-Rad Droplet Generation Oil for Probes混合,在Bio-Rad QX200™ Droplet Generator上生成液滴。液滴产生后进行终点PCR。PCR的热循环条件如下:95 °C下10 min;94 °C下30 s,55 °C下1 min,35个循环;98 °C下10 min。Quanta Soft Analysis Pro软件以核糖核酸酶P/MRP亚单位p30(RPP30)为参考基因进行SMN1第7号外显子的液滴集群分类和拷贝数计算。

1.3 统计学方法

每种方法检出的SMN1和SMN2拷贝数录入Microsoft Office Excel软件进行数据分析。灵敏度=真阳性样本/(真阳性样本+假阴性样本)×100%。特异度=真阴性样本/(真阴性样本+假阳性样本)×100%。本研究中2分类结果采用灵敏度和特异度进行一致性检验,加权Kappa一致性检验分析采用SPSS 26.0软件包进行。Kappa值是介于0到1之间的一个比率,其中0表示完全不一致,1表示完全一致。

2 结果

为了系统地比较目前用于SMA携带者筛查的方法,同时用MLPA、ddPCR、HRM和PCR/CE检测516份DNA样本。以MLPA结果为金标准,计算ddPCR、HRM和PCR/CE检测方法的灵敏度和特异度。

2.1 灵敏度和特异度

针对SMN1第7号外显子,MLPA结果显示,107个样本为杂合性缺失(SMN1第7号外显子单拷贝),409个样本为正常(SMN1第7号外显子≥2拷贝)。与MLPA结果相比,ddPCR、HRM分析和PCR/CE检测SMN1第7号外显子的拷贝数与MLPA分析结果一致,灵敏度和特异度均为100.0%(表1、2)。

表1 HRM分析SMN1第7号外显子拷贝数

MLPA检测结果	HRM分析结果(n)		灵敏度 (%)	特异度 (%)
	1拷贝 (n=107)	≥2拷贝 (n=409)		
1拷贝(n=107)	107	0	100.0	100.0
≥2拷贝(n=409)	0	409	100.0	100.0

表2 ddPCR和PCR/CE分析SMN1第7号外显子拷贝数

MLPA结果	ddPCR和PCR/CE结果(n)				灵敏度 (%)	特异度 (%)
	1拷贝 (n=107)	2拷贝 (n=355)	3拷贝 (n=53)	4拷贝 (n=1)		
1拷贝 (n=107)	107	0	0	0	100.0	100.0
2拷贝 (n=355)	0	355	0	0	100.0	100.0
3拷贝 (n=53)	0	0	53	0	100.0	100.0
4拷贝 (n=1)	0	0	0	1	100.0	100.0

Kappa系数=1.000, P < 0.001。

在这4种方法中,只有ddPCR不包含针对SMN1第8号外显子的特定引物。针对SMN1第8号外显子,MLPA结果显示,101个样本被归类为杂合性缺失(SMN1第8号外显子单拷贝),415个为正常(SMN1第8号外显子≥2拷贝)。与MLPA结果相比,HRM检测单拷贝的SMN1第8号外显子的灵敏

度和特异度分别为100.0%和99.5%。检测2拷贝的灵敏度和特异度分别为99.4%和100.0%,检测>2拷贝的灵敏度和特异度分别为100.0%和100.0%(表3)。相比之下,PCR/CE检测SMN1第8号外显子的结果与MLPA的结果一致,其灵敏度和特异度均为100.0%。

表3 HRM分析SMN1第8号外显子拷贝数

MLPA结果	HRM结果(n)			灵敏度 (%)	特异度 (%)
	1拷贝 (n=103)	2拷贝 (n=348)	>2拷贝 (n=65)		
1拷贝 (n=101)	101	0	0	100.0	99.5
2拷贝 (n=350)	2	348	0	99.4	100.0
>2拷贝 (n=65)	0	0	65	100.0	100.0

Kappa系数=0.992, P < 0.001。

此外,MLPA和PCR/CE分析可以同时检测SMN1和SMN2。针对SMN2第7号和第8号外显子,

PCR/CE检测的结果与MLPA一致,灵敏度和特异度均为100.0%(表4、5)。

表4 PCR/CE分析SMN2第7号外显子拷贝数

MLPA结果	PCR/CE结果(n)				灵敏度 (%)	特异度 (%)
	1拷贝 (n=103)	2拷贝 (n=347)	3拷贝 (n=65)	>3拷贝 (n=1)		
1拷贝 (n=103)	103	0	0	0	100.0	100.0
2拷贝 (n=347)	0	347	0	0	100.0	100.0
3拷贝 (n=65)	0	0	65	0	100.0	100.0
>3拷贝 (n=1)	0	0	0	1	100.0	100.0

Kappa系数=1.000, P < 0.001。

表5 PCR/CE分析SMN2第8号外显子拷贝数

MLPA结果	PCR/CE结果(n)					灵敏度 (%)	特异度 (%)
	0拷贝 (n=20)	1拷贝 (n=159)	2拷贝 (n=287)	3拷贝 (n=48)	>3拷贝 (n=2)		
0拷贝 (n=20)	20	0	0	0	0	100.0	100.0
1拷贝 (n=159)	0	159	0	0	0	100.0	100.0
2拷贝 (n=287)	0	0	287	0	0	100.0	100.0
3拷贝 (n=48)	0	0	0	48	0	100.0	100.0
>3拷贝 (n=2)	0	0	0	0	2	100.0	100.0

Kappa系数=1.000, P < 0.001。

2.2 4种方法的比较

表6总结了4种方法的各种特点。其中,ddPCR

只能检测SMN1第7号外显子,HRM含有针对SMN1第7号外显子和第8号外显子的探针,而MLPA和

PCR/CE 能够量化 SMN1 第 7 号和第 8 号外显子、SMN2 第 7 号和第 8 号外显子的拷贝数。此外,MLPA、ddPCR 和 PCR/CE 可以准确地检测出多达 4 拷贝,而

HRM 只能准确地分析出多达 2 拷贝。每个样品的成本根据我们从国内供应商处获得的价格计算(1 美元=6.9 人民币)。

表 6 4 种 SMN1 和 SMN2 基因检测方法的特点比较

参数	MLPA	ddPCR	HRM	PCR/CE
基因和外显子检测靶点	SMN1 外显子 7 和 8, SMN2 外显子 7 和 8	SMN1 外显子 7	SMN1 外显子 7 和 8	SMN1 外显子 7 和 8, SMN2 外显子 7 和 8
准确区分最大拷贝数(拷贝)	4	4	2	4
每个样本的成本(美元)	29.0	14.5	43.5	14.5
检测时间(h)	24.0	2.0	2.0	2.5
内参基因	IRF6	RPP30	CFTR	β -球蛋白和 β -肌动蛋白

3 讨 论

本研究纳入了 516 个样本,以 MLPA 为金标准,比较 ddPCR、HRM 和 PCR/CE 检测 SMN1 第 7 号、第 8 号外显子拷贝数的特异度和灵敏度。在这 3 种方法中,PCR/CE 似乎是最可靠的方法,它与 MLPA 在检测 SMN1 和 SMN2 的拷贝数方面表现出很好的一致性。

SMN1 第 7 号第 8 号外显子纯合缺失约占 SMA 患者的 95%^[15]。然而,也有 SMN1 第 8 号外显子纯合缺失,但第 7 号外显子未见异常的报道。Gambardella 等^[16]报告了 2 例无亲缘关系的患者,由于 SMN1 第 8 号外显子纯合缺失而具有 SMA II 型和 III 型的典型表型。此外,1 例 10 月龄的 SMA I 型男婴表现为双侧视神经萎缩,是由 SMN1 第 8 号外显子的孤立缺失引起^[17]。在以前的研究中,约有 5% 的中国孕妇携带 SMN1 第 8 号外显子的杂合性缺失,但有完整的第 7 号外显子^[9]。因此,除了 SMN1 第 7 号外显子,在 SMA 携带者筛查中包含 SMN1 第 8 号外显子也很重要。在本研究中,ddPCR 不包含针对 SMN1 第 8 号外显子的特异性探针,这可能导致 SMA 携带者筛查中出现额外的残留风险。MLPA、HRM 分析和 PCR/CE 在量化 SMN1 第 8 号外显子方面具有相对较高的特异度和灵敏度,因此是适合 SMA 携带者筛查的方法。

SMN2 是 SMN1 的同源基因,两者仅有 5 个碱基不同^[18-19]。第 7 号外显子中的 1 个 C-T 核苷酸转换导致大约 90% 的 SMN2 转录本跳过该外显子,导致快速降解而不能补偿 SMN1 的功能^[20]。剩余 10% 的 SMN2 转录本不足以弥补 SMN1 基因功能缺失。尽管如此,SMN2 拷贝数的增加一般与较温和的 SMA 临床表现有关^[21-22]。因此,在 SMA 携带者筛查中分

析 SMN2 拷贝数有助于预测疾病的演变,并为遗传咨询提供依据。此外,据报道,因为 SMN1 和 SMN2 的同时缺失会导致胚胎死亡,SMN2 在所有 SMA 患者中都被保留^[23-24]。因此,SMN2 可以通过与 SMN1 同时扩增作为参考基因。在本研究中,除了 MLPA 之外,只有 PCR/CE 分析可以同时测定 SMN1 和 SMN2 的拷贝数,并与 MLPA 的结果表现出很好的一致性。

本研究存在如下局限性。首先,没有 0 拷贝 SMN1 的样本,无法评估这些方法在分析 0 拷贝 SMN1 时的特异度和灵敏度。其次,这 4 种方法都不能检测 SMN1 基因的点突变,而这一突变约占 SMA 病例的 5%,导致携带者筛查中存在不可避免的残留风险。最后,这些方法都会将一小部分携带者(约 4%)错误地归类为非携带者,这些携带者在同一条染色体上有 2 个重复的 SMN1 拷贝,而在另一染色体上没有拷贝[2+0]。

综上所述,本研究通过比较 ddPCR、HRM 及 PCR/CE 3 种检测方法在 SMA 携带者筛查中的优缺点,为临床开展携带者筛查项目的技术选择提供参考依据。

[参考文献]

- [1] LUNN M R, WANG C H. Spinal muscular atrophy [J]. *Lancet*, 2008, 371(9630): 2120-2133
- [2] HENDRICKSON B C, DONOHOE C, AKMAEV V R, et al. Differences in SMN1 allele frequencies among ethnic groups within North America [J]. *J Med Genet*, 2009, 46(9): 641-644
- [3] REILLY A, CHEHADE L, KOTHARY R. Curing SMA: are we there yet? [J]. *Gene Ther*, 2023, 30(1-2): 8-17
- [4] MAILMAN M D, HEINZ J W, PAPP A C, et al. Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of

- the phenotype by SMN2[J]. *Genet Med*, 2002, 4(1): 20-26
- [5] ALÍAS L, BERNAL S, FUENTES-PRIOR P, et al. Mutation update of spinal muscular atrophy in Spain: molecular characterization of 745 unrelated patients and identification of four novel mutations in the SMN1 gene[J]. *Hum Genet*, 2009, 125(1): 29-39
- [6] SUGARMAN E A, NAGAN N, ZHU H, et al. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72,400 specimens[J]. *Eur J Hum Genet*, 2012, 20(1): 27-32
- [7] PRIOR T W, Professional Practice and Guidelines Committee. Carrier screening for spinal muscular atrophy[J]. *Genet Med*, 2008, 10(11): 840-842
- [8] 陈红苓, 孟英韬, 舒剑波, 等. 运用MLPA进行脊肌萎缩症的基因诊断[J]. *天津医药*, 2012, 40(11): 1095-1098
- [9] 邓坤仪, 彭建明, 范汉恭, 等. 荧光定量PCR快速筛查脊髓性肌肉萎缩症SMN1致病基因携带者[J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(21): 2983-2984
- [10] SU Y N, HUNG C C, LI H, et al. Quantitative analysis of SMN1 and SMN2 genes based on DHPLC: a highly efficient and reliable carrier-screening test[J]. *Hum Mutat*, 2005, 25(5): 460-467
- [11] LIN Y M, LIN C H, YIN X S, et al. Newborn screening for spinal muscular atrophy in China using DNA mass spectrometry[J]. *Front Genet*, 2019, 10: 1255
- [12] PARK S, LEE H, SHIN S, et al. Analytical validation of the droplet digital PCR assay for diagnosis of spinal muscular atrophy[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 510: 787-789
- [13] LI L, ZHOU W J, FANG P, et al. Evaluation and comparison of three assays for molecular detection of spinal muscular atrophy[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(3): 358-367
- [14] PRIOR T W, NAGAN N, SUGARMAN E A, et al. Technical standards and guidelines for spinal muscular atrophy testing[J]. *Genet Med*, 2011, 13(7): 686-694
- [15] JIN W J, YANG Z Q, TANG X J, et al. Simultaneous quantification of SMN1 and SMN2 copy numbers by MALDI-TOF mass spectrometry for spinal muscular atrophy genetic testing[J]. *Clin Chim Acta*, 2022, 532: 45-52
- [16] GAMBARDELLA A, MAZZEI R, TOSCANO A, et al. Spinal muscular atrophy due to an isolated deletion of exon 8 of the telomeric survival motor neuron gene[J]. *Ann Neurol*, 1998, 44(5): 836-869
- [17] MAITI D, BHATTACHARYA M, YADAV S. Isolated exon 8 deletion in type 1 spinal muscular atrophy with bilateral optic atrophy: unusual genetic mutation leading to unusual manifestation?[J]. *J Postgrad Med*, 2012, 58(4): 294-295
- [18] LORSON C L, HAHNEN E, ANDROPHY E J, et al. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(11): 6307-6311
- [19] MONANI U R, LORSON C L, PARSONS D W, et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2[J]. *Hum Mol Genet*, 1999, 8(7): 1177-1183
- [20] SPITALI P, AARTSMA-RUS A. Splice modulating therapies for human disease[J]. *Cell*, 2012, 148(6): 1085-1088
- [21] PRIOR T W, KRAINER A R, HUA Y, et al. A positive modifier of spinal muscular atrophy in the SMN2 gene[J]. *Am J Hum Genet*, 2009, 85(3): 408-413
- [22] IASCONE D M, HENDERSON C E, LEE J C. Spinal muscular atrophy: from tissue specificity to therapeutic strategies[J]. *F1000Prime Rep*, 2015, 7: 4
- [23] SCHRANK B, GÖTZ R, GUNNERSEN J M, et al. Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(18): 9920-9925
- [24] HSIEH-LI H M, CHANG J G, JONG Y J, et al. A mouse model for spinal muscular atrophy[J]. *Nat Genet*, 2000, 24(1): 66-70

[收稿日期] 2023-05-31

(责任编辑:蒋莉)