

# 限制性 dNTP PCR 结合 HRM 技术检测脊髓性肌萎缩症 SMN1 基因拷贝数变异分析

何俊英<sup>1</sup>, 薛青霞<sup>1a</sup>, 胡晓玲<sup>1a</sup>, 朱雨英<sup>1b</sup>, 周 玉<sup>2</sup>, 何 鑫<sup>1a</sup>, 赵燕飞<sup>1a</sup>, 吴胜兰<sup>1c</sup>

1. 浙江省衢州市妇幼保健院 a. 检验科, b. 产前诊断中心, c. 妇保保健科, 浙江 衢州 324000; 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院 (电子科技大学附属医院) 基因测序中心, 四川 成都 610072

**【摘要】 目的** 建立一种简单、快速且准确性高的拷贝数变异 (CNV) 检测方法——限制性 dNTP 的两重 PCR 与高分辨率熔解曲线 (HRM) 结合法, 检测脊髓性肌萎缩症 (SMA) 致病基因 SMN1 的 7 和 8 号外显子拷贝数情况。**方法** 收集 42 例经多重连接依赖探针扩增技术 (MLPA) 确认 SMN1 基因 7 和 8 号外显子拷贝数的样本, 建立限制性 dNTP 的两重 PCR 与 HRM 结合法的检测技术体系; 对衢州地区 2929 例孕早期孕妇和 1 例疑似 SMA 患儿进行 SMN1 基因拷贝数检测。**结果** 与 SMA 基因诊断金标准 MLPA 相比, 限制性 dNTP 的两重 PCR 与 HRM 结合法对 42 例样本 SMN1 7 和 8 号外显子的检测结果与其结果一致, 准确性为 100%。另外, 利用该方法筛查 2929 例孕早期孕妇共检出 SMN1 基因 7 和 8 号外显子同时杂合缺失 39 例、仅 SMN1 基因 7 号杂合缺失 3 例、仅 SMN1 基因 8 号外显子杂合缺失 10 例, 其人群携带率为 1/70 (42/2929); 对 1 例疑似 SMA 患儿样本检测结果为 SMN1 基因 7 和 8 号外显子纯合缺失。**结论** 限制性 dNTP 的两重 PCR 与 HRM 结合法检测 SMN1 的 7 和 8 号外显子缺失情况与 MLPA 一致。该方法可用于 SMA 携带者筛查及诊断, 能降低 SMA 筛查和诊断的检测成本以及缩短检测周期; 同时减少了检测操作难度, 提高了准确性。

**【关键词】** 脊髓性肌萎缩症; 运动神经元存活基因 1; 拷贝数变异; 多重连接依赖探针扩增技术; 高分辨率熔解曲线

**【中图分类号】** R394.3

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1672-6170 (2025) 04-0105-07

**Detection of SMN1 gene copy number variation in spinal muscular atrophy by restricted dNTP PCR combined with HRM technology** HE Jun-ying<sup>1</sup>, XUE Qing-xia<sup>1a</sup>, HU Xiao-ling<sup>1a</sup>, ZHU Yu-ying<sup>1b</sup>, ZHOU Yu<sup>2</sup>, HE Xin<sup>1a</sup>, ZHAO Yan-fei<sup>1a</sup>, WU Sheng-lan<sup>1c</sup> 1a. Laboratory Department, 1b. Prenatal Diagnosis Center, 1c. Maternal and Child Health Department, Maternal and Child Health Care Home of Quzhou City, Quzhou 324000, China; 2. Gene Sequencing Center, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital (Affiliated Hospital of University of Electronic Science and Technology of China), Chengdu 610041, China

**【Abstract】 Objective** To establish a simple, rapid and highly accurate copy number variation (CNV) detection method, which combines restricted dNTP duplex PCR with high-resolution melting curve (HRM) to detect the copy number of exons 7 and 8 of the spinal muscular atrophy (SMA) pathogenic gene SMN1. **Methods** We collected 42 samples of SMN1 gene exon 7 and 8 copy numbers confirmed by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and established a detection technology system combining restricted dNTP duplex PCR and HRM. The SMN1 gene copy detection in 2,929 early pregnant women and a suspected SMA sick child in Quzhou area were performed by using this method. **Results** Compared with MLPA, the gold standard for SMA genetic diagnosis, the detection results of SMN1 exons 7 and 8 in the 42 samples by duplex PCR combined with restriction dNTPs were consistent. The accuracy was 100%. In addition, 39 cases of heterozygous deletion of both exons 7 and 8 of the SMN1 gene were detected in the 2929 pregnant women using this method. There were 3 cases of heterozygous deletion of only exon 7 of the SMN1 gene and 10 cases of heterozygous deletion of only exon 8 of the SMN1 gene. The frequency of SMA carriers in this group was 1/70 (42/2929). The test result of a suspected SMA patient sample was a homozygous deletion of exons 7 and 8 of the SMN1 gene. **Conclusions** The results of restriction dNTP PCR and HRM assay for the detection of SMN1 exons 7 and 8 were consistent with MLPA. This method can be used for SMA carrier screening and diagnosis. It can reduce the detection cost and shorten the detection cycle of SMA screening and diagnosis. At the same time, it reduces the difficulty of detection operation and improves the accuracy.

**【Key words】** Spinal muscular atrophy; Survival of motor neurons1; Copy number variation; Multiplex ligation-dependent probe amplification; High resolution melting

脊髓性肌萎缩症 (spinal muscular atrophy, SMA) 因脊髓前角运动神经元退化变性和丢失导致肌无力和肌萎缩的常染色体隐性遗传性疾病, 其死亡率居致死性常染色体隐性遗传性疾病的第二位。SMA

的发病率为 1/10000 ~ 1/6000, 携带率为 1 : 100 ~ 1 : 41<sup>[1-4]</sup>。根据发病时间和临床表现, 可分为脊髓性肌萎缩症 1 型 (SMA 1 型, 重度), 脊髓性肌萎缩症 2 型 (SMA 2 型, 中度), 脊髓性肌萎缩症 3 型 (SMA 3 型, 轻度), 脊髓性肌萎缩症 4 型 (SMA 4 型, 成年人轻度); 其中 SMA 1 型最严重, 出生后 6 个月内即会出现肌无力等症状, 一般在 2 岁前因呼

吸衰竭而死<sup>[5]</sup>。研究显示,约 95% 的 SMA 患者是由 5q13.2 区域的运动神经元存活基因 1 (survival of motor neurons 1, SMN1) 7 号外显子纯合缺失或 7 号和 8 号同时纯合缺失所致,5% 是由 SMN1 基因复合杂合所致,即一个等位基因缺失,另一个等位基因发生单核苷酸变异 (single nucleotide variation, SNV)<sup>[6]</sup>。因 SMA 致病基因变异在人群中的携带率高、患者症状严重并具有致死性,故对人群筛查 SMN1 基因 7 号和 8 号外显子缺失情况,有利于预防 SMA、提高出生人口素质。

目前用于拷贝数变异 (copy number variation, CNV) 检测的方法包括染色体芯片分析 (chromosomal microarray analysis, CMA)、荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 技术、多重连接依赖扩增 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) 技术等<sup>[7,8]</sup>。其中 MLPA 是荷兰学者 Schouten 于 2002 年提出的、用于目标靶序列定性和定量分析的 CNV 检测技术,具有重复性稳定性好、准确性高等优点。目前 MLPA 已被国内外 SMA 管理共识推荐为 SMA 诊断的金标准<sup>[6,9,10]</sup>;但 MLPA 检测成本较高、需要专业操作和分析人员等缺点限制其在 SMA 筛查的应用。高分辨率熔解曲线 (high resolution melting, HRM) 是在 PCR 基础上加入饱和荧光染料、监测扩增产物熔解曲线变化的核酸分析技术。因其具有高通量、低成本、高灵

敏度和高特异性等优点,是基因变异筛查的首选方法之一,可应用于临床大规模人群基因变异筛查<sup>[11]</sup>。本文旨在通过与 MLPA 结果比较,建立限制性 dNTP 的两重 PCR 与 HRM 结合法检测 SMN1 7 和 8 号外显子拷贝数的方法,并对 2929 例孕早期妇女外周血样本进行 SMA 携带者筛查,调查衢州地区孕妇人群中 SMN1 基因致病变异携带情况。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 2019 年 11 月至 2022 年 11 月衢州市妇幼保健院 42 例已经 MLPA 检测过的外周血样本,以及送检的 2929 例表型正常且无 SMA 家族的孕早期妇女和 1 例有临床症状的疑似 SMA 患儿。

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取** 使用 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝采集检测者外周血 2 ml。使用厦门致善生物科技股份有限公司生产的核酸提取磁珠试剂盒提取 DNA;DNA 浓度和纯度使用美国 Thermo Scientific 公司 Nanodrop2000 分光光度计进行测定;质控合格的 DNA 置于 -20 ℃ 保存。

**1.2.2 限制性 dNTP 的两重 PCR 与 HRM 结合法检测** 内参基因与 SMN1 的 7 号外显子 (E7) 的引物参考文献设计<sup>[12,13]</sup>,8 号外显子 (E8) 利用在线引物设计软件 Primer 3 ([http://bioinfo. ut. ee/primer3-0.4.0/primer3/](http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/)) 或 UCSC ExonPrimer 工具 (表 1);由华大基因生物科技有限公司合成引物。

表 1 内参基因 (CFTR)、SMN1-E7 和 SMN1-E8 引物序列

| 引物名称    | 上游引物                      | 下游引物                    |
|---------|---------------------------|-------------------------|
| CFTR    | CTCCTCATGGGCTAATCTG       | AAGTCCACAGAAGGCAGACG    |
| SMN1-E7 | TTCCTTTATTTTCCTTACAGGGTTT | CCTTCCTTCTTTTGATTGTGCTG |
| SMN1-E8 | AAAACCATCTGTAAAAGACTGG    | CAAATTTTCTCAACTGCCTCA   |

SMN1-E7 扩增 25 μl 体系:10×PCR Buffer 2.5 μl、dNTP 2 μl、无菌 ddH<sub>2</sub>O 以 2:98 稀释的 SYTO9 染料 1 μl、r Taq 0.2 μl、CFTR 引物各 0.5 μl、SMN1-E7 引物各 1.5 μl、DNA 模板 50 ng、无菌 ddH<sub>2</sub>O 补齐 25 μl。SMN1-E8 扩增 25 μl 体系:betaine (5 mol/mL) 5 μl、10×PCR Buffer 2.5 μl、dNTP 2 μl、用无菌 ddH<sub>2</sub>O 以 2:98 稀释的 SYTO9 染料 1 μl、r Taq 0.2 μl、CFTR 引物各 0.5 μl、SMN1-E8 引物各 1.5 μl、DNA 模板 50 ng、无菌 ddH<sub>2</sub>O 补齐 25 μl。HRM 检测条件:预变性 95 ℃ 5 min;变性 95 ℃ 10 sec,退火、延伸 63 ℃ 30 sec,重复循环 40 次;以 65 ℃ ~ 95 ℃,0.5 ℃/s 梯度对 PCR 产物进行熔解,最后对高分辨率熔解曲线进行基因分型分析。

**1.2.3 MLPA 检测** 用 MRC-Holland 公司的 SALSA MLPA probemix P021 SMA 检测试剂盒以及 MRC-Holland 公司推荐的相关厂家产品,检测 SMN1 基因

E7、E8 拷贝数。MLPA 是 SMA 诊断的金标准<sup>[6,9,10]</sup>,因此本文利用 MLPA 法对限制性 dNTP 的两重 PCR 与 HRM 结合法检测 SMN1 基因 7 号外显子缺失变异进行方法学评价。

## 2 结果

**2.1 限制性 dNTP 的两重 PCR 与 HRM 结合法检测 SMN1 拷贝数样本 DNA 起始浓度的确定** 首先选择 12 例已确定 SMN1 E7、E8 拷贝数的样本,分成 4 组,将其 DNA 浓度分别稀释至 50 ng/μl、25 ng/μl、12.5 ng/μl、6.25 ng/μl,然后利用限制性 dNTP 的两重 PCR 与 HRM 结合法进行 SMN1 E7、E8 检测。结果显示 4 种 DNA 浓度均能对 SMN1 E7、E8 拷贝数进行检测,但随着 DNA 浓度的降低检测峰值信号下降 (图 1、图 2),对基因分型的判断产生影响。为保证基因分型的准确性,选择 50 ng/μl 作为限制性 dNTP 的两重 PCR 与 HRM 结合法起始 DNA 浓度。

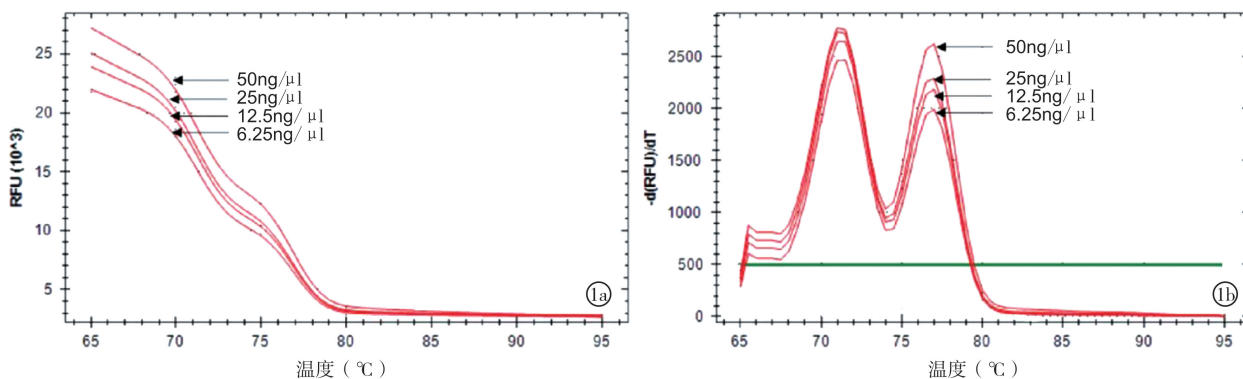


图1 不同DNA模板浓度对SMN1基因E7拷贝数检测信号峰值的影响 a:溶解曲线图;b:熔解峰值图

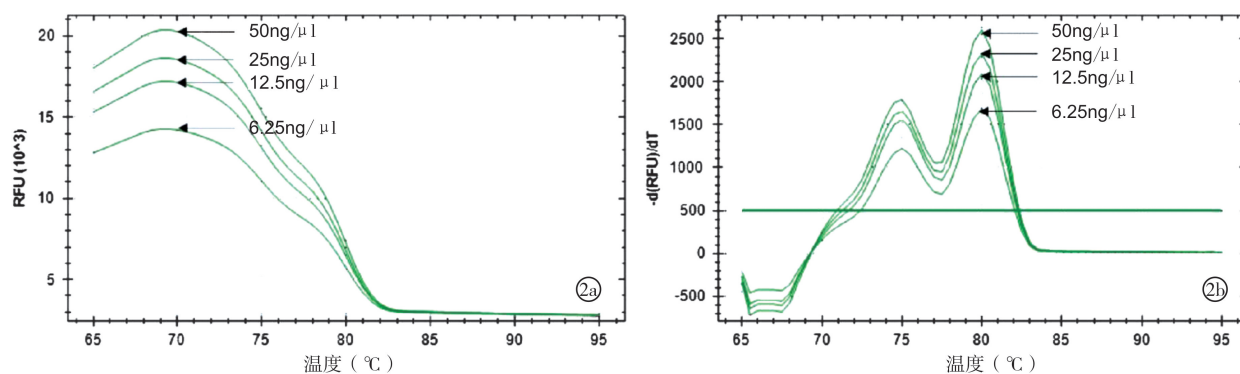


图2 不同DNA模板浓度对SMN1基因E8拷贝数检测信号峰值的影响 a:溶解曲线图;b:熔解峰值图

**2.2 限制性dNTP的两重PCR与HRM结合法检测SMN1拷贝数的方法学评价** 随后挑选42例已经过MLPA检测确定SMN1基因E7和E8拷贝数情况的样本分批进行限制性dNTP的两重PCR与HRM结合法检测,每个样本做3个平行实验(图3、图4),其中未见缺失的野生型(拷贝数为2)样本10例、杂合缺失(拷贝数为1)样本22例、纯合缺失(拷贝数为0)样本10例。结果显示所有样本的SMN1基因E7、E8拷贝数均被限制性dNTP的两重PCR与HRM结合法检出(表2),其特异性和敏感性均为100%。另外,该方法与MLPA相比,其检测结果一致,准确性为100%(表3)。

**2.3 2929例无症状孕妇SMN1基因E7、E8拷贝数检测情况** 利用限制性dNTP的两重PCR与HRM结合法对2929例孕早期妇女进行SMA携带者筛查。结果检出39例SMN1基因E7、E8同时杂合缺失,10例仅SMN1基因E8杂合缺失,3例仅SMN1基因E7杂合缺失以及2877例野生型(表4)。因SMN1基因E8单独缺失并不导致SMA,故在统计SMA携带者频率时只计算SMN1基因E7和E8同时杂合缺失以及仅SMN1基因E7杂合缺失的42例样本;经统计SMA在该检测群体中的疾病携带者频率约为1/70(42/2929)。

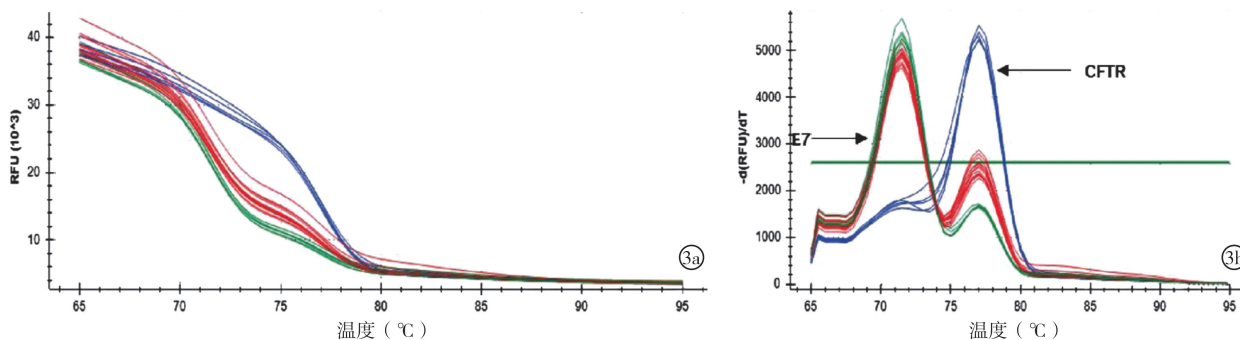


图3 限制性dNTP的两重PCR与HRM结合法检测SMN1基因E7拷贝数结果图 a:溶解曲线图;b:熔解峰值图;CFTR为内参基因。b图中,左侧峰代表SMN1基因E7拷贝数情况,右侧峰代表内参基因拷贝数情况。蓝色:0拷贝(纯合缺失);红色:1拷贝(杂合缺失);绿色:2拷贝(野生型)

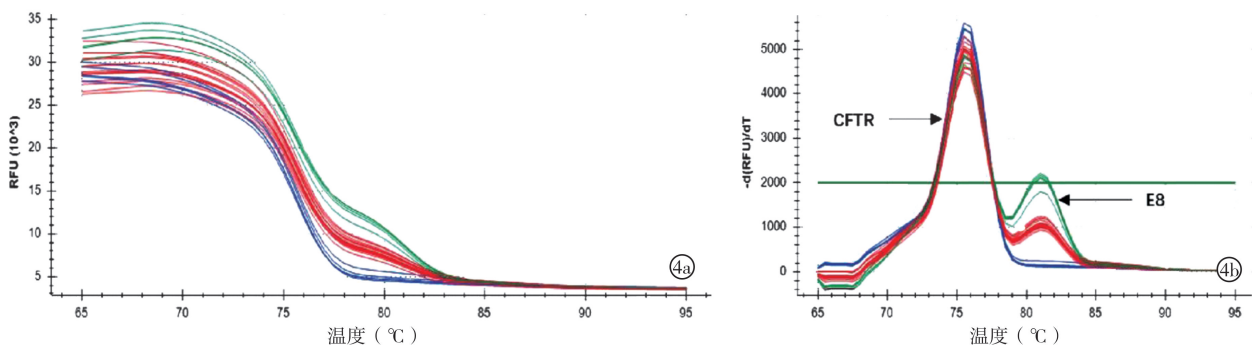


图4 限制性 dNTP 的两重 PCR 与 HRM 结合法检测 SMN1 基因 E8 拷贝数结果图 a;溶解曲线图;b:熔解峰型图;CFTR 为内参基因。b 图中,左侧峰代表内参基因拷贝数情况,右侧峰代表 SMN1 基因 E8 拷贝数情况。蓝色:0 拷贝(纯合缺失);红色:1 拷贝(杂合缺失);绿色:2 拷贝(野生型)

表 2 限制性 dNTP 与 HRM 结合法检测 42 例样本 SMN1 基因 7 号和 8 号外显子拷贝数情况

| 检测目标    | 基因型  | 拷贝数 | 样本数 | 限制性 dNTP 与 HRM 检出情况 |
|---------|------|-----|-----|---------------------|
| SMN1-E7 | 野生型  | 2   | 10  | 10                  |
|         | 杂合缺失 | 1   | 22  | 22                  |
|         | 纯合缺失 | 0   | 10  | 10                  |
| SMN1-E8 | 野生型  | 2   | 13  | 13                  |
|         | 杂合缺失 | 1   | 22  | 22                  |
|         | 纯合缺失 | 0   | 7   | 7                   |

表 3 限制性 dNTP 两重 PCR 与 HRM 结合法与 MLPA 检测结果比较

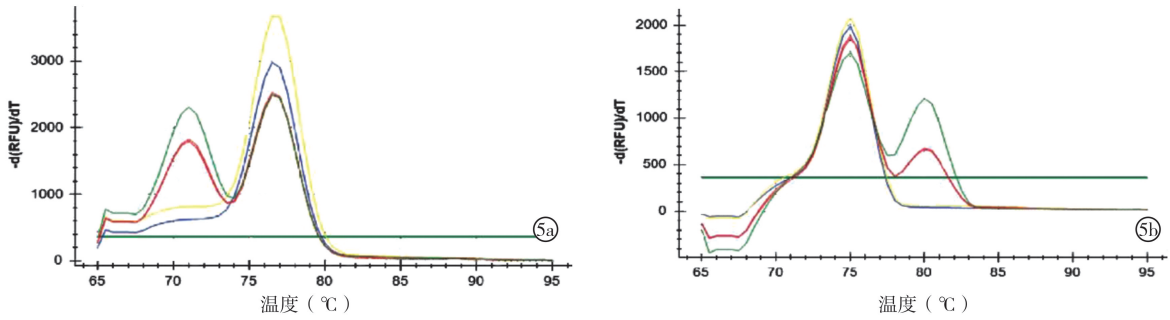
| 检测方法           | SMN1 E7-E8 未缺失 | SMN1 E7-E8 同时纯合缺失 | SMN1E7 纯合缺失 | SMN1E7-E8 同时杂合缺失 | 合计 |
|----------------|----------------|-------------------|-------------|------------------|----|
| MLPA           | 10             | 7                 | 3           | 22               | 42 |
| 限制性 dNTP 与 HRM | 10             | 7                 | 3           | 22               | 42 |

表 4 2929 例孕早期妇女 SMN1 E7、E8 拷贝数情况

| 变异类型                 | 拷贝数 | 受检者人数 | 占比(%) |
|----------------------|-----|-------|-------|
| SMN1 E7、E8 未见缺失(野生型) | 2   | 2877  | 98.23 |
| SMN1E7、E8 同时杂合缺失     | 1   | 39    | 1.33  |
| SMN1E8 杂合缺失          | 1   | 10    | 0.34  |
| SMN1 E7 杂合缺失         | 1   | 3     | 0.10  |
| 总计                   |     | 2929  |       |

2.4 对疑似 SMA 患儿检测情况 对 1 例疑似 SMA 患儿及其父母外周血提取 DNA 后,同时进行限制性 dNTP 的两重 PCR 与 HRM 结合法和 MLPA

检测。两种方法的结果均显示疑似 SMA 患儿为 SMN1 基因 E7、E8 的纯合缺失,而其父母均为 SMN1 基因 E7、E8 的杂合缺失(图 5、图 6)。





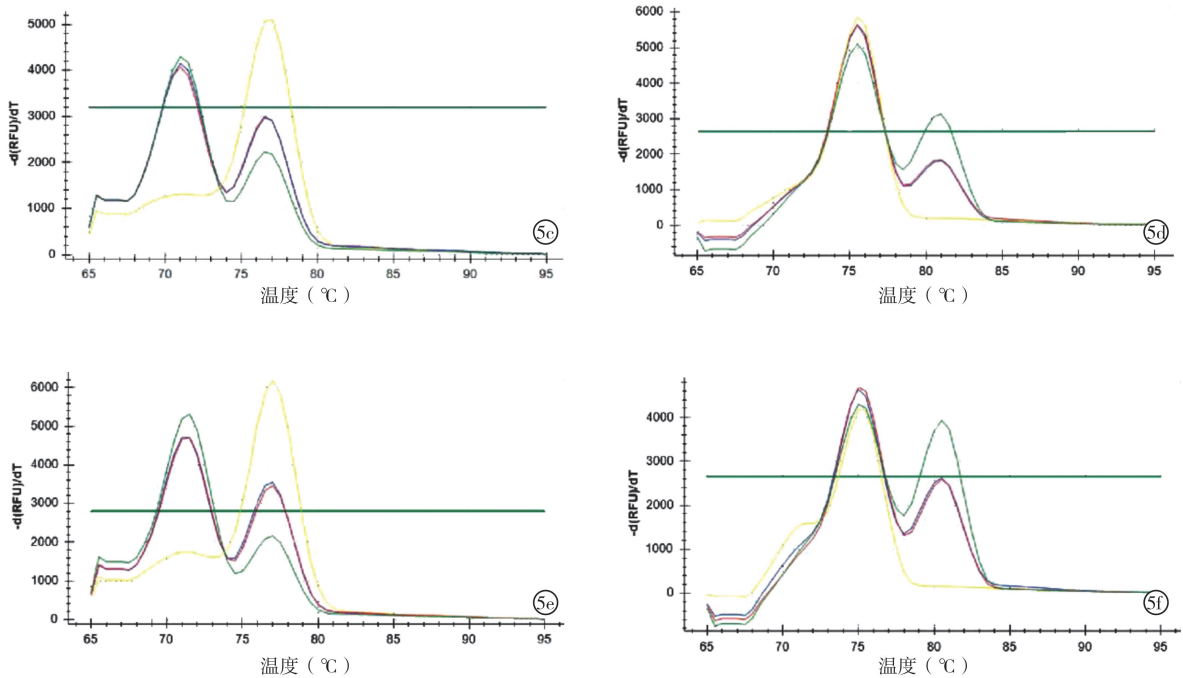


图5 限制性 dNTP 的两重 PCR 与 HRM 结合法检测患儿及其父母 SMN1 基因 E7(左)、E8(右) 拷贝数结果图 a、b: 患儿; c、d: 父亲; e、f: 母亲; 红线为杂合缺失对照样本; 黄线为纯合缺失对照样本; 绿线为正常对照样本; 蓝线为待检测样本

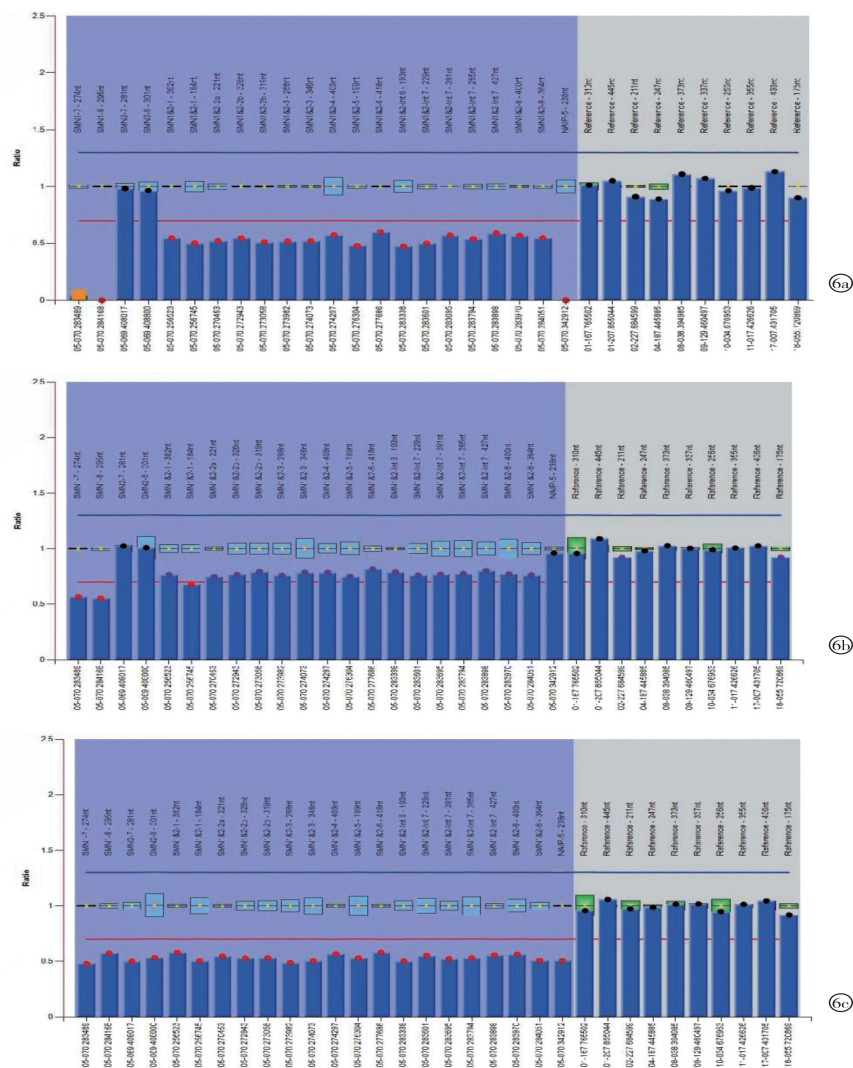


图6 MLPA 检测患儿及其父母 SMN1 基因 E7、E8 拷贝数结果图 a: 患儿; b: 父亲; c: 母亲

### 3 讨论

SMA 是一种临床症状严重的致死性遗传病,其临床治疗主要以患者当下的功能状态为主;尽管目前有诺西那生纳、利司扑兰和索伐瑞韦 3 种靶向药物治疗 SMA 患者,但其费用昂贵,不能满足所有患者的需求<sup>[14~16]</sup>。因此,预防 SMA 患儿出生的有效手段仍是携带者筛查和产前遗传诊断。目前 MLPA 作为国内外 SMA 管理共识推荐的 SMA 诊断金标准,但其检测成本高、专业性强等局限性,在一定程度上影响 MLPA 作为 SMA 携带者筛查技术的推广和普及。因此,急需寻找一种操作简单、成本低、周期短、准确性又高的方法。

HRM 是通过监测 DNA 双链随着温度逐渐增高而逐渐解链的过程中荧光信号的衰减变化而实现的,具有高分辨率、准确性高、操作简便、成本低等优点,被广泛用于单核苷酸变异、拷贝数变异的分析。Borun 等利用 C-HRM 技术对 16 例杜氏肌营养不良患者和 20 名正常人进行比较,发现 C-HRM 检测结果与之前研究的结果 100% 一致<sup>[17]</sup>。Zhang 等研究发现 46 例 22q11.2 微缺失综合征患者的限制性 dNTP PCR 与 HRM 结合法检测结果与 MLPA 结果一致<sup>[12]</sup>。在本研究中,以 MLPA 为标准检测方法,建立限制性 dNTP 两重 PCR 与 HRM 结合法对 42 例携带不同 SMN1 拷贝数的样本进行检测。检测结果显示该方法与 MLPA 结果一致,准确性为 100%。另外,同时利用限制性 dNTP 两重 PCR 与 HRM 结合法和 MLPA 检测 1 例疑似 SMA 患儿及其父母,两方法均显示患儿为 SMN1 基因 E7、E8 纯合缺失,其父母为 SMN1 基因 E7、E8 杂合缺失。盲样检测和实际临床样本检测提示限制性 dNTP 两重 PCR 与 HRM 结合法可用于 SMA 携带者筛查,也可针对有症状的患儿进行准确诊断。随后用限制性 dNTP 两重 PCR 与 HRM 结合法检测 2929 例孕早期妇女 SMN1 基因 E7 和 E8 缺失情况,结果显示 39 例为 SMN1 基因 E7 和 E8 同时杂合缺失、10 例仅 SMN1 基因 E8 杂合缺失、3 例仅 SMN1 基因 E7 杂合缺失,其余 2877 例为野生型。

研究显示,不同地区和种族的 SMA 携带者频率不同。据报道,白种人的 SMA 携带者频率高达 1/45,黑种人携带者频率仅为 1/100;而在 119 718 例亚洲群体中,检测出 2492 例携带者,其携带者频率为 1/48<sup>[1]</sup>。我国 SMA 致病性变异的总体携带率为 1/83 ~ 1/45<sup>[18,19]</sup>。本研究通过对衢州地区 2929 例孕早期妇女的 SMA 携带者筛查,共发现 41 例 SMA

携带者,携带率为 1/70,与之前报道的中国人群众体携带率保存一致。

SMA 具有亲代向子代传递的特性,若夫妻双方均为 SMA 携带者,则生育 SMA 患儿的风险为 25%,故对备孕期或孕早期妇女及其配偶提供 SMA 携带者筛查,有利于预防 SMA。而本文研究的限制性 dNTP 两重 PCR 与 HRM 结合法,具有快速、简单、成本低、准确性高的特点,可广泛用于 SMA 携带者筛查,为预防 SMA 患者出生提供了快速、可靠的检测技术。

### 【参考文献】

- [1] Verhaart IEC, Robertson A, Wilson IJ, et al. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy—a literature review[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2017, 12(1):124.
- [2] Jumah MA, Rajeh SA, Eyaid W, et al. Spinal muscular atrophy carrier frequency in Saudi Arabia[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2022, 10(11):e2049.
- [3] Park JE, Yun SA, Roh EY, et al. Carrier Frequency of Spinal Muscular Atrophy in a Large-scale Korean Population[J]. *Ann Lab Med*, 2020, 40(4):326-330.
- [4] Sypniewski M, Kresa D, Dobosz P, et al. Population WGS-based spinal muscular atrophy carrier screening in a cohort of 1076 healthy Polish individuals[J]. *J Appl Genet*, 2023, 64(1):135-139.
- [5] Nishio H, Niba ETE, Saito T, et al. Spinal Muscular Atrophy: The Past, Present, and Future of Diagnosis and Treatment[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(15):11939.
- [6] 北京医学会医学遗传学分会,北京罕见病诊疗与保障学会. 脊髓性肌萎缩症遗传学诊断专家共识[J]. *中华医学杂志*, 2020, 100(40):3130-3140.
- [7] Gordeeva V, Sharova E, Progress in Methods for Copy Number Variation Profiling[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(4):2143.
- [8] Arikani Y, Karauzum SB, Uysal H, et al. Evaluation of exonic copy numbers of SMN1 and SMN2 genes in SMA[J]. *Gene*, 2022, 823:146322.
- [9] Mercuri E, Finkel RS, Muntoni F, et al. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 1: Recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care[J]. *Neuromuscul Disord*, 2018, 28(2):103-115.
- [10] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会神经遗传学组. 脊髓性肌萎缩症中国三级预防指南[J]. *中华神经科杂志*, 2023, 56(5):476-484.
- [11] 郑昭璟, 傅启华, Zhou Luming. 高分辨溶解曲线分析技术的发展与展望[J]. *中华检验医学杂志*, 2017, 40(2):77-79.
- [12] Zhang X, Wang B, Zhang L, et al. Accurate diagnosis of spinal muscular atrophy and 22q11.2 deletion syndrome using limited deoxynucleotide triphosphates and high-resolution melting[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1):485.
- [13] Zhou L, Palais RA, Paxton CN, et al. Copy number assessment by competitive PCR with limiting deoxynucleotide triphosphates and