

# 应用多重连接依赖性探针扩增技术进行 脊髓性肌萎缩症产前诊断

陈雅芳 何瑾 张奇杰 林翔 王柠 陈万金

**【摘要】 目的** 探讨多重连接依赖性探针扩增技术在脊髓性肌萎缩症产前诊断中的临床应用价值。**方法** 以脊髓性肌萎缩症 6 个家系作为研究对象,包括患者 7 例、父母 12 名、胎儿 6 例。采用多重连接依赖性探针扩增技术对运动神经元生存(SMN)基因及脊髓性肌萎缩症修饰基因进行分析,应用聚合酶链反应-限制性酶切片段长度多态性技术检测 SMN1 基因缺失,羊水标本分别通过直接离心沉淀和细胞培养进行 DNA 分析。**结果** 多重连接依赖性探针扩增分析提示 6 个家系中 7 例患者及 1 例胎儿(家系 IV)呈 SMN1 基因纯合缺失,与聚合酶链反应-限制性酶切片段长度多态性分析结果一致;11 名父母及 5 例胎儿的 SMN1 拷贝数为 1,1 名母亲(家系 V)SMN1 拷贝数为 2,均为脊髓性肌萎缩症携带者。多重连接依赖性探针扩增分析显示,6 个家系中 10 名成员 SMN2 拷贝数为 1,15 名成员 SMN2 拷贝数为 2;多重连接依赖性探针扩增分析,6 个家系中 3 名成员神经元凋亡抑制蛋白(NAIP)基因缺失,其余家系成员正常。**结论** 多重连接依赖性探针扩增技术为一快速而可靠的基因检测及定量分析方法,可准确检测 SMN 基因及脊髓性肌萎缩症修饰基因的缺失突变并分析基因拷贝数,适用于脊髓性肌萎缩症患者、携带者的基因诊断及产前诊断。

**【关键词】** 肌萎缩, 脊髓性; 基因缺失; 基因扩增; 产前诊断

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2012.03.012

## Studies on the prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy by multiplex ligation-dependent probe amplification

CHEN Ya-fang, HE Jin, ZHANG Qi-jie, LIN Xiang, WANG Ning, CHEN Wan-jin

Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian, China

Corresponding author: CHEN Wan-jin (Email: wanjinchen75@yahoo.com.cn)

**【Abstract】 Objective** To investigate the value of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method in the prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy (SMA). **Methods** Six SMA pedigrees, which included 7 patients, 12 parents and 6 fetuses, were admitted in our hospital. MLPA was used to detect the survival motor neuron (SMN) and other modifier genes, according to steps of hybridization, ligation, PCR reaction, fragment separation by capillary electrophoresis and peak pattern evaluation. Synchronously, the deletion of SMN1 gene was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The DNA samples of fetuses were collected by centrifuging the amniotic fluid as well as derived from amniotic cell culture. **Results** According to MLPA, 7 patients and 1 fetus were detected to carry homozygous deletion of survival motor neuron 1 (SMN1) gene, which was also detected by PCR-PFLP. In addition, 11 parents and 5 fetuses carried one copy of SMN1 gene, while 1 parent who was also a carrier of SMA carried two copies of SMN1 gene. Furthermore, after being analyzed by MLPA, 10 cases carried one copy of SMN2 gene, while 15 cases had two copies of SMN2 gene. After detecting the neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) gene, 3 cases had the deletion of NAIP gene while others showed normal. **Conclusion** MLPA can detect the deletion and quantify the copy numbers of SMN and other modifier genes, improving the efficiency and stability of genetic diagnosis. It is adequate for detecting patients and carriers of SMA, as well as providing reliable evidence for genetic counseling.

**【Key words】** Muscular atrophy, spinal; Gene deletion; Gene amplification; Prenatal diagnosis

**Fund Project:** National Natural Science Foundation of China (No. 30900481); Fujian Medical Innovating Program (No. 2009-CXB-25)

脊髓性肌萎缩症(SMA)是一类临床较为常见的神经系统遗传性疾病,以进行性、对称性近端肢体、躯干无力和肌萎缩为特征,主要病理变化表现为脊髓前角运动神经元退行性变。儿童期发病的脊髓性肌萎缩症患者呈常染色体隐性遗传,群体发病率约为 1/1 万<sup>[1]</sup>,携带者频率为 1/40~1/60<sup>[2]</sup>。其候选基因定位于染色体 5q11.2-q13.3<sup>[3-4]</sup>,包括运动神经元生存(SMN)基因、神经元凋亡抑制蛋白(NAIP)基因、基本转录因子 II H 亚单位 2 号多肽(GTF2H2)基因及 H4F5 基因。其中 SMN 基因为致病基因,存在 SMN1 和 SMN2 两个高度同源拷贝,各包含 9 个外显子(1、2a、2b、3~8)。NAIP 基因为脊髓性肌萎缩症的修饰基因,编码神经元凋亡抑制蛋白,该基因第 5、6 号外显子缺失可能与脊髓性肌萎缩症的临床表现有关<sup>[4]</sup>。目前对脊髓性肌萎缩症尚无有效的治疗方法,发病后患者生活质量明显下降,给社会和家庭带来沉重负担,因此进行产前诊断对于预防脊髓性肌萎缩症尤其重要。多重连接依赖性探针扩增(MLPA)技术是 2002 年由荷兰学者 Schouten 等<sup>[5]</sup>发明的一项基因半定量分析技术,可对致病及修饰基因进行缺失及定量分析。在本研究中,我们采用该项技术对脊髓性肌萎缩症 6 个家系中的所有成员进行 SMN 基因及修饰基因检测,并收集孕妇羊水标本进行产前诊断。

## 对象与方法

### 一、研究对象

收集 2007~2010 年于福建医科大学附属第一医院门诊就诊的 6 个脊髓性肌萎缩症家系,包括 7 例患者、12 名父母、6 例胎儿的临床资料及 DNA 样本。其中,家系 II 有 2 例患者,其余家系均已各生育 1 例患者。7 例患者中,男女比例为 3:4;受试年龄为 37 天至 10 岁,平均(4.06±3.18)岁。所有受试者均符合 1992 年脊髓性肌萎缩症国际协作会议制定的临床诊断及分型标准<sup>[6]</sup>,入组时对研究内容知情并签署知情同意书。具体诊断标准如下:(1)对称性肢体无力。(2)肢体近端症状重于远端。(3)呈进行性病程。(4)舌肌或肢体颤动。(5)肌电图呈神经源性改变。(6)肌肉活检符合神经源性改变。另选择 20 名健康对照者作为正常对照,男女比例为 1:1;受试年龄为 30~47 岁,平均(38.45±4.57)岁。

### 二、研究方法

1. 标本收集 空腹采集 7 例患者、12 名父母及

20 名正常对照受试者外周静脉血各 2 ml,6 例行产前诊断者于妊娠中期(16~20 周)经超声引导羊膜穿刺<sup>[7]</sup>抽取羊水 20 ml,其中 10 ml 直接离心、收集沉淀组织,另外 10 ml 行羊水细胞培养。

2. 羊水细胞培养 为了防止羊膜穿刺抽取羊水过程中母血污染,故行羊水细胞培养。采集羊水标本 10 ml,以转速 1000 r/min,离心半径为 14.50 cm 的离心机离心 10 min,弃上清液、加入羊水/绒毛培养基(杭州宝荣科技有限公司)5 ml,置 37℃、体积分数为 5%二氧化碳培养箱中培养,约 1 周后贴壁细胞消化,采集培养细胞并提取 DNA。

3. DNA 制备 采用 QIAamp<sup>®</sup>DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司),分别提取脊髓性肌萎缩症患者及其父母外周静脉血、羊水离心沉淀组织及羊水细胞培养基因组 DNA,操作方法严格按照试剂盒说明书进行。

4. 聚合酶链反应-限制性酶切片长度多态性检测 采用聚合酶链反应-限制性酶切片长度多态性(PCR-RFLP)技术对所有样品进行 SMN 基因第 7、8 号外显子缺失分析,分别参照文献所述方法,扩增 SMN 基因第 7、8 号外显子引物<sup>[8]</sup>。(1)PCR 反应体系:共 25 μl 体系,包括基因组 DNA 100 ng、相应引物 25 pmol、dNTPs 20 nmol、TaqDNA 聚合酶 1.25 U,以及相应的 10× 缓冲液 2.50 μl,其余以 ddH<sub>2</sub>O 补充。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 3 min;94℃ 30 s、56℃ 45 s、72℃ 60 s,共 30 个循环;再以 72℃ 延伸 5 min。(2)限制性酶切:取第 7 号外显子的 PCR 扩增产物 15 μl,加入限制性内切酶 Dra I(美国 Promega 公司)8 U 及相应缓冲液,ddH<sub>2</sub>O 补充至 30 μl;取第 8 号外显子 PCR 扩增产物 15 μl、Dde I(美国 Promega 公司)8 U 及相应缓冲液,ddH<sub>2</sub>O 补充至 30 μl。37℃ 孵育 3 h。(3)电泳分析:PCR 扩增产物和酶切产物经质量浓度为 2.5%的琼脂糖凝胶于 1×TBE、4 V/cm 电压下电泳 1 h,并拍照、分析。

5. 多重连接依赖性探针扩增分析 (1)多重连接依赖性探针扩增及检测:MLPA P021 试剂盒(荷兰 MRC-Holland 公司)共包含 37 对探针,可以特异性检测 SMN1 与 SMN2 基因第 7、8 号外显子,SMN 基因第 1、4、6 号外显子,以及 SMN 基因邻近基因如 NAIP、BTF2p44 和 H4F5 基因;此外,还包括 21 对内对照物探针<sup>[9]</sup>,操作方法参照文献<sup>[10]</sup>进行。①杂交,取 5 μl(终浓度为 30 ng/μl)DNA 加入 EP 管,98℃ 变性 5 min,冷却至 25℃ 后滴加 1.50 μl 多重探

针及 1.50  $\mu$ l Buffer, 95  $^{\circ}$ C 变性 1 min 后 60  $^{\circ}$ C 杂交 16~18 h。②连接, 54  $^{\circ}$ C、滴加 32  $\mu$ l 连接混合液, 孵育 15 min, 98  $^{\circ}$ C 灭活连接酶 5 min。③扩增, 取连接后的产物 10  $\mu$ l, 加入 4  $\mu$ l PCR Buffer 及 26  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 72  $^{\circ}$ C 条件下加入 10  $\mu$ l 扩增反应液, 迅速启动 PCR 反应。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 20 min。④分离, 取 1  $\mu$ l 扩增产物加入 8.70  $\mu$ l Hi-Di 甲酰胺(美国 ABI 公司)及 0.30  $\mu$ l LIZ-500 Marker(美国 ABI 公司)95  $^{\circ}$ C 变性 5 min, 采用 Genetic Analyzer-3130 基因分析仪(美国 ABI 公司)进行毛细管电泳分离。(2)MLPA 数据分析: 采用 Genemapper 3.0 软件分析毛细管电泳分离结果, 并导出图型及数据。将各目的片段峰面积除以全部内参照峰面积之和, 即为该目的片段的相对峰面积(RPA), 再将 SMA 组 RPA 与正常对照组平均 RPA(即 20 个正常对照 RPA 的平均值)相比, 即为拷贝数比值, 进而可计算出该目的片段的拷贝数。根据荷兰 MRC-Holland 公司官方网站(<http://www.mlpa.com>)提供的拷贝数分析<sup>[11]</sup>, 拷贝数比值范围在 0.30~0.80 为 1 拷贝, 0.80~1.24 为 2 拷贝, 1.24~1.60 为 3 拷贝。若某一片段无峰信号即代表该片段缺失。当拷贝数比值临近波动范围边界时, 进行重复验证以确保结果准确。

### 结 果

#### 一、聚合酶链反应-限制性酶切片长度多态性检测

正常对照受试者 DNA 标本 *SMN* 基因第 7 号外显子的 PCR 扩增产物经 *Dra* I 消化、琼脂糖凝胶电泳后共出现 2 个电泳条带, 分别为 188 bp 和 164 bp; 6 个家系中有 7 例患者和 1 例胎儿(家系 IV)仅出现 1 个 164 bp 的电泳条带, 均缺失代表 *SMN1* 基因的电泳条带。正常对照受试者血液标本 *SMN* 基因第 8 号外显子 PCR 扩增产物经 *Dde* I 消化、琼脂糖凝胶电泳后共出现 3 个电泳条带, 分别为 188 bp、120 bp 和 68 bp; 6 个家系中有 7 例患者和 1 例胎儿(家系 IV)仅可见 2 个电泳条带, 分别为 120 bp 和 68 bp, 缺失代表 *SMN1* 基因的片段(图 1)。

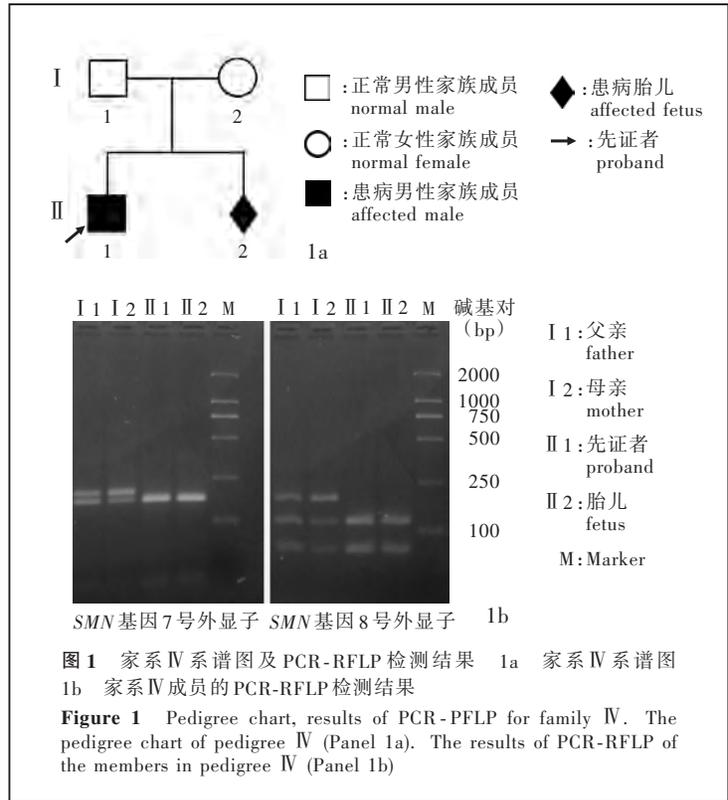


图 1 家系 IV 系谱图及 PCR-RFLP 检测结果 1a 家系 IV 系谱图 1b 家系 IV 成员的 PCR-RFLP 检测结果  
Figure 1 Pedigree chart, results of PCR-PFLP for family IV. The pedigree chart of pedigree IV (Panel 1a). The results of PCR-RFLP of the members in pedigree IV (Panel 1b)

#### 二、多重连接依赖性探针扩增分析

1. *SMN1* 基因拷贝数分析 6 个家系中共 7 例患者和 1 例胎儿(家系 IV)的 *SMN1* 基因拷贝数为 0(图 2), 5 例胎儿 *SMN1* 基因拷贝数为 1; 1 例母亲(家系 V) *SMN1* 基因拷贝数为 2, 其余家系父母亲 *SMN1* 基因拷贝数均为 1(表 1)。

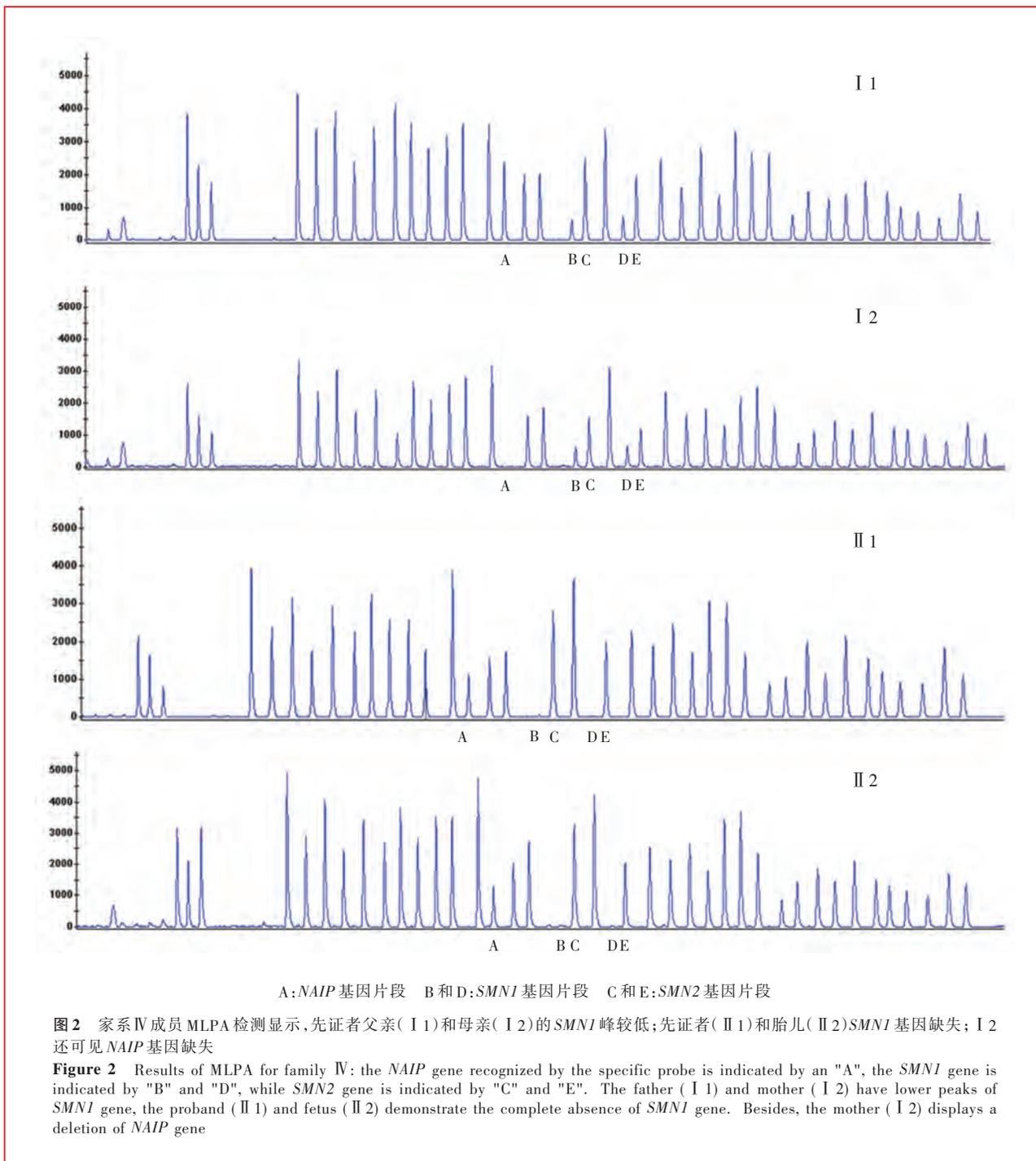
2. *SMN2* 基因拷贝数分析 6 个家系共 25 例受试者, 其中 10 例 *SMN2* 基因拷贝数为 1, 约占 40.00%(10/25), 其余 15 例受试者 *SMN2* 基因拷贝数为 2, 约占 60.00%(15/25, 表 1)。

3. *NAIP* 基因拷贝数分析 本组中 1 例胎儿(家系 II)、1 例母亲(家系 IV)、1 例先证者(家系 V) *NAIP* 基因缺失, 缺失率约为 12.00%(3/25, 表 1)。

4. *GTF2H2* 基因和 *H4F5* 基因拷贝数分析 本组 6 个家系中的所有成员均未发现 *BTF2p44* 和 *H4F5* 基因缺失。

#### 三、妊娠干预及随访

MLPA 检测技术对 *SMN1* 基因缺失的分析结果与 PCR-RFLP 相一致, 提示 6 个家系中有 7 例患者和 1 例胎儿(家系 IV) *SMN1* 基因呈纯合缺失, 其结果表明家系 IV 中的胎儿亦为脊髓性肌萎缩症患者, 家属选择终止妊娠。其余 5 例胎儿 *SMN1* 基因拷贝数均为 1, 为脊髓性肌萎缩症携带者, 由于携带者无任何



临床症状,其家属选择继续妊娠并分娩。引产的胎儿及出生后的婴儿均再次进行基因分析,其结果与产前诊断完全一致。其余5例出生后每年进行一次随访,至今未出现临床症状。

### 讨 论

脊髓性肌萎缩症为严重致残性神经系统遗传性疾病,目前临床上尚无肯定而有效的治疗方法,

因此产前诊断成为一种有效的预防干预手段。本研究利用MLPA方法共分析6个脊髓性肌萎缩症家系成员SMN基因与修饰基因,其中7例患者与1例胎儿为SMN1基因纯合缺失,其余5例胎儿为无SMN1基因纯合缺失,此与PCR-RFLP分析结果相一致。表明MLPA技术能够准确地检测SMN1基因缺失情况,而且通过毛细管电泳检测后获得的峰型图可直观判断SMN1基因缺失情况。其中诊断为

**表 1** 脊髓性肌萎缩症 6 个家系成员 PCR-RFLP 和 MLPA 分析结果  
**Table 1.** Results of genetic analysis by PCR-RFLP and MLPA in SMA pedigrees

家系	成员	PCR-RFLP 分析		MLPA 检测 SMN 基因区域拷贝数分析			结果判断
		Dra I	Dde I	SMN1	SMN2	NAIP	
I	患者	+	+	0	2	1	患者
	父亲	-	-	1	1	1	携带者
	母亲	-	-	1	2	1	携带者
	胎儿	-	-	1	1	1	携带者
II	患者 1	+	+	0	2	1	患者
	患者 2	+	+	0	2	1	患者
	父亲	-	-	1	1	1	携带者
	母亲	-	-	1	2	1	携带者
	胎儿	-	-	1	2	0	携带者
III	患者	+	+	0	2	1	患者
	父亲	-	-	1	2	1	携带者
	母亲	-	-	1	2	1	携带者
	胎儿	-	-	1	1	1	携带者
IV	患者	+	+	0	2	1	患者
	父亲	-	-	1	2	1	携带者
	母亲	-	-	1	1	0	携带者
	胎儿	+	+	0	2	1	患者
V	患者	+	+	0	2	0	患者
	父亲	-	-	1	1	1	携带者
	母亲	-	-	2	1	2	携带者
	胎儿	-	-	1	2	1	携带者
VI	患者	+	+	0	2	1	患者
	父亲	-	-	1	1	2	携带者
	母亲	-	-	1	1	1	携带者
	胎儿	-	-	1	1	1	携带者

注：“+”，SMN1 缺失阳性；“-”，SMN1 缺失阴性

SMN1 纯合缺失的 1 例胎儿已行引产,其余 5 例均继续妊娠并分娩,引产的胎儿及出生后的婴儿均再次进行基因分析,结果与产前诊断完全一致。由此可见,MLPA 技术用于产前诊断可为脊髓性肌萎缩症家系提供准确而可靠的遗传咨询和优生优育指导。产前诊断的缺点在于,有创羊膜腔穿刺技术有导致人为流产的可能,同时,一旦需要通过引产或人工流产来终止妊娠,对孕妇造成的身心创伤较大,近年来植入前遗传学诊断日益受到青睐<sup>[12]</sup>。

在本研究中,我们还利用 MLPA 定量检测方法对 6 个家系中的所有成员进行 SMN1 基因拷贝数分析。对 6 例胎儿 SMN1 基因分析显示,其中 1 例胎儿为 SMN1 基因纯合缺失,诊断为脊髓性肌萎缩症患者,其余 5 例胎儿 SMN1 基因拷贝数为 1,诊断为脊髓性肌萎缩症携带者。传统的 PCR-RFLP 技术仅能

检测 SMN1 基因缺失,并不能分析 SMN 基因拷贝数;而 MLPA 技术不仅能够准确地检测 SMN1 基因缺失情况,还能同时检测受试者是否为携带者。本研究结果显示,5 例胎儿为脊髓性肌萎缩症携带者,提示其将来的后代患病风险明显高于普通人群,有必要对其进行长期随访并为其成年后的婚育提供遗传学指导。与此同时,我们还对 6 个家系中的父母进行了 SMN1 基因定量分析,发现家系 V 父代 SMN1 基因拷贝数为 1,母代 SMN1 基因拷贝数为 2,根据先证者 MLPA 分析显示为 SMN1 基因纯合缺失,推测其母亦为携带者,即 1 条染色体含 2 个拷贝 SMN1 基因,另 1 条缺失 SMN1 基因。文献报道,约 4% 人群为 1 条染色体上有 2 个拷贝的 SMN1 基因<sup>[13]</sup>,表明基因型为“2+0”型的脊髓性肌萎缩症携带者确实存在。

对不同家系所有成员 SMN2 基因和 NAIP 基因拷贝数进行分析表明,SMN2 基因拷贝数与疾病严重程度相关<sup>[14]</sup>,而临床表型较为严重的脊髓性肌萎缩症 I 型患者生存年龄通常不超过 2 岁<sup>[15]</sup>。本研究中 7 例先证者 SMN2 基因拷贝数均为 2,经

过随访目前年龄均超过 2 岁,提示均为 II 型患者。有文献报道,SMN1 基因缺失可能向 SMN2 基因转化,此时 SMN2 基因拷贝数相应增加,由于在 SMN1 基因缺失的情况下 SMN2 可表达部分全长蛋白以代偿 SMN1 基因的功能,因此临床症状相对较轻<sup>[16]</sup>。在目前报道的约 50% I 型患者、18% II 型和 III 型患者中存在 NAIP 基因的纯合缺失,其并非产生脊髓性肌萎缩症的必要条件,但它们与疾病严重程度和临床分型密切相关<sup>[17]</sup>。本研究结果表明,脊髓性肌萎缩症患者及携带者均存在 NAIP 基因缺失的情况,提示 NAIP 基因缺失并非引起脊髓性肌萎缩症的致病基因。由于本研究纳入的病例数较少,故尚不足以分析 SMN2 基因拷贝数和 NAIP 基因缺失情况与临床表型之间的关系。

近年来,PCR-RFLP、实时荧光定量 PCR(real-

time PCR)、变性高效液相色谱法(DHPLC)等多项检测技术先后被用于脊髓性肌萎缩症患者及携带者的基因检测,但均有其不足之处:PCR-RFLP无法对SMN及其修饰基因进行定量分析,无法判断杂合缺失或携带状态;实时荧光定量PCR对DNA模板的浓度及纯度要求较高,实验结果的波动性较大;DHPLC检测技术在基因定量分析方面的准确性尚不肯定。相比传统技术,MLPA则有效的弥补了上述缺陷:(1)MLPA仅利用一对通用引物,在同一反应管中可同时扩增脊髓性肌萎缩症相关的多个基因<sup>[18]</sup>,有利于明确基因缺失的具体范围,在探讨基因型与临床表型的关系中具有明显优势。此外,还明显减少了DNA模板用量,从而提高了实验效率。(2)MLPA能对脊髓性肌萎缩症的致病基因进行定量分析,可准确诊断脊髓性肌萎缩症患者、检测携带者,在产前诊断中也具有明显的优势。(3)MLPA含有众多内对照探针,包括脊髓性肌萎缩症相关基因内及基因外的对照序列,对DNA模板不需精确定量,实验结果准确性高、可重复性良好。众所周知,产前检测的责任重大,对于基因检测结果的准确性要求较高,本文联合应用MLPA及PCR-RFLP两种技术对脊髓性肌萎缩症进行产前诊断,进一步提高了实验结果的准确性,随访结果也证实了实验结果的准确性及可靠性。

综上所述,MLPA是一项简便、高效、可靠的基因定量分析技术,对脊髓性肌萎缩症患者的诊断、携带者筛查,以及产前诊断是一种有效的基因检测工具,具有较高的临床应用价值。

#### 参 考 文 献

- [1] Ogino S, Wilson RB. Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Genet*, 2002, 111:477-500.
- [2] Prior TW, Professional Practice and Guidelines Committee. Carrier screening for spinal muscular atrophy. *Genet Med*, 2008, 10:840-842.
- [3] Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 1995, 80:155-165.
- [4] Roy N, Mahadevan MS, McLean M, et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell*, 1995, 80:167-178.
- [5] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation: dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30:e57.
- [6] Munsat TL, Davies KE. International SMA consortium meeting (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord*, 1992, 2(5/6):423-428.
- [7] Liu XX, Chen WJ, Ye Z, et al. The application of amniocentesis in prenatal gene diagnosis of spinal muscular atrophy by ultrasonic guidance. *Zhongguo Chan Qian Zhen Duan Za Zhi (Dian Zi Ban)*, 2011, 3:13-16.[刘新秀, 陈万金, 叶真, 等. 超声引导羊膜腔穿刺产前基因诊断脊髓性肌萎缩症. *中国产前诊断杂志(电子版)*, 2011, 3:13-16.]
- [8] Wang N, Wu ZY, Murong SX, et al. Rapid gene diagnosis of spinal muscular atrophy. *Zhongguo Shen Jing Mian Yi Xue He Shen Jing Bing Xue Za Zhi*, 1999, 6:124-127.[王柠, 吴志英, 慕容慎行, 等. 脊髓性肌萎缩症的快速基因诊断研究. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 1999, 6:124-127.]
- [9] Gu Y, Xie JS, Han CX, et al. Gene diagnosis and carriers detection of spinal muscular atrophy by multiplex ligation dependent probe amplification. *Zhonghua Lin Chuang Yi Shi Za Zhi (Dian Zi Ban)*, 2010, 4:1512-1519.[古艳, 谢建生, 韩春锡, 等. 应用多重连接依赖探针扩增技术对脊髓性肌萎缩症患者及致病基因携带者进行基因诊断. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2010, 4:1512-1519.]
- [10] Zhu HY, Hu YL, Li J, et al. Studies on the molecular diagnosis and prenatal diagnosis of the spinal muscular atrophy carriers by multiplex ligation-dependent probe. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2010, 27:38-41.[朱海燕, 胡娅莉, 李洁, 等. 应用多重连接依赖性探针扩增技术进行脊髓性肌萎缩症的基因诊断及产前诊断. *中华医学遗传学杂志*, 2010, 27:38-41.]
- [11] Scariolla O, Stuppia L, De Angelis MV, et al. Spinal muscular atrophy genotyping by gene dosage using multiple ligation dependent probe amplification. *Neurogenetics*, 2006, 7:269-276.
- [12] Scheffer H, Cobben JM, Mathijs G, et al. Best practice guidelines for molecular analysis in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet*, 2001, 9:484-491.
- [13] Su JF, Chen WJ, Wu ZY, et al. Establishment and preliminary application of single cell nested polymerase chain reaction technique in spinal muscular atrophy. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2008, 8:129-133.[苏峻峰, 陈万金, 吴志英, 等. 脊髓性肌萎缩症单细胞巢式聚合酶链反应技术的建立及初步应用. *中国现代神经疾病杂志*, 2008, 8:129-133.]
- [14] Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, et al. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time LightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet*, 2002, 70:358-368.
- [15] Wang N, Wu ZY, Murong SX. Molecular genetic studies on spinal muscular atrophy. *Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi*, 1999, 32:177-179.[王柠, 吴志英, 慕容慎行. 脊髓性肌萎缩症的分子遗传学研究. *中华神经科杂志*, 1999, 32:177-179.]
- [16] Chen WJ, Wu ZY, Wang N, et al. Correlation between SMN2 copies and the phenotype of spinal muscular atrophy. *Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi*, 2005, 38:673-676.[陈万金, 吴志英, 王柠, 等. 脊髓性肌萎缩症运动神经元生存基因2拷贝数与临床表型的关系. *中华神经科杂志*, 2005, 38:673-676.]
- [17] Burret P, Bürglen L, Clermont O, et al. Large scale deletions of the 5q13 region are specific to Werdnig-Hoffmann disease. *Am J Hum Genet*, 1996, 33:281-283.
- [18] Arkblad E, Tulinius M, Kroksmark AK, et al. A population-based study of genotypic and phenotypic variability in children with spinal muscular atrophy. *Acta Paediatr*, 2009, 98:865-872.

(收稿日期:2012-04-30)