



周產期會訊

第一一五期
2005年9月

發行人:徐振傑 電話:(02)2381-6198 郵政劃撥帳號:12420668
秘書長:李建南 手機:0911-366551 戶名:中華民國周產期醫學會
會訊主編:施景中 傳真:(02)2381-4234 會址:台北市常德街一號景福館2樓203室
http: www.tsop.org.tw
E-mail: tsop@mail.hato.com.tw



利用DHPLC與Multiplex PCR快速診斷裘馨氏肌肉失養症帶因者

臺大醫院 林芯仔 蘇怡寧 李建南

前言

裘馨氏肌肉失養症(DMD)是常見的致命性基因遺傳疾病之一，發生率約為三千五百分之一個新生男嬰，它是一種性聯隱性遺傳的疾病，三分之二的病患是遺傳自病患的母親，其他的三分之一則來自於沒有家族史的新發生突變。它的表現常常是在年紀很小的時候就出現近端肌肉無力以及假性肌肉肥大，最後病患都會需要乘坐輪椅，往往在二十幾歲就過世。

裘馨氏肌肉失養症的基因突變發生於dystrophin gene，這個基因位於X染色體短臂上21.1的位置，基因的大小為兩百四十萬個鹼基，其上共有79個exons，是目前為止所知最大的人類基因其中之一。六成的病患是因為大段的基因缺失，6%的病患是因為大段的基因複製，其他的還有點突變、小段基因缺失或插入。

病患的診斷可以藉由PCR偵測得知，但帶因者的診斷則不容易，在過去，是利用血液裡頭肌酐酸(Creatine Kinase, CK)的值上升來診斷不會有症狀的帶因者，但有三分之一的女性帶因者的CK值卻是落在正常範圍內，因此這個方法並不理想。傳統的基因診斷方法有定量型南方點墨法、FISH、linkage analysis、微晶片電泳法、毛細管電泳法等等，但這些方法錯誤率高，又往往昂貴或耗時。我們發現DHPLC(Denaturing High Performance Liquid

Chromatography)和Multiplex PCR應用於帶因者的診斷，可以快速、準確、自動化、省時且便宜地診斷出裘馨氏肌肉失養症的病患及帶因者。

方法

先將dystrophin gene上的19個exon (此為常發生病變的hot spots)進行multiplex PCR，再將這19段DNA片段依據它們的大小及特性分成四組，以這四組PCR產物進行電泳以及DHPLC分析。

在DHPLC的分析結果中，我們可以比較未知個案與正常人的特定exon與reference exon之比值，計算出copy number，如此一來可以明確地判斷出該個案是否為裘馨氏肌肉失養症的帶因者。

Copy number

$$\frac{\text{Peak height (area) of test exon (U) / Peak height (area) of reference exon (U)}}{\text{Peak height (area) of test exon (C) / Peak height (area) of reference exon (C)}} \times 2$$

U: unknown sample C: control sample

結果

比較電泳法與DHPLC的結果(如圖一)發現，裘馨氏肌肉失養症的病患無論在電泳法

或DHPLC中，都明顯地缺乏了某個片段或是某段波形。

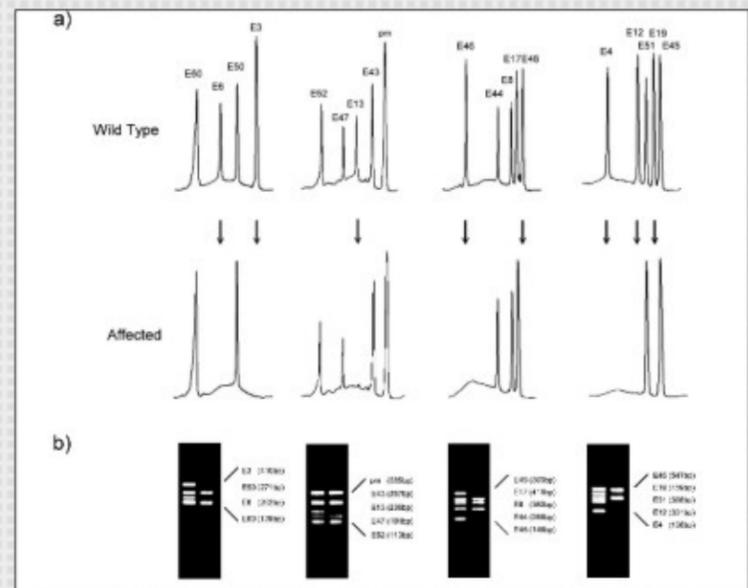
然而，在DHPLC的方法裡，我們可以進一步偵測到某個exon量的減少(如圖二)，再根據計算出的copy number，便可輕而易舉地判斷出帶因者(如圖三)。正常女性的copy number應為2，而帶因者的copy number都在1.5以下，在我們的實驗裡並沒有出現overlapping的情況，也就是說，這個方法的準確性是非常高的。

結論

裘馨氏肌肉失養症(DMD)是致命性的基因遺傳疾病，遺傳諮詢對個案的整個家族而言是非常重要的，而帶因者與否的判斷更是關鍵，能夠快速且正確地分辨出病患及帶因者並了解該個案的遺傳模式，對於臨床醫師與病患都是莫大的幫助。我們的方法不但不需要用到螢光染劑或放射線標記物質，也不需要花很多時間進行電泳，同時也不需要再對PCR的產物進行純化的工作，我們約只需要三個小時進行PCR，48分鐘進行自動化DHPLC分析，便可以得到我們想知道的結果，總共的花費也不超過新台幣二百元，最重要的是，這個方法可以讓我們正確地診斷出裘馨氏肌肉失養症的病患以及帶因者。此外，這個方法也可

以應用在其他因為基因缺失而造成的遺傳疾病。拜科學進步之賜，讓我們對基因遺傳疾病更認識並且更能掌握下一代發病的可能性。

圖一



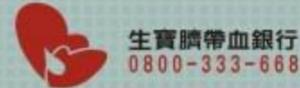
圖一 裘馨氏肌肉失養症患的DHPLC分析與膠片電泳的結果圖。a)上排是正常人的19個exons在DHPLC分析儀的結果，下排是一位病患的結果，從圖中可以清楚地看出該病患具有八個點位的基因缺失。b)是同一位病患的膠片電泳結果，同樣可以看到有八段的基因缺失。



業績第一

臍帶血市佔率超過50%

贊助單位：



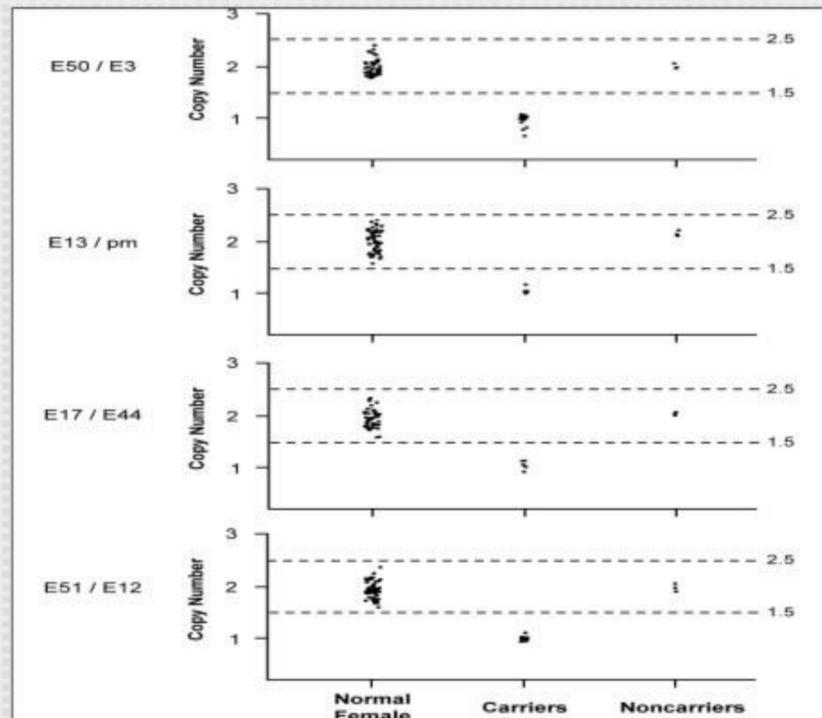
各位會員先生、女士您好

2005年周產期學術研討會暨第九屆第二次會員大會將於12月11日(星期日)假亞太會館二樓201室盛大舉行並有美食午宴款待，當天舉辦「早產新知與Atosiban安胎新藥研討會」，會後將發予研討會參加證書，歡迎所有本會會員和醫護人員踴躍參加。今年將邀請三位國外學者與國內專家蒞會介紹早產新知和明年即將上市Atosiban(oxytocin接受器拮抗劑)安胎新藥。

題 目	演 講 者
Current trend in prediction and prevention of preterm labour	Dr. Ingemar Ingemarsson Professor in Obstetrics at the University of Lund and Consultant at the Department of Obstetrics and Gynaecology Lund University Hospital.
The evolution of tocolytic therapy : from history to evidence based medicine	Dr. Ronald F Lamont Visiting reader on Obstetrics and Gynaecology, Imperial College School of science, Technology and Medicine, London.
The role and clinical practice of atosiban in obstetric complications	Dr. Peter Husslein Allgemeines Krankenhaus Wien Universitätsklinik für Frauenheilkunde Austria

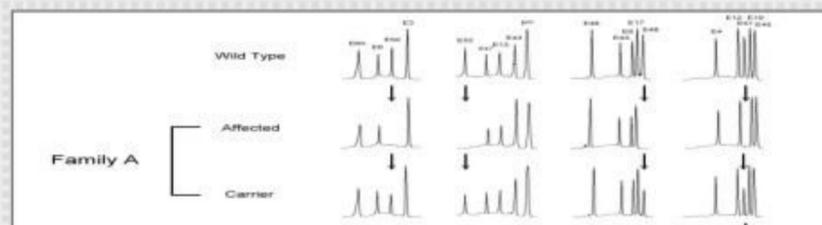
* 周產期專科醫師教育積分35分，婦產科醫學會(A,B類)積分申請中*

圖二



圖二 Copy number在正常女性、帶因者以及非帶因者的分布結果圖。根據計算出的copy number發現，正常女性和非帶因者的copy number都在1.5以上，而帶因者則小於1.5。

圖三



圖三 DHPLC在正常人、病患以及病患母親的結果圖。最上排為正常人19個exon的波形;中排為病患的結果，共可見到四個exons的缺失;下排為該病患的母親的波形，和正常人相比，她在這四個exon的波形都相對地較小，再根據copy number可以確定她為帶因者。

最新訊息

時 間：2005年10月28日(星期五)上午7:30-8:30

地 點：台北馬偕醫院-福音樓9樓-第三講堂

主 持 人：陳持平/徐振傑 醫師

主 講 人：林口長庚醫院-Dr.蕭勝文/鄭博仁

題 目：同卵雙胞胎中其一為第21號染色体單體症:懷孕初期胎兒後頸部透明帶量測之產前偵測(Monozygotic twins discordant with full monosomy 21, prenatal detection by first trimester nuchal translucency measurement)

積 分：周產期專科醫師教育積分3分，婦產科醫學會B類1分