

83 例苯丙酮尿症患者 pah 基因大片段缺失的检测*

张展¹,刘昕¹,高峻峻¹,王萍¹,朱琳琳²,史许锋³,常爱民¹

(1. 郑州大学第三附属医院检验科,河南郑州 450052;2. 新乡医学院检验学院,河南新乡 453000;

3. 河南省人民医院妇产科,河南郑州 450052)

[摘要] **目的** 探讨苯丙酮尿症(PKU)患者苯丙氨酸羟化酶(pah)基因大片段缺失的情况。**方法** 选择 2015 年 1 月至 2016 年 1 月在郑州大学第三附属医院科研中心进行基因检测的 83 例苯丙酮尿症患者为研究对象,通过 Sanger 测序技术和多重连接探针扩增技术(MLPA),对患儿 pah 基因 13 个外显子及其两侧的内含子剪接区的碱基序列进行分析,在测序结果的基础上,将结果与同人类基因组数据库 hg19、pah 突变数据库 pah base 和人类基因突变数据库 HGMD 中的数据进行比对分析,确定患儿 pah 基因的大片段缺失情况。**结果** 在 83 例患儿中共检测到 162 个突变等位基因,其中点突变 57 种,大片段缺失突变 6 种,6 种大片段缺失突变发生于 pah 基因的第 1、4、5、6、7 外显子。**结论** MLPA 筛查是必要的且能发现大片段缺失的有效方法,同时联合 Sanger 测序技术可以提高苯丙酮尿症的诊断率。

[关键词] 苯丙酮尿症;苯丙氨酸羟化酶;大片段缺失;多重连接探针扩增技术

[中图法分类号] R394.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)34-4374-05

Gene large deletion detection of pah gene in 83 cases of phenylketonuria*

ZHANG Zhan¹, LIU Xin¹, GAO Junjun¹, WANG Ping¹, ZHU Linlin², SHI Xufeng³, CHANG Aimin¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University,

Zhengzhou, Henan 470052, China; 2. Inspection College, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan

453000, China; 3. Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450052, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the gene large deletion situation of pah gene among the patients with phenylketonuria (PKU) in Henan province. **Methods** A total of 83 children patients with PKU undergoing gene detection in the scientific research center of the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University from Jan. 2015 to Jan. 2016 were selected as the study subjects. The base sequence of 13 exons and their bilateral introns splicing region in pah gene were analyzed by using the Sanger sequencing technique and multiplex ligation-dependent probe amplification(MLPA). On the basis of sequencing results, the results were conducted the comparative analysis with the data of human genome database hg19, pah mutation database pah base and human gene mutation database HGMD to confirm the pah gene large deletion in the children patients with PKU. **Results** Among 83 children patients with PKU, 162 mutant alleles were detected, including 57 kinds of mutations and 6 kinds of large deletions, which occurred in the exon 1, 4, 5, 6, 7 in pah gene. **Conclusion** The MLPA screening is necessary, and is an effective method for finding large deletion, meanwhile which combining with the Sanger sequencing can increase the diagnostic rate of PKU.

[Key words] phenylketonuria; phenylalanine hydroxylase; large deletion; multiplex ligation-dependent probe amplification

苯丙酮尿症(phenylketonuria, PKU)是新生儿最常见的氨基酸代谢障碍性疾病,是因苯丙氨酸羟化酶基因(phenylalanine hydroxylase gene, pah, 612349)突变导致苯丙氨酸羟化酶(pah)活性下降或缺乏,导致血中苯丙氨酸(Phe)浓度增高并在神经系统和血中蓄积^[1],造成严重的神经损害,影响患儿发育,甚至危及生命。据统计,我国苯丙酮尿症发病率约为 1:12 189^[2],而 1985—2000 年中国主要城市新生儿筛查

的 PKU 发病率为 1:11 307^[3],而近 3 年河南省 PKU 的发病率为 1:6 356,高于全国平均水平^[4]。本课题组使用 MLPA 技术联合 Sanger 测序,对河南省人群中 PKU 患者进行 pah 基因研究,可为 PKU 患者的诊断以及家系的深入研究提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1 月至 2016 年 1 月在郑州大学第三附属医院科研中心进行基因诊断的高

苯丙氨酸血症的患儿,通过 Phe 负荷试验、BH4 负荷试验、尿液蝶呤谱分析确诊分型并排除其他代谢性疾病的 83 例 PKU 患儿及其父母为研究对象。83 例患儿的男女性别比例为 41 : 42,年龄 30 d 至 10 岁。所有受试者检测均获得患儿监护人的知情同意,并且符合医院人体试验伦理委员会所制定的伦理学标准,得到该委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 外周血 DNA 提取 EDTA 抗凝全血采用 QIAamp® DNA Blood Mini Kit (批号:51106,德国 Qiagen 公司)按照该试剂盒的 DNA 提取操作说明书进行外周血样本的基因组 DNA 提取,所得样本基因组 DNA 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后保存于 -80 °C 超低温冷藏箱中备用。

1.2.2 PCR 扩增、基因测序和序列分析比对 在 ABI 9700 PCR(美国 Applied Biosystems 公司)仪上进行聚合酶链式反应,采用 20 μL 的 PCR 总反应体系,其中 2 * Master Mix(TIANGEN)10 μL,上下游引物(表 1)各 0.4 μL,DNA 模板 1 μL,ddH₂O 8.2 μL。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 15 s,55 °C 15 s,72 °C 30 s(30 次循环),72 °C 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 产物片段的大小,确定有目的片段并且同引物设计的目的片段大小一致后在 ABI 3730 测序仪上进行测序,测序结果的峰图以及序列比对分别采用 Chromas Pro 2.1.3 和 Vector NTI Explorer 进行。

1.2.3 多重连接探针扩增(MLPA)法检测 pah 基因大片段缺失 使用 SALSA MLPA probemix P055-D1 pah kit(MRC-Holland 公司,荷兰)对测序无法进行基因分型的 PKU 患者外周血基因组 DNA 标本进行 pah 基因大片段缺失检测,该试剂盒含有 38 个探针,其中 pah 基因所在区域(chromosome 12q23.2)探针 22 个,上下游探针各 1 个,参考序列探针 14 个。MLPA 反应参照试剂盒说明书进行,反应产物在 ABI3500 基因测序仪上进行毛细管电泳,电泳结果采用 MLPA 专用数据软件 Coffalyser 进行分析,拷贝数的判定根据同内参照序列电泳峰面积的比值确定:正常 2 拷贝比值范围为 0.7~1.3;3 拷贝(杂合重复突变)比值范围为 1.4~1.7;单拷贝(杂合缺失突变)比值范围为 0.3~0.6;纯合缺失突变的比值范围为 0~0.2。

表 1 PCR 扩增和测序引物

基因	引物序列(5'-3')	片段长度 (bp)
EXON 1	F:AGG TGA CCT GGA GCA TCC	294
	R:GGA TCT CTT TCT CTG GAG GC	
EXON 2	F:GAA AGA GTT CAT GCT TGC TTT GTC C	329
	R:GCT CAA ATT CAA ATC TGC CTG TTC C	

续表 1 PCR 扩增和测序引物

基因	引物序列(5'-3')	片段长度 (bp)
EXON 3	F:GTT AGG TTT TCC TGT TCT GG	358
	R:CTT ATG TTG CAA AAT TCC TC	
EXON 4	F:GTT CTG CCA ATC TGT ACT CAG G	258
	R:GTA GAG AAG GTA AGA GGA AGG G	
EXON 5	F:GGG AAG GAG ACA TGC ACT GTC ATG G	307
	R:AAC TGG ATG AGG GCA AGG GAG AAG C	
EXON 6	F:CAC AGG TTC TGG TCC CCG AC	402
	R:CAC AGG TTC TGG TCC CCG AC	
EXON 7	F:ACT ACC TAA AGG TCT CCT AGT GC	367
	R:CAA ACC TCA TTC TTG CAG CAG G	
EXON 8	F:TGA GTC TGG CTT GGC TTA AAC C	294
	R:GGT GGG ATC ATA GAA CTG TAC C	
EXON 9	F:TAT GTG GGC TGT TCT GAA GG	285
	R:AGT TTC AAA GAC CTG AGG GC	
EXON 10	F:GTA TCC CTT CAT CCA GTC AAG G	378
	R:CCC AGG TTG CAT ATC AAA ACG G	
EXON 11	F:AAG GAA TCG GGG TGA GAT GAG AGA AGG GGC	398
	R:GGTACAAAGTTGCTGTAGACATTGGAGTCC	
EXON 12	F:ATG CCA CTG AGA ACT CTC TT	245
	R:AGT CTT CGA TTA CTG AGA AA	
EXON 13	F:GAC ACT TGA AGA GTT TTT GC	195
	R:TTT TCG GAC TTT TTC TGA TG	

2 结 果

2.1 河南省 PKU 患儿 pah 基因点突变检测结果 在对确诊的 83 例 PKU 患儿中,对其 pah 基因 13 个外显子及其双侧剪接区进行测序分析:在 166 条染色体中共检测到 62 种,162 个基因突变,突变检出率为 97.61%。83 例患儿中有 4 例只检测出 1 条染色体上等位基因的突变,6 例患儿检测到 6 个大片段缺失型杂合突变,3 例患儿为纯合型突变,其余 70 例患儿均为杂合型突变。

163 个突变位点分布于 pah 基因第 2 至第 12 外显子及第 2、3、4、12 内含子区域(表 2),发生突变频率最高的区域是第 6、7、11 外显子区域,占总体突变的 64.1%;在所有点突变中,发生频率最高突变类型的为替换突变,其突变频率为 74.4%,其余突变类型依次为剪接区突变、沉默突变、缺失突变和无义突变,突变频率分别为 13.5%、5.8%、3.8%和 2.6%;突变频率最高的位点为 c.728G>A(p.R243Q),突变频率为 15.38%、其次为 c.611A>G(p.Y204C)、c.721C>T(p.R241C)、c.1197A>T(p.V399V)和 c.158G>A(p.R53H),其突变频率依次为 9.62%、7.05%、7.05%和 5.13%,其余位点的突变频率均在 0.64%~4.49%。

表 2 河南省 83 例 PKU 患儿 pah 基因突变情况

突变区域	氨基酸改变	碱基改变	突变类型	等位基因突变数	突变频率(%)
E2	p. G46R	c. 136G>C	替换	1	0.64
E2	p. R53H	c. 158G>A	替换	8	5.13
I2	IVS2+19T>C	c. 168+19T>C	剪接	1	0.64
I2	IVS2+5G>C	c. 168+5G>C	剪接	1	0.64
E3	p. S70del	c. 206-208delCTT	缺失	1	0.64
E3	p. S70del	c. 208-210del	缺失	2	1.28
E3	p. R71H	c. 212G>A	替换	1	0.64
E3	p. D84G	c. 251A>G	替换	1	0.64
E3	p. I95del	c. 284-286delTCA	缺失	1	0.64
E3	p. H107R	c. 320A>G	替换	1	0.64
E3	p. R111X	c. 331C>T	无义	2	1.28
I3	IVS3-22C>T	c. 352-22C>T	剪接	1	0.64
E4	p. P147L	c. 440C>T	替换	1	0.64
I4	IVS4+3G>C	c. 441+3G>C	剪接	1	0.64
I4	IVS4+43C>A	c. 441+43C>A	剪接	1	0.64
I4	IVS4-1G>A	c. 442-1G>A	剪接	3	1.92
E5	p. Y166X	c. 498C>G	替换	2	1.28
E5	p. H70R	c. 509A>G	替换	1	0.64
E6	p. R176X	c. 526C>T	无义	2	1.28
E6	p. T193P	c. 579A>C	替换	1	0.64
E6	p. Y204C	c. 611A>G	替换	15	9.62
E6	p. Y206C	c. 617A>G	替换	3	1.92
E6	p. H220P	c. 659A>C	替换	1	0.64
E6	p. C203Y	c. 608G>A	替换	1	0.64
E6	p. Q232X	c. 694C>T	替换	2	1.28
E7	p. R241C	c. 721C>T	替换	11	7.05
E7	p. R241Profs	c. 722delG	缺失	2	1.28
E7	p. R241H	c. 722G>A	替换	3	1.92
E7	p. L242F	c. 724C>T	替换	1	0.64
E7	p. R243Q	c. 728G>A	替换	24	15.38
E7	p. V245V	c. 735G>A	沉默	1	0.64
E7	p. G247R	c. 739G>C	替换	3	1.92
E7	p. G247V	c. 740G>T	替换	5	3.21
E7	p. L255S	c. 764T>C	替换	1	0.64
E7	p. I324N	c. 782G>A	替换	2	1.28
E7	p. F263S	c. 788T>C	替换	1	0.64
E7	p. C265Y	c. 794G>A	替换	1	0.64
E7	p. M276K	c. 827T>A	替换	1	0.64
E7	p. E280K	c. 838G>A	替换	1	0.64
E8	p. S303P	c. 907T>C	替换	1	0.64
E9	p. S310C	c. 929C>G	替换	1	0.64
E9	p. P314T	c. 940C>A	替换	1	0.64
E9	p. A322D	c. 965C>A	替换	1	0.64
E9	p. I324N	c. 971T>A	替换	1	0.64
E10	p. Y325X	c. 975C>G	沉默	1	0.64
E10	p. G344S	c. 1030G>A	替换	1	0.64

续表 2 河南省 83 例 PKU 患儿 pah 基因突变情况

突变区域	氨基酸改变	碱基改变	突变类型	等位基因突变数	突变频率(%)
E10	p. S349A	c. 1045T>G	替换	1	0.64
I10	IVS10-11G>A	c. 1066-11G>A	剪接	1	0.64
E11	p. Y356X	c. 1068C>A	沉默	7	4.49
E11	p. V399V	c. 1197A>T	剪接	11	7.05
E12	p. A403V	c. 1208G>T	替换	1	0.64
E12	p. R413P	c. 1238G>C	替换	6	3.85
E12	p. T418P	c. 1252A>C	替换	1	0.64
E12	p. Q419R	c. 1256A>G	替换	2	1.28
E12	p. A434D	c. 1301C>A	替换	6	3.85
I12	IVS12+6T>A	c. 1315+6T>A	剪接	1	0.64

2.2 河南省 PKU 患儿 pah 基因大片段缺失检测结果 在本研究中,通过 MLPA 技术共发现 6 例患者的 pah 基因出现大片段缺失型突变,缺失突变发生在其 pah 基因第 1、4、5、6、7 外显子及其基因上游的调控区域,其中 3 例患者(PKU033、PKU039、PKU055)检测到了发生在 pah 第 4、5 外显子上的大片段缺失(图 1A、B、F),其血浆 Phe 浓度分别为 0.181、0.196 g/L 和 0.202 g/L(表 3); 2 例患者(PKU015、PKU027)检测到了发生在 pah 基因第 1 外显子的大片段缺失(图 1D、E),其血浆苯丙氨酸浓度分别为 0.072、0.123 g/L(表 3); 1 例患者(PKU012)检测到了发生在 pah 基因第 5、6、7 外显子的大片段缺失(图 1C),其血浆 Phe 浓度分别为 0.329 g/L(表 3)。

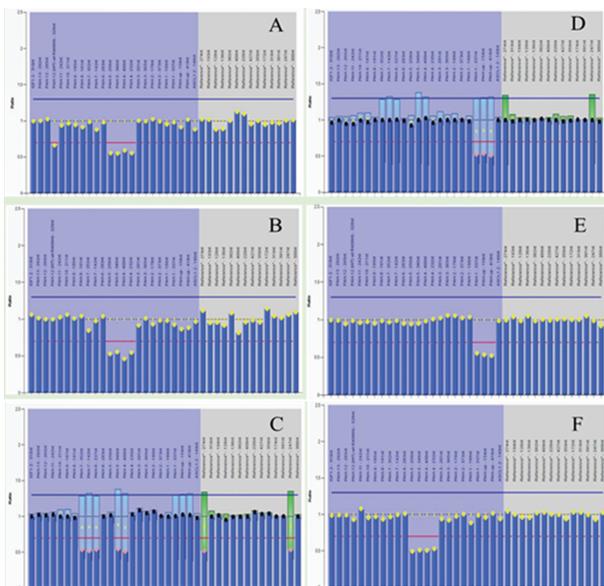
表 3 pah 基因大片段缺失型 PKU 患者一般临床资料

患者编号	性别	年龄	血浆苯丙氨酸浓度(g/L)
PKU012	女	36 d	0.329
PKU015	男	57 d	0.072
PKU027	男	120 d	0.123
PKU033	男	9 岁	0.181
PKU039	女	90 d	0.196
PKU055	女	30 d	0.202

3 讨 论

PKU 是常见的遗传代谢性疾病,其主要机制是人体内 pah 基因发生突变,导致 pah 结构及活性改变^[5]。pah 基因突变位点多处于外显子或者外显子与内含子的交接区^[6],影响一个或多个氨基酸。根据对 pah 酶活性有无影响,分为沉默突变和致病突变。沉默突变对 pah 酶活性无影响。致病突变大部分发生在外显子或外显子和内含子的交接区域,严重影响 pah 基因转录和翻译以及蛋白质异常折叠、聚合,使其加速降解,从而影响 pah 酶的催化活性。pah 基因的突变具有位置多变、类型多样及异质性等特点^[7],而且不同民族和地区之间基因突变的频率和突变类型存在较大差异^[8]。

pah 突变的标准分子分析包括对所有的外显子和外显子边缘的 Sanger 测序,同时可使用多重连接探针扩增技术(MLPA 技术)进行补充^[9]。pah 基因的基因组 DNA 分析也可以被扩展到 EBV-永生化的淋巴细胞提取的 cDNA 分析,以确定或确认转录异常^[10]。Sanger 测序主要用于检测错义突变、剪切位点突变以及小片段的插入和缺失,MLPA 技术则可检测大片的缺失、复杂的重排及拷贝数变异,二者联合使用可以取长补短,提高诊断准确率^[11]。MLPA 是基于分子诊断的敏感有效的技术,包括缺失和大型基因组区域的复制^[12]。在 PKU 患者中,大部分等位基因突变伴随着错义突变和大片段缺失。有研究采



A:PKU033 患者在 pah 基因第 4、5 外显子区域发现大片段缺失; B:PKU039 患者在 pah 基因第 4、5 外显子区域发现大片段缺失; C: PKU012 患者在 pah 基因第 5、6、7 外显子区域发现大片段缺失; D: PKU015 患者在 pah 基因第 1 外显子区域发现大片段缺失; E:PKU027 患者在 pah 基因第 1 外显子区域; F:PKU055 患者在 pah 基因第 4、5 外显子发现大片段缺失

图 1 多重连接探针扩增技术(MLPA)检测结果图

用 MLPA 技术,对 59 例未知突变等位基因的捷克 PKU 患者进行检测,发现 31 例患者携带大片段缺失突变^[13]。有学者在研究罗马尼亚人的 PKU 基因型频谱时,采用 Sanger 测序和 MLPA、cDNA 分析的结合,达到了对 PKU 99% 的诊断效率^[14]。

本研究中 pah 基因的突变位点集中在 6、7、11、12 这 4 个外显子及其两端的内含子剪接区中,同数据库中的统计结果和以往中国人群中 pah 基因突变的调查结果基本一致。本研究 PCR 扩增产物的直接测序结果突变频率在 5% 以上的热点突变中 c. 728G>A、c. 611A>G、c. 1197A>T 的突变频率与以往文献资料相一致^[15],而 c. 721C>T 和 c. 158G>A 的突变发生率较高,其频率分别为 7.05% 和 5.13%,同其他省份人群的 PKU 突变热点不同^[1,7,16],提示其可能是河南人群中 pah 基因的特有突变。

测序后使用 MLPA 共检测到 6 例 PKU 患者其 pah 基因发生大片段缺失突变,6 例患者血浆中 Phe 的浓度相差较大,其中血浆中浓度最低的患者其大片段缺失发生在 pah 基因的第 1 外显子,而发生在第 5、6、7 外显子的大片段缺失突变的患者血浆中 Phe 的浓度最高达 0.329 g/L。这种差异存在可能与大片段缺失发生的位置有关,由于 pah 基因第 1 外显子所编码的氨基酸位于酶蛋白的调控域,而 5、6、7 外显子所编码的氨基酸位于蛋白的活性中心域,因此当区域发生大片段缺失突变时,酶的活性下降程度相对较大。此外,由于大片段缺失突变发生频率相对较低,对于这种突变的基因型表型的关系研究还需要扩大样本量进行深入的探讨。

综上所述,使用 MLPA 进行 pah 基因大片段缺失的检测,是对 PKU 患者常规突变筛查的补充,为 PKU 患者的诊断治疗以及 PKU 患者家系的研究提供理论依据,值得进一步推广和应用于临床诊断。

参考文献

[1] 赵靖,李佳红,任朋顺,等. 邯郸地区苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变的研究[J]. 中国妇幼保健,2017,32(3):554-556.

[2] 顾学范,王治国. 中国 580 万新生儿苯丙酮尿症和先天性甲状腺功能减低症的筛查[J]. 中华预防医学杂志,2004,38(2):27-30.

[3] 樊欣,周晓军,吕惠敏,等. 重庆市新生儿疾病筛查 12 年结果回顾性分析[J]. 重庆医学,2009,38(24):3058-3059.

[4] 孟云,赵德华,赵悦淑,等. 河南省 3 年 2 574 258 例新生儿苯丙酮尿症筛查探讨[J]. 医药论坛杂志,2014,35(8):

134-135.

[5] SUMAILY K M, MUJAMAMMI A H. Phenylketonuria: A new look at an old topic, advances in laboratory diagnosis, and therapeutic strategies[J]. Int J Health Sci (Qassim), 2017, 11(5):63-70.

[6] 周小合,谭红,麦伟明. 深圳地区苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变特征及分布情况研究[J]. 中国优生与遗传杂志,2018,26(7):128-130.

[7] 毛新梅,何江,刘媛,等. 宁夏汉族苯丙氨酸羟化酶基因突变分析[J]. 中国儿童保健杂志,2013,21(4):351-354.

[8] 王慧琴,补娟,赵宗峰,等. 新疆维吾尔族苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变研究[J]. 中华疾病控制杂志,2016,20(1):99-100,106.

[9] VIEIRA NETO E, LARANJEIRA F, QUELHAS D, et al. Mutation analysis of the PAH gene in phenylketonuria patients from Rio de Janeiro, Southeast Brazil[J]. Mol Genet Genomic Med, 2018, 6(4):575-591.

[10] ZHANG Y, ZHAO X, JI J, et al. Molecular cloning and characterization of a phenylalanine hydroxylase from the common cutworm Spodoptera litura[J]. J Asia Pac Entomol, 2016, 19(2):365-370.

[11] 黄际卫,唐宁,李伍高,等. Sanger 测序联合 MLPA 技术检测 21-羟化酶缺乏症基因缺陷及产前诊断[J]. 中国儿童保健杂志,2017,25(10):981-983,988.

[12] ABDELWAHEB M, HILBERT P, AHMED A, et al. Mutational analysis in patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD): Identification of five mutations in the PKD1 gene[J]. Gene, 2018, 671:28-35.

[13] KOZAK L, HRABINCOVA E, KINTR J, et al. Identification and characterization of large deletions in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene by MLPA: Evidence for both homologous and non-homologous mechanisms of rearrangement[J]. Mol Genet Metab, 2006, 89(4):300-309.

[14] GEMPERLE-BRITSCHGI C, IORGULESCU D, MAGER M A, et al. A novel common large genomic deletion and two new missense mutations identified in the Romanian phenylketonuria population[J]. Gene, 2016, 576(1):182-188.

[15] 易燕,刘芳,柴艳婷,等. 十堰市苯丙酮尿症儿童苯丙氨酸羟化酶基因突变检测研究[J]. 河北医药,2017,39(2):300-302.

[16] 王震文,周保成,毛华芬,等. 连云港地区苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变谱的构建及其应用[J]. 临床检验杂志,2016,34(5):362-365.

(收稿日期:2018-06-17 修回日期:2018-10-09)