

## 致死性侏儒症 p.R248C 突变热点的快速检测和三例 TD-I 型高危胎儿的快速产前诊断

姜煜<sup>1</sup> 潘敬新<sup>2</sup> 郭东炜<sup>3</sup> 艾阳<sup>1</sup> 李荣<sup>1</sup> 蒋玮莹<sup>1</sup> 方群<sup>4</sup> 郭奕斌<sup>1\*</sup>

**[摘要]** 目的 针对致死性侏儒症 I 型(thanatophoric dysplasia type I, TD-I) *FGFR3* 基因的突变热点“p.R248C”, 建立快速特异的酶切鉴定法(restriction endonuclease testing, RE)和扩增受阻突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)/RE 法, 并应用于后续 3 例疑似 TD-I 高危胎儿的快速产前诊断, 以及时防止患胎出生, 同时为今后的胚胎植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)打下良好基础。方法 首先, 针对突变热点 p.R248C 突变前后的序列特点, 选择合适的内切酶“Afe I”, 建立酶切鉴定法。其次, 设计双错配碱基特异引物结合 *Apa* LI 酶切, 建立 ARMS/RE 双重特异鉴定法。对阴性和阳性结果均再用普通引物扩、测的结果进行验证。结果 用 *Afe* I 酶切 *FGFR3* 基因 exons(6-7) 普通引物的 PCR 产物(535 bp), 正常对照及非 p.R248C 突变的 TD 病例均能被切成 255 bp 和 280 bp 2 个片段, 而胎 1~胎 3 均切出 255 bp、280 bp 和 535 bp 3 个片段。用特异引物 E7(p.R248C) 扩增, 正常对照和非 p.R248C 突变的 TD 病例均扩增阴性, 无法进一步做酶切鉴定; 而 p.R248C 突变均扩增阳性, 当再用 *Apa* LI 酶切 PCR 产物(365 bp) 时, 胎 1~胎 3 均切出 22 bp 和 343 bp 2 个片段。通过引物扩、测结果显示: 胎 1~胎 3 均是 p.R248C 杂合突变。结论 该法快速特异、准确可靠, 可用于 p.R248C 突变热点的快速检测及含该突变高危胎儿的快速产前诊断。该法还可用于含 p.R248C 突变 TD-I 型家系的 PGD。胎 1~胎 3 都是 TD-I 患胎, 建议尽早终止妊娠。

**[关键词]** 致死性侏儒症 I 型; *FGFR3* 基因; p.R248C 突变; ARMS/RE 法; 快速检测; 产前基因诊断

### Fast detection of thanatophoric dysplasia type I p.R248C mutation hot spots and rapid prenatal diagnosis of three TD type I high-risk fetuses

JIANG Yu<sup>1</sup>, PAN Jingxin<sup>2</sup>, GUO Dongwei<sup>3</sup>, AI Yang<sup>1</sup>, LI Rong<sup>1</sup>, JIANG Weiyang<sup>1</sup>, FANG Qun<sup>4</sup>, GUO Yibin<sup>1\*</sup>

(1. Department of Medical Genetics, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080; 2. Department of Internal Medicine, the Second Affiliated Hospital, Fujian University of Medical Science, Quanzhou, Fujian, China, 362000; 3. Clinical Medicine, Medical College, Xiamen University, Xiamen, Fujian, China, 361102; 4. Fetal Medicine Center, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080)

**[ABSTRACT]** Objective To build up the specific rapid methods of RE and ARMS/RE for mutation hotspot “p.R248C” in the *FGFR3* gene of thanatophoric dysplasia type I (TD-I), then use the method for rapid

基金项目: 闽粤合作科研基金(71010025)

作者单位: 1. 中山大学中山医学院医学遗传室, 广东, 广州 510080

2. 福建医科大学附属第二医院内科, 福建, 泉州 362000

3. 厦门大学医学院临床医学专业, 福建, 厦门 361102

4. 中山大学附属一院胎儿医学中心, 广东, 广州 510080

\*通讯作者: 郭奕斌, E-mail: aguoabin@qq.com

注: 姜煜和潘敬新为并列第一作者

prenatal diagnosis of 3 follow-up high-risk fetuses of TD-I to stop the birth of suffering fetuses, at the same time, lay a good foundation of preimplantation genetic diagnosis (PGD) for the future. **Methods** First, according to the characteristics of the sequence of the mutation hot spot p.R248C before and after mutation, the appropriate enzyme "Afe I" was selected to establish the identification method of enzyme digestion. After that, specific primers of double mismatch bases were devised, combining the method of digestion of *Apa* LI (ARMS/RE) to achieve the double identification. In the end, the sequences obtained by common primers were used to verify the negative and positive results through DNA sequencing. **Results** For the normal control and the patient without p.R248C mutation of TD-I, PCR products (535 bp) of exons (6-7) of *FGFR3* gene, amplified by common primers, could be digested into 2 fragments (255 bp and 280 bp) by *Afe* I. However, for fetuses 1-3, the PCR products could be digested into 3 fragments (255 bp, 280 bp and 535 bp). The normal control and the patient without p.R248C mutation of TD-I were negative using the specific primers E7(p.R248C), which could not be further identified by enzyme digestion. For the fetuses with p.R248C mutation of TD-I, PCR products (365 bp) of exon 7 of *FGFR3* gene, amplified by specific primers, could be digested by *Apa* LI and all the digested products were 22 bp and 343 bp. Sequencing results of common primers' products indicated: fetuses 1-3 were p.R248C heterozygous mutation. **Conclusions** The method is fast, accurate and reliable, which can be available for the fast detection of mutation hot spot p.R248C and the rapid prenatal diagnosis of high-risk fetus with p.R248C mutation. This method can also be applied to PGD of high-risk fetus of TD-I with the mutation "p.R248C". For the 3 high risk fetuses have been diagnosed with TD-I, the clinic suggested termination of pregnancy as soon as possible.

[KEY WORDS] Thanatophoric dysplasia type I; *FGFR3* gene; p.R248C mutation; ARMS/RE; Fast detection; Prenatal gene diagnosis

致死性侏儒症 (thanatophoric dysplasia, TD, MIM187600) 又称致死性骨发育不良, 是一种先天性、致死性的新生儿骨发育不良病, 为常染色体显性 (autosomal dominant, AD) 遗传, 该病主要表现为四肢显著短小, 肋骨极短, 胸廓极度狭窄, 四肢外旋或外展, 呈蛙式体态, 腹部膨胀, 巨颅, 前额隆凸, 脑部畸形等<sup>[1-4]</sup>。新生儿发生率国内报道约为 1/40 000<sup>[3]</sup>, 国外报道为 1/20 000~1/50 000<sup>[5]</sup>。患胎多半胎死腹中或于出生后不足 24 h 即因重症急性呼吸衰竭而夭折。TD 分 TD-I 和 TD-II 2 型, 其中, TD-I 型约占 85%, 主要表现为股骨短而弯曲, 无三叶草状颅骨<sup>[6]</sup>; TD-II 型约占 15%, 长骨短、弯曲及椎骨扁平均较 I 型为轻, 患儿股骨较直, 颅骨为典型三叶草状<sup>[7]</sup>。不同类型或同一类型的不同患者, 其病程进展是不同的<sup>[8-9]</sup>, 但一年存活率几乎为 0<sup>[10]</sup>。

TD 是由成纤维细胞生长因子受体 3 (fibroblast growth factor receptor 3, *FGFR3*) 基因发生病理突变所致, 目前已报道的 *FGFR3* 基因的突变类型有 12 种<sup>[6-7]</sup>。其中 p.R248C 错义突变为 TD-I 最高发的致死突变, 突变率高达 55% 以上<sup>[11]</sup>。因此针对该突变热点, 建立快速特异检测方法具有重要的实用价值。本文对高发突变的 TD 病例进行

了详细的方法学研究, 并应用所建立的快速特异检测法对 3 例疑似 TD-I 型的高危患胎进行了快速产前诊断, 均获得成功。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

近年来, 我室先后接诊疑似 TD-I 的高危胎儿多例, 这些病例、家系分别来自广东、甘肃、黑龙江、河南等地, 由各附属医院转诊而来, 本文重点介绍其中 3 例。其中, 家系 3 曾引产多次。各病例产前超声检查资料如下所述。

【病例 1】孕妇 23 岁, 妊娠 22 周, 2011 年超声检查发现: 胎儿双顶径 55 mm, 头围 195 mm, 胸围 120 mm, 腹围 171 mm, 胸围/腹围=0.7, 股骨长 16 mm, 羊水最大深度 42 mm。胎儿双顶径、头围与孕周相符, 但胸廓狭小, 股骨短而弯曲, 拟诊 TD。

【病例 2】孕妇 24 岁, 妊娠 23<sup>+</sup>3 周, 2014 年 5 月超声测值: 胎儿双顶径 63 mm, 头围 227 mm, 腹围 233 mm, 股骨长径 17 mm, 肱骨长径 16 mm, 羊水最大前后径 62 mm。胎儿超声结构描述: 胎儿四肢可见, 双侧股骨、胫腓骨、肱骨、尺桡骨均缩短。省级医院二维+彩超+三维复查结果: 胎儿发育相当于 22 孕周。胎儿多发异常: (1) 软指标异常: 鼻骨缺

失,枕后皮层增厚。(2)骨骼系统异常:四肢极短小,弯曲(相当于15周);头型异常——苜蓿草状;胸廓狭小;脊柱向右侧侧弯;双手、双足小。拟诊TD。

【病例3】孕妇前后共孕育3次患胎,本次实验样品取自第三胎。第一胎于2011年行超声检查:中孕期胎儿彩超,Ⅲ级产前超声检查:双顶径70 mm(28周),头围245 mm,胸围132 mm,腹围200 mm(24周),股骨长径23 mm(17周),肱骨长径20 mm(16周),足长40 mm,羊水指数211 mm。超声结构描述:头颅增大,前额前凸;胸腔狭窄,胸围缩小,心胸比值增大(>0.6),腹部相对膨隆,胸围/腹围比值缩小(<0.89);胎儿四肢各长骨均可见,但双手呈握拳状,长骨明显缩短、弯曲,所有长骨长度均低于正常值的4倍标准差;羊水偏多。提示致死性骨发育不全改变。第二胎于2013年行超声检查:中孕期胎儿彩超,Ⅲ级产前超声检查:双顶径55 mm,头围200 mm,腹围180 mm,股骨长径40 mm,肱骨长径39 mm,羊水指数150 mm。超声估计平均胎龄:22周4天,胎儿体重(532±135)g。胎儿四肢各长骨均可见,但双手呈握拳状。第三胎于2014年行超声检查:中孕期胎儿彩超,Ⅲ级产前超声检查:双顶径62 mm,头围215 mm,腹围187 mm,股骨长径22 mm,肱骨长径19 mm,羊水指数218 mm。超声结构描述:头颅增大,胸腔狭窄,胸围缩小,双肺隐约可见,肋骨明显缩短,腹部相对膨隆。胎儿四

肢各长骨均可见,但双手呈握拳状,长骨明显缩短、弯曲,所有长骨长度均低于正常值的4倍标准差;羊水位于该孕周第96百分位数。拟诊TD。

本论文研究已得到中山大学伦理委员会的批准,所有受检者均完全知情同意。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 DNA模板的制备

胎儿标本(羊水或脐血)和正常对照标本DNA的提取,按试剂盒说明书的步骤操作或采用本室已建立的方法进行<sup>[12-13]</sup>。

### 1.2.2 普通引物和特异引物的设计及PCR扩增

以NM\_000142作为*FGFR3*基因的参考序列,用Primer Premier 5.0软件自行设计引物。普通引物的名称、序列及扩增条件见表1。特异引物的设计思路:根据扩增受阻突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)<sup>[13]</sup>原理,针对c.742C>T/p.R248C突变后的序列为“……GTGCTCCCCGCACCGGCCCATCC……”,我们人为增加一个错配碱基,把下游引物设计成能被“Apa LI”内切酶识别的特异引物“GTGCACCCCCGCACCGGCCCATCC”,其中“GTGCAC”正好能被Apa LI(G↓TGCAC)酶解。特异引物的名称、序列及扩增条件见表1。引物由北京六合华大基因科技有限公司广州分公司合成,聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)纯化。

表1 *FGFR3*基因 exon 7 的普通引物和特异引物及PCR条件

Table 1 Common primer and specific primer of exon 7 in *FGFR3* gene and PCR condition

名称	序列(5'-3')	退火温度(℃)	循环数	片段大小(bp)
FGFR3 E(6-7)	F:TGCCTCCGCTCACTCACCCG R:CCCAAATCCTCACGCAACCC	64	38	535
FGFR3 E7(p.R248C)	F:CGGCAGGGAGTTCCGCGGCGAG R:GGATGGGCCGGTGCAGGGGTGCA	65	38	365

### 1.2.3 酶切鉴定(restriction endonuclease testing, RE)

#### 1.2.3.1 普通引物PCR产物的Afe I酶切鉴定

取正常对照、非p.R248C突变的TD病例、胎1~胎3共5个样品的普通引物的PCR产物各7 μL,然后在每一管中依次加入Buffer(10×)2 μL、Afe I(10 U/μL)1 μL,补充三蒸水至20 μL,于37℃酶切30~60 min,然后65℃20 min终止反应,

所得酶切产物用1%琼脂糖凝胶电泳。

#### 1.2.3.2 特异引物PCR产物的Apa LI酶切鉴定(ARMS/RE法)

取扩增阳性(胎1~胎3)的PCR产物各7 μL,然后依次加入Buffer(10×)2 μL、Apa LI(10 U/μL)1 μL、补充三蒸水至20 μL,于37℃酶切2~3 h,然后于65℃20 min终止酶切,所得酶切产物用1.8%~2%琼脂糖凝胶电泳。

### 1.2.4 测序鉴定

将普通引物及特异引物的扩增产物交北京六合华大基因科技有限公司广州分公司用 ABI PRISM 3730 型测序仪完成双向测序。

## 2 结果

### 2.1 普通引物的PCR产物的Afe I酶切结果

如图1所示,泳道lane简写成L, L1: 100 bp Marker, L2、L4、L6、L8、L10分别是N(正常标本)、M(非 p.R248C 突变)、胎1(F1)、胎2(F2)、胎3(F3)用普通引物扩增的产物(535 bp), L3、L5、L7、L9、L11 分别是 N、M、F1、F2、F3 用 Afe I 酶切的结果。正常和非 p.R248C 突变序列能被酶解,均切成 255 bp 和 280 bp 2 个片段(L3 和 L5), 而 p.R248C 的突变序列无法被酶解,所以杂合子经 Afe I 酶切后,均产生 255 bp、280 bp 和 535 bp 3 个片段(L7、L9 和 L11)。

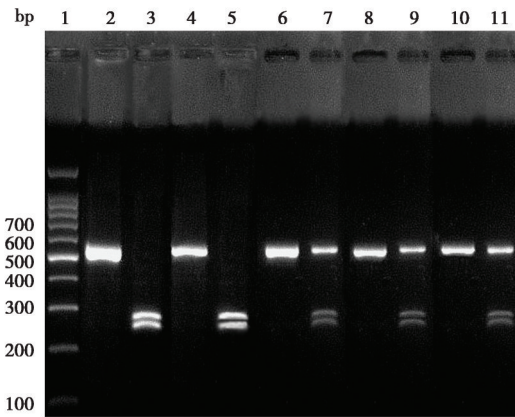


图1 Afe I 酶切鉴定 p.R248C 突变  
Figure 1 Enzyme identification of p.R248C mutation with Afe I

### 2.2 特异引物的PCR产物的Apa LI酶切结果

如图2所示, M: 100 bp Marker; L1: 正常对照(扩增阴性); L2、L4、L6: 胎1、2、3(杂合子, 未切); L3、L5、L7: 胎1、2、3(杂合子, 已切); L8: 非 p.R248C 突变的病例(扩增阴性)。特异引物的扩增产物为 365 bp, 3 例患胎酶切后均产生 22 bp 和 343 bp 2 个片段。

### 2.3 测序结果

#### 2.3.1 普通引物的测序结果

见图3, ①~④依次是: 正常对照、胎1、胎2、胎3的 FGFR3 E(6-7)部分序列比对图。①的正常对

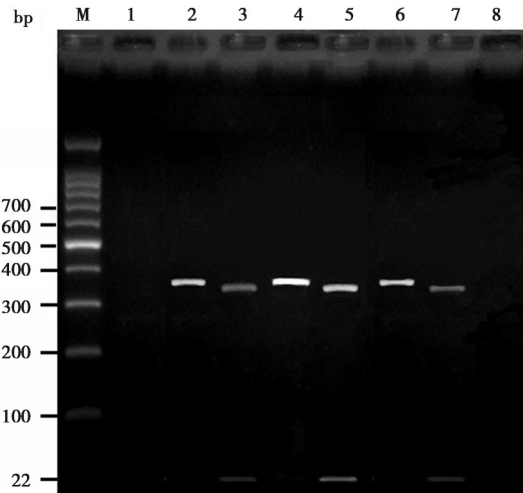
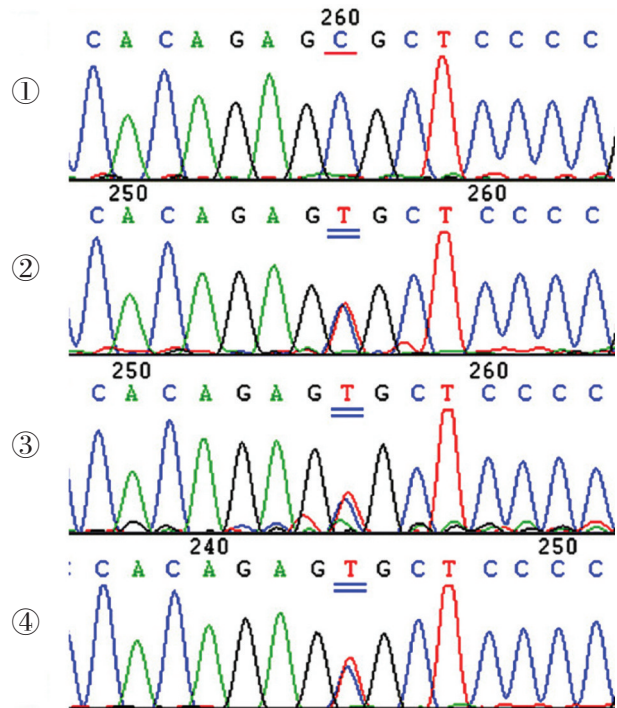


图2 Apa LI 酶切鉴定 p.R248C 突变  
Figure 2 Enzyme identification of p.R248C mutation with Apa LI



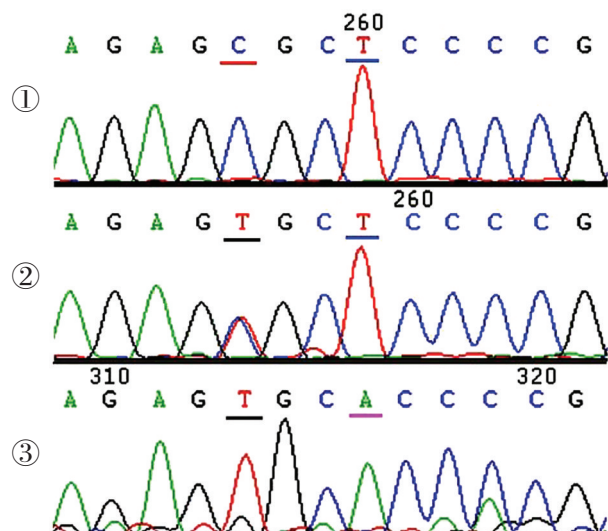
①~④: 分别是正常对照、胎1、胎2、胎3的 FGFR3 E(6-7)的测序结果

图3 普通引物扩增产物的部分正向序列比对图  
Figure 3 The partial forward sequence alignment figure of the products amplified by using common primers

照为纯合序列 C/C, ②~④的胎1~胎3均为杂合序列 C/T。经分析证实, 患胎1~3的 FGFR3 基因均存在 c.742C>T/p.R248C 杂合突变, 为已报道的 TD-I 型的致病性突变。

### 2.3.2 特异引物的测序结果

如图4所示,图4的①~③分别代表:普通引物的正常纯合序列(为C,T)、普通引物的杂合突变序列(为C/T,T)、特异引物的双错配序列(为T,A)。第③排PCR产物的第312~317 bp含有我们设计的Apa LI单切点G↓TGCAC。“T”是突变的碱基,“A”是我们人为错配的。从上述结果来看,经过特异引物扩增后,单错配的突变序列就会转变成含有Apa LI酶切位点的新序列,从而为随后的酶切鉴定奠定了基础。



①~③:分别代表普通引物扩增的正常序列和杂合突变序列以及特异引物扩增的双错配序列;下划线标出的2个碱基分别对应下游特异引物3'端的第1位和第4位的碱基

图4 普通引物和特异引物的扩增产物的测序结果

Figure 4 The sequencing results of the products amplified by using the common primer and specific primer respectively

## 3 讨论

TD-I型是一种先天性、致死性的AD遗传的短肢畸形病,通常胎死腹中或出生后不久即夭折。本病具有较典型的临床、影像学 and 病理学特征。超声检查是目前产前诊断本病的主要方法,但容易把TD与成骨不全II型(osteogenesis imperfecta type II, OI-II)、VIII型(osteogenesis imperfecta type VIII, OI-VIII)、软骨不发育I型和II型(achondrogenesis type I and type II, ACG-I和ACG-II)、窒息性胸廓发育不良(asphyxiating thoracic dysplasia, ATD)等相混淆,故需产前基因检测方能确诊。TD-I型危害严重,至今尚无有效的

治疗措施,快速检出突变、阐明病因进而对高危胎儿实施产前基因诊断是目前确诊及防治该病的最佳应对策略,也是开展早期产前诊断和胚胎植入前诊断的必要前提条件。

虽然本病多为散发病例,但近年来我室发现不少有遗传背景的家系,如家系3父母曾连续数胎孕育致死性侏儒症患胎,推测与父或母的生殖腺存在杂合突变嵌合体有关。对于有遗传背景的家系来说,自然受孕生出TD-I患胎的风险非常大,因此,最好采用胚胎植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)方法辅助生育。而进行PGD对检测时间有严格要求,需在24 h内完成遗传病的诊断,否则会影响植入和胚胎的存活,虽然目前已有新技术可采取囊胚期取卵裂球进行检测,延长了胚胎体外检测的时间,然而对于那些要求或需要在卵裂期植入胚胎的诊断来说则仍需严格控制时间,RE鉴定以及ARMS/RE双重特异鉴定全程只需3~4 h即可作出确诊,大大节省了检测时间,故特别适用于PGD。此外,由于TD-I是致死性的侏儒症,通常都要引产,故若能越早确诊,就越能减轻引产对孕妇的身心伤害。

建立RE法,是根据R248C突变前后序列的改变导致了酶切点的改变而设计的。对于E(6-7)普通引物来说,扩增产物为535 bp,突变前的正常序列是“CACAGAGCGCTCCCCG”(含有一个Afe I“AGCGCT”酶切位点,能被Afe I切开),而发生c.742C>T突变后,序列变为“AGTGCT”,该Afe I酶切位点消失,故正常序列可被切出255 bp和280 bp 2个片段,而纯合突变无法被酶解,仍是535 bp;杂合子可切出255 bp、280 bp、535 bp 3个片段。因此实验结果中杂合患胎会显示3个片段。因此,用此酶即可鉴定有无p.R248C突变以及突变是杂合突变还是纯合突变。此处正常样品是作为阳性对照,而纯合突变作为阴性对照。

建立ARMS法,是因为它特异、快速、廉价,一次PCR即可鉴定。特异引物的扩增产物为365 bp,该引物对于突变序列来说,仅有1个碱基(即T>A)是错配的,而对于正常序列来说,则有2个碱基的错配(即C>T和T>A)。因此在控制好扩增条件时,就能让单错配的突变序列扩增阳性,而双错配的正常序列扩增阴性。阳性产物由于含有能被Apa LI识别的酶切位点(G↓TGCAC),因此扩增后可进一步用Apa LI作酶切鉴定,以提高其准确

性和可靠性。又由于杂合子突变其中一条是正常序列,无扩增产物,故杂合突变和纯合突变一样,酶切后均是产生 22 bp 和 343 bp 2 个片段。若要鉴定杂合突变和纯合突变,则可用普通引物鉴定,结果如上所述。

对于酶切鉴定,现有快切酶,5~10 min 即可完成鉴定,故只要试剂质量保证,用上述二法均可在半天内完成高危胎儿的快速产前诊断,尤其对于没有测序仪的基层单位特别适用,因此本法具有推广应用价值。

本文关于 RE 及 ARMS/RE 法成功建立和产前诊断的成功实施为今后继续开展本病以及其他相关遗传性骨病的快速产前基因诊断积累了宝贵的经验,奠定了良好的基础。

#### 参考文献

- [1] Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision [J]. *Am J Med Genet A*, 2011, 155A (5): 943-968.
- [2] Lemyre E, Azouz EM, Teebi AS, et al. Bone dysplasia series. Achondroplasia, hypochondroplasia and thanatophoric dysplasia: review and update [J]. *Can Assoc Radiol J*, 1999, 50(3):185-197.
- [3] 刘权章. 临床遗传学彩色图谱[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006:319-320.
- [4] Itoh K, Pooh R, Kanemura Y, et al. Brain malformation with loss of normal FGFR3 expression in thanatophoric dysplasia type I [J]. *Neuropathology*, 2013, 33 (6):663-666.
- [5] Del Piccolo N, Placone J, Hristova K. Effect of thanatophoric dysplasia type I mutations on FGFR3 dimerization [J]. *Biophys J*, 2015, 108(2):272-278.
- [6] Sahinoglu Z, Uludogan M, Gurbuz A. Prenatal diagnosis of thanatophoric dysplasia in the second trimester: ultrasonography and other diagnostic modalities [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2003, 269(1):57-61.
- [7] Tavormina PL, Shiang R, Thompson LM, et al. Thanatophoric dysplasia (type I and II) caused by distinct mutations in FGFR3 [J]. *Nat Genet*, 1995, 9(3): 321-328.
- [8] Chih-Ping Chen, Schu-Rern Chern, Jin-Chung Shih. Prenatal diagnosis and genetic analysis of type I and type II thanatophoric dysplasia [J]. *Prenat Diagn*, 2001, 21: 89-95.
- [9] de Souza Cambraia VD, Rezende MA, Roquette Gomes KM. Severe acute respiratory failure caused by thanatophoric dysplasia. The report of two cases with different clinical developments [J]. *Pediatric Pulmonology*, 2016, 51(SI):S60-S61, Suppl: 42.
- [10] Monti E, Mottes M, Frascini P, et al. Current and emerging treatments for the management of osteogenesis imperfecta [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2010, 6: 367-381.
- [11] Passos-Buena MR, Wilcox WR, Jabs EW, et al. Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations [J]. *Human Mutat*, 1999, 14(2):115-125.
- [12] 郭奕斌, 潘宏达, 孟亚仙, 等. 突变特异性扩增系统和变性高效液相色谱分析法结合 DNA 测序法快速产前诊断黏多糖贮积症 II 型高危胎儿 [J]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2010, 4(5):552-556.
- [13] 郭奕斌, 潘宏达, 郭春苗, 等. 双错配碱基 ARMS 结合 RE 法快速检测 FGFR3 基因的突变超热点 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2010, 2 (1):5-8.