

R
008.8
4424-4
88

私立中山醫學院醫學研究所

Graduate Institute of Medicine
Chung Shan Medical and Dental College

碩士論文
Master Thesis

肌強直型肌肉萎縮症診斷程序之建立及 突變途徑之研究

The establishment of diagnostic procedure and the
study of CTG trinucleotide expansion pathway of
myotonic dystrophy

指導教授：李宣佑 博士 (Shuan-Yow Li, Ph. D)
蕭光明 博士 (Kuang-Ming Hsiao, Ph. D)



研究生：林和茂 (Her-Maw Lin)

中華民國八十八年六月

June 1999

參考書恕不外借

中山醫學院圖書館



C055214

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 大學(學院) 醫學研究所 系所
丙組 87 學年度第 二 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱：肌強直型肌肉萎縮症診斷程序之建立及突變途徑之研究

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利的附件之一，請將全文資料延後兩年後再公開。(請註明文號:)

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鉤選，本人同意視同授權。

指導教授姓名:

研究生簽名:

(親筆正楷)

林和茂

學號: R86127

(務必填寫)

日期:民國 88 年 6 月 15 日

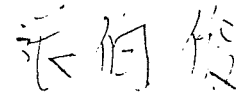
1. 本授權書請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。
2. 授權第一項者，請再交論文一本予畢業學校承辦人員或逕寄 106-36 台北市和平東路二段 106 號 1702 室 國科會科學技術資料中心 王淑貞。(本授權書諮詢電話:02-27377746)
3. 本授權書於民國 85 年 4 月 10 日送請內政部著作權委員會(現為經濟部智慧財產局)修正定稿。
4. 本案依據教育部國家圖書館 85.4.19 台(85)圖編字第 712 號函辦理。

本論文為中山醫學院與理學碩士學位之必備條件之一，
經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審合格及
口試通過。

口試委員

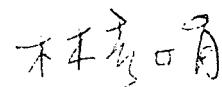
國立中興大學獸醫微生物研究所副教授

張伯俊 博士



國立成功大學附設醫院小兒科主任

林秀娟 教授



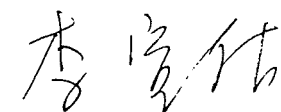
私立中山醫學院醫學研究所副教授

謝明麗 博士



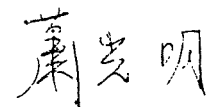
私立中山醫學院生命科學系教授
(論文指導教授)

李宣佑 博士



私立中山醫學院生命科學系副教授
(論文指導教授)

蕭光明 博士



中華民國八十八年六月

學生林和茂論文題目為強直型肌肉萎縮症診斷新程序的建立及突變途徑之遺傳分析，其論文已經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試員會審合格及口試通過，並由其指導教授閱後無誤。

指導教授： 李宣佑

簽名：李宣佑

蕭光明

簽名：蕭光明

中華民國 年 月 日

誌謝

不知不覺研究所兩年的時間很快的就過去了，回首過去的兩年中，不論是研究方面或生活上都受到很多人的支持及鼓勵，才能使本篇碩士論文能夠如期完成，在此致上十二萬分的謝意。

首先得感謝李宣佑老師及蕭光明老師，這兩年來在精神上的鼓舞、經費上充分的支援，並且在研究方面也給與我很大的思考空間，讓我能在學習中得到更多寶貴的經驗；此外也由衷的感謝林秀娟教授、張伯俊副教、謝明麗副教授百忙中抽空擔任我碩士論文的口試委員，及對本論文的審閱和提出寶貴的建議，使本論文可以更趨完善。特別感謝李月君老師、潘惠錦老師、王怡鈞老師、林玫伶學姐在實驗方面的指導與協助，還有謝謝蔡姐、謝姐、佩宜姐、麗嬌學姐、蜜淇學姐、淑卿姐及細胞遺傳室所有的美女們，及生命科學系全體的老師們、李娟老師、林齊強教授給予的鼓舞和幫助；另外謝謝佳慧、東城等同學、淑如、雅蘭、明芳、濟安、彥賢、澤峰、逢辰等學弟妹在生活上的照應及妳(你)們所帶來的歡樂；以及所有配合研究的家屬和所有幫助過我的每一個人，向妳(你)說聲" 謝謝 "。

最重要的是要感謝我的父母親，在這一路上求學的過程中，給予我無限的支持、關懷與鼓勵，使我能無後顧之憂順利的完成學業。最後謹將本論文獻給的的父母親、家人及所有關心和鼓勵我的人。

林和茂 謹誌於
中山醫學院 醫學研究所
中華民國八十八年六月

目錄

第一章、肌強直型肌肉萎縮症診斷程序之建立

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
序 論.....	3
結 果.....	7
1. 正常 CTG 三聯核 酸序列長度之偵測.....	7
2. DM allele 內 CTG 重複序列長度之偵測.....	7
3. FTA [®] -PCR 分析系統的建立.....	9
4. FTA [®] -PCR 系統偵測口腔及羊水細胞之 CTG 序列長度...	11
討 論.....	13
圖 表.....	17

第二章、台灣地區肌強直型肌肉萎縮症突變途徑之遺傳分析

中文摘要.....	32
英文摘要.....	33
序 論.....	34
結 果.....	37
1. 單套型分析方法之建立.....	37
2. DM allele 之單套型分析.....	38
3. 早期 CTG 序列增生突變途徑之分析.....	38
討 論.....	40
圖 表.....	43
材料與方法.....	51
參考文獻.....	68

第一章

肌強直型肌肉萎縮症診斷程序之建立

Establishment of a new diagnostic procedure for
myotonic dystrophy

中文摘要

肌強直肌肉萎縮症(myotonic dystrophy, dystrophia myotonia, DM)是位於第十九對染色體上之 DMPK (myotonic dystrophy protein kinase)基因第 15 個 exon 上一段 CTG 三聯核苷酸重複序列發生擴增突變(expansion mutation)所造成，而 CTG 的擴增長度和 DM 臨床症狀的嚴重性以及患者發病年齡有很大的關係。傳統上 CTG 擴增突變之偵測以南方點漬法(Southern blot)為主，PCR 技術之發展使得 DM 分子診斷更為簡單方便，然而 PCR 的應用上易受限於不良品質的模版及高比例(C+G)的 CTG 重複區域，為了改進這些缺點，我們發展了 FTA[®]-PCR 分析系統。此系統不僅操作方便而且非常的靈敏，它包括了檢體的收集、保存、DNA 純化及 PCR 分析序程，是一套非常完整的偵測系統。利用此系統只需以微量的 DNA 或極少數細胞，即可偵測出 CTG 重複序列數目。此外我們以口腔內膜細胞以及羊水細胞作為檢體，開發此分析系統在 DM 盛行率調查及產前診斷方面的應用，研究結果顯示 FTA[®]-PCR 系統不僅可應用於 DM 遺傳諮詢及臨床診斷上，未來應可以用於其他三聯核苷酸增生疾病的偵測。

英文摘要

Myotonic dystrophy (DM) is caused by a CTG trinucleotide expansion mutation at exon 15 of the myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) gene. The clinical severity of this disease correlates with the length of the CTG trinucleotide repeats as well as the age of onset. Determination of the CTG repeat length has been primarily relied on Southern blot analysis on restriction enzyme-digested genomic DNA. The development of PCR technology provides a much more sensitive and simpler protocol for DM diagnosis. However, the quality of the template and the high (G+C) ratio of the amplified region hamper the use of PCR on the diagnosis of DM. Here we describe a procedure, FTA[®]-PCR system, including sample collection, DNA purification, and PCR analysis of CTG repeat length without using 7-deaza-dGTP. This protocol is very sensitive and convenient since high quality DNA sample can be obtained with only few nucleate cells, including lymphoblastoid cells, buccal cells, and amniotic fluid cells, for the detection of CTG repeat length. Therefore, FTA[®]-PCR system could be very useful in genetic counseling and prenatal diagnosis as well as prevalence study of other trinucleotide repeat diseases.

序論

肌強直型肌肉萎縮症(Myotonic dystrophy, dystrophia myotonia ; DM)是一種體染色體顯性遺傳(autosomal dominant)、神經肌肉方面的疾病。在臨床症狀的表現上主要包括肌肉收縮後不易放鬆、肌肉(臉部、頸部、和四肢)無力及漸進性萎縮等。除此之外，也可能影響眼睛、腦、皮膚、肺等器官及內分泌系統疾病而出現白內障、智能障礙、禿頭、肺炎、糖尿病及男性不孕等症狀(Harper 1989)。造成此一多系統疾病的主要原因係因位於第十九對染色體長臂(19q 13.3)上一段CTG三聯核苷酸重複序列發生倍增突變所導致(Brook et al. 1992; Fu et al. 1992; Mahadevan et al. 1992)(附圖一)。在正常人的染色體內，此段CTG核苷酸重複次數是5-40次，而DM患者之CTG數目則超過50次，甚至可達千次之多。若重複次數在50-200次之間，則大多無臨床症狀(asymptomatic carrier)或僅有輕微肌肉無力、白內障等症狀(稱為benign DM)。隨著CTG核苷酸重複次數之增加，DM患者之臨床症狀也愈明顯；如超過200次以上，則會顯現出典型肌強直症神經肌肉的特徵，並伴隨漸進性肌肉無力和四肢末端萎縮。典型DM(classic DM)多在成人或成人早期(20-40歲)開始發病，其CTG核苷酸重複之次數絕大多數在1,000次以下。最嚴重的DM型式是先天的肌強直型肌肉萎縮症(congenital myotonic dystrophy, 簡稱CDM)，其臨床症狀通常在出生前或出生時就已顯現出來，此類患者的CTG核苷酸重複次數大多在1,000次以上。主要症狀包括低肌張(hypotonia)、呼吸無力、發育遲緩等

(Harris et al. 1996)。所以 CTG 擴張重複序列的長度與患者的發病年齡和疾病的嚴重程度成正比，其 p(CTG) n 的 n 值愈大，通常發病年齡越早，而且發病症狀也越嚴重。如同 fragile X syndrome，DM 家族內亦常出現所謂的期望現象(phenomenon of anticipation)，亦即子代 DM 的發病年齡通常比親代早而且症狀也比較嚴重(Redman et al. 1993)。

DM 是成人肌肉萎縮症中最常出現的一種，在全世界分佈的範圍很廣，然而其發生率有區域性，在日本發生率約為 1:18000(Davies et al. 1992)，西歐及北美地區約為 1:8000(Harper et al. 1989)，而在加拿大魁北克省 Saguenay-Lac-St-Jean 區域則高達 1:475 (Bouchard et al. 1989)。根據 Ashizawa 及 Epstein 等人對各大醫院之問卷調查結果顯示，東南亞地區 DM 的流行率遠比上述區域為低 (Ashizawa, Epstein 1991)。由於 DM 分子診斷技術在 1992 年才被發表出來，所以此一統計資料乃基於臨床診斷結果。而根據 Tishkoff 等人對 84 位正常中國人 CTG 序列數目之分佈的調查結果顯示他們的 CTG 序列重複次數皆小於 18 (Tishkoff et al. 1998)。這些數據顯示 DM 在中國之流行率可能非常低。然而，截至目前為止，在東南亞區域各個國家，包括台灣在內的 DM 流行率並無確實數字之報告。由於肌肉萎縮症(muscular dystrophy)有很多種，包括性聯隱性基因遺傳的進行性肌肉萎縮症(有 Duchenne type 及 Becker type)，體染色體顯性遺傳的顏肩肱型肌肉萎縮症(Facio-scapulo-humeral type)和強直型肌肉萎縮症(DM)，及體染色體隱性遺傳的肢帶型肌肉萎縮

症(Limb girdle type, 此病亦有出現以體染色體顯性遺傳者)等等(臺灣遺傳性神經肌肉疾病研究小組等印行 1997)。在診斷上,除了臨床特徵、生化檢驗,分子層次的基因診斷提供特異性高且準確之參考。為建立起本土性強直型肌肉萎縮症的盛行率資料,了解其遺傳特徵,並進一步調查 CTG 倍增突變之途徑和研究造成 CTG 倍增突變之源由,以作為遺傳諮詢和探討致病機轉之依據,我們首先發展 DM 的分子診斷技術。

由於聚合酶連鎖反應(PCR)之方法無法有效放大 CTG 倍增突變的區域,為要檢測出 CTG 重複是否有倍增突變,傳統上用南方點漬法(Southern blot)來作分析。因為此方法需大量 DNA (>5 μ g)、費時、耗力,且不易測出小片段 CTG 倍增突變在 DM 臨床分析、遺傳諮詢、及產前診斷等應用上有其侷限性。近年來,Cheng 等人(Cheng et al. 1996)發展出用 PCR 方法來判定倍增突變後 CTG 重複序列數目。其所發表之 PCR 條件及診斷程序雖然非常靈敏且能準確偵測大範圍的 CTG 倍增突變,但是因其所用的引子(primer set)距離 CTG 區域超過 2 kb,所以 PCR 產物大於 2.1kb,對於偵測小範圍的 CTG 倍增突變之解析度較差,加上偵測不同程度的 CTG 倍增長度須加入不同濃度之 7-deaza-dGTP 於 PCR 反應液中,以及 PCR 反應效率常受到 DNA 模版品質之影響等等,使 PCR 在 DM 診斷上的應用主要仍停留在實驗室內。為克服這些限制,我們發展出一套 FTA-PCR 分析系統來偵測正常及突變染色體內 CTG 重複序列數目(Hsiao et al. in press)。此分析系統包括用位於 CTG 序列附近之 DNA 序列被設計當作引子以增加偵

測小範圍的 CTG 倍增突變之解析度，用 Advantage GC cDNA polymerase 和 GC-melt(Clontech)來降低因(G+C) ratio 高造成的二級結構妨礙 PCR 之進行的影響以提高 PCR 反應效率，並結合 FTA gene guard 樣品收集及 DNA 純化系統以穩定 DNA 品質。利用血液檢體，我們證實此一 FTA-PCR 分析系統能準確判定正常人及具不同 CTG 倍增突變程度病人之 CTG 長度。為使此一分析系統流程化以期能更廣泛應用在臨床檢驗以及盛行率調查之研究上，我們利用正常人、及 DM 病人的口腔內膜細胞和正常的羊水細胞作為分析樣本，進一步探討 FTA-PCR 分析系統在利用不同體細胞作為檢體以進行 DM 分子診斷之可能性。我們的實驗結果顯示，不論是血液細胞、口腔內膜細胞、或羊水細胞之檢體，皆可以長期保存在 FTA card 上，要偵測 CTG 重複的長度時，只需將含檢體的 FTA card 取出、加以純化，再行 PCR 或 PCR - based Southern blot 分析即可，非常的方便。而且只要約二十個細胞就可以快速診斷出 CTG 的擴增長度。因此 FTA-PCR 分析系統對於 DM 的盛行率調查、產前診斷、及遺傳諮詢方面皆有所助益，且未來可將此系統應用在其他三聯核苷酸增生疾病之偵測上。

結果

一、正常 CTG 三聯核苷酸序列長度之偵測：³²P-incorporated PCR

正常 allele 之 DM 基因座內 CTG 重複序列數目之偵測係利用 α -³²P-dCTP 嵌入 PCR 產物之方法行之(詳見方法與材料部分)。圖一列出涵蓋 CTG 重複序列區域兩側，位於 DMPK 基因 3'-UTR(非轉譯區，untranslated region)部分鹼基序列以及各引子所在位置。由圖可知，用 primer-H 及 -ER 可夾出(132+3n)bp 之 PCR 產物，其中 n 為 CTG 重複次數。(圖二)係利用 primer-H 及 -ER 為引子組來偵測臺灣地區正常 alleles 內 CTG 重複次數之代表例子。相對於左側一個已知的 marker sequence，可知道 PCR 產物的大小並能計算出所含 CTG 重複的次數。分析結果顯示 CTG 重複的次數主要分佈於(CTG)₅ 及 (CTG)₁₁₋₁₃ 兩個區域(圖二 and data not shown)。圖二中 lane 7 的檢體除了(CTG)₅ 外，還有至少(CTG)₄₂ 和(CTG)₅₀ 的兩個訊號，表示此方法可以偵測到至少 50 次的 CTG 重複序列長度。而為進一步證實這種單一個體內出現二種以上 CTG 重複次數之 DNA 長度異質性，我們以選殖及定序的方法發現此檢體同時具有至少 5、26、42、43、50 五種不同長度的 CTG 重複序列(data not show)。

二、DM allele 內 CTG 重複序列長度之偵測：PCR-based Southern blotting

絕大部分 DM alleles 之 CTG 重複序列次數高於 50，甚至達 2,000 以上，由於在此區域之(G+C)比例高達 66%，使得 PCR 效率很低，加上 DNA 二級結構(secondary structure)之影響，常造成 PCR 產物之異質性。而 genomic Southern blot 之方法雖然特异性高，但過程繁複且靈敏度差。結合兩者之優點，我們發展出 PCR-based Southern blotting 分析方法。此方法利用一種可克服並放大 GC-rich 區域之聚合酶(Advantage[®]-GC cDNA polymerase; Clontech)，以合適的反應條件進行 PCR 後，再以 Alkaline phosphatase-conjugated (CTG)₁₀ 為探針與以 1.5% agarose 分離 PCR 產物後進行雜交(hybridization)。(圖三)所分析之檢體包括一位正常人(N)，一位 DM 帶因者，及四位具有不同 CTG 擴增長度之 DM 患者(DM1-4)，並以一般 PCR 反應時所用模版 DNA 的濃度 100ng 來進行 PCR。由於此一 PCR 反應是以 primer-H 和 ER 為引子，若 CTG 重複次數為 n，則 PCR 產物大小為 132+3n，因此正常 allele((CTG)_{<42})之 PCR 產物應小於 258 bp。由結果可知，在上述條件下此方法能清楚分辨檢體 DNA 內 CTG 突變程度，特別是(CTG)_{<150} 之長度偵測。而一般已出現臨床症狀之 DM 患者之檢體則呈現出帶狀的訊號(smearing signal)(DM1-DM4)。這可能是因 DM 檢體 DNA 內存在 CTG 長度異質性的關係(Monckton et al., 1995; Fu et al., 1996)。經 ³²P-PCR 之偵測，從 N 至 DM4 檢體內正常 alleles 之 CTG 重複次數分別為(5/11)，(5)，(5)，(5)，(12)，(11) (data not shown)。相對於(圖三)之結果，這些代表較短 CTG 長度之訊號顯得較弱(N，DM3，DM4)，甚至無法

測得訊號(C, DM1, DM2)。這些結果顯示我們所使用之膠體電泳條件無法有效分離代表具不同 CTG 長度之正常 alleles 的 PCR 產物，而且當(CTG)₁₀ 探針與較短 CTG 長度 PCR 產物之結合較弱，容易在清洗步驟中被洗掉。

為更精確偵測出 DM 檢體 CTG 擴增長度，我們探討了不同 DNA 模版濃度之影響。於(圖四)之實驗中，在 20 μ l 之 PCR 反應溶液中加入不同量從一位正常人及二位 DM 患者(N, DM2, DM4, 如圖四之檢體編號)取得之血液檢體 DNA 為模版。結果顯示偵測 CTG 擴增長度之最適量 DNA 為 100 picograms (pg) (圖四)。應用此一適化後 PCR 條件於偵測不同程度 CTG 擴增突變之結果示於圖五。其中 lanes 5-12 DNA 檢體內突變 alleles 之 CTG 重複次數約為 42, 70, 73, 160, 290, 450, 700, 和(1050/1180)。而據 ³²P-PCR 之方法，lanes 1-12 DNA 檢體內正常 alleles 之 CTG 重複次數分別為(5/13), (5/11), (5/5), (5/11), (5), (5), (5), (13), (5), (14), (5), 和(11)。由以上結果可知 PCR-based Southern blotting 之分析方法能精確測出 DM 檢體內主要之 CTG 擴增長度。

三、FTA[®]-PCR 分析系統的建立

利用 ³²P-PCR 及 PCR-based Southern blotting 之方法可快速偵測出正常及 DM alleles 內 CTG 序列長度，而微量檢體之收集、保存、DNA 的純化、以及 DNA 品質之維持在臨床診斷及盛行

率調查之研究上亦非常重要。因此我們開發了 FTA[®] Gene Guard System (Gibco BRL) 在 CTG 序列長度偵測方面之應用，稱之為 FTA[®]-PCR 分析系統(請參考方法與材料)。利用 1 μ l 正常人的血液檢體，圖六清楚顯示利用 FTA[®] Gene Guard System 取得之 DNA 可用於 ³²P-PCR 之方法測出正常 DM alleles 內 CTG 序列長度。於圖七我們利用不同數目、已轉型的病人淋巴母細胞(lanes 1-4 分別為 200、100、20、10 個細胞)經 FTA[®] card 收集、DNA 純化、以及 PCR-based Southern blotting 分析，發現檢體含 10-20 個細胞時，可以得到一明確之訊號。而細胞數在 100 以上時，所得之訊號呈現帶狀。一個人體細胞約含有 5 pg 的 genomic DNA，因此 10-20 個細胞之 DNA 的含量約為 50-100 pg，所以圖七的結果更加確定先前之假設，就是由於 CTG 長度異質性的關係，所以模版 DNA 濃度或檢體細胞數會影響分析之結果。圖八是以一個 DM 家族為例，比較 Southern blot 以及 FTA[®]-PCR 方法之分析結果。利用 10 個已轉型的淋巴母細胞 FTA[®]-PCR 分析出 II-4、II-6、II-8 及 III-3 之擴增 CTG 數目為 1020、1080、720 及 950，而利用 10 μ g 血液 DNA 之南方點漬法的結果則約為 1060、1060、730、及 (800-1300)。二者結果非常吻合。

因為在 myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) 基因的 intron 8 具有 Alu 多型性(Alu 1kb insertion/deletion polymorphism)的存在(Mahadevan et al. 1993)(附圖一)，以限



制酶 *EcoRI* 來做切割之南方點漬法可偵測得到 8.6 kb 或者 9.6 kb 的訊號。目前國外的研究指出 DM 擴增的 allele 均發生於 Alu insertion 的 allele 上，唯一的例外是在非洲奈及利亞的一個家族(Krahe et al. 1995)，其 DM allele 為 Alu deletion。根據我們的調查，台灣地區的 DM allele 皆屬於 Alu insertion(請參閱單套型分析：haplotype analysis)。因此於南方點漬法測得之訊號若大於 9.6kb 時即代表是 DM 患者，而 CTG 的次數為 n 時，訊號將位於 $(9,600+3n)$ bp 處。因此，南方點漬法不易區分正常和 CTG 長度少於 150 之 DM allele(如圖五 lanes 5-7 之檢體)。

三、以 FTA[®]-PCR 系統偵測口腔及羊水細胞檢體之 CTG 序列長度

由於血液檢體之抽取係一具有侵襲性之方式，須要醫護專業人員之協助，所以在大量篩選之調查上成本高且困難度高。因此，我們嘗試用口腔內膜細胞為 FTA[®]-PCR 系統之分析檢體以利正常 CTG 長度之分佈頻率及 DM 盛行率調查之研究。同時，羊水細胞亦被作為檢體來探討 FTA[®]-PCR 系統在產前診斷之應用。(圖九)之結果顯示在 2.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) 存在下，³²P-PCR 方法可明確偵測口腔內膜細胞(圖九 A)及羊水細胞內(圖九 B)正常 alleles 之 CTG 長度。以口腔內膜細胞為檢體調查正常 alleles 內不同 CTG 長度之分佈頻率時，我們發現臺灣地區的確存有 $(CTG)_{>17}$ 之 alleles(如 $(CTG)_{20}$ of N3, 圖九 A)。雖然以前在

中國人口中從未發現有(CTG)₁₈₋₃₅之 alleles(Tishkoff et al. 1998)，此一新證據顯示臺灣地區 DM 之發生亦可能經(CTG)₁₈₋₃₅ alleles 擴增至(CTG)_{>50}之 DM alleles(請參閱 CTG 擴增途徑之分析)。

個體內二個 alleles 之 CTG 序列長度有可能一樣稱為同型合子(homozygous)或不同稱為異型合子(heterozygous)。臺灣地區非 DM 人口中 heterozygous 對 homozygous 之比例約為 81% (Hsiao et al. unpublished data)，與白種人口中之比例極為相似(Brook et al. 1992, Fu et al. 1992, Mahadevan et al. 1992)。因此，³²P-PCR 方法若僅偵測出一個 CTG 序列長度，則此檢體有可能是 homozygous(N3 and N12, 圖九)或者是 DM 患者(P1-P4, 圖九)。因此，接著我們將只測得一個訊號的檢體以 PCR-based Southern blotting 做進一步的分析來決定是否為 DM 患者(圖十)。這些結果證明利用 FTA[®]-PCR 系統，以 10-20 個細胞，無論是血液細胞、口腔細胞、或羊水細胞，即可診斷出 DM alleles 之擴增突變。

討論

隨著三聯核苷酸重複序列增生的疾病日漸被發掘，此類疾病之分子診斷技術之開發也益發顯得重要，尤其是發生率高的一些疾病如：易脆 X 染色體症候群(1/850)(Brown et al. 1990)及肌強直肌肉萎縮症(1/8000)(Harper et al. 1989)。在肌肉方面會導致肌肉萎縮的疾病有很多種，而在臨床特徵上和 DM 相似的疾病也不少，所以可以利用分子生物的技術來診斷、分類這些疾病。在診斷上，係從有細胞核的細胞中粹取 DNA，然後進行 PCR 或南方點漬法來做分析。而在傳統上純化及保存 DNA 時，微生物的污染、DNA 水解酶 (nuclease) 及紫外線的傷害 (UV damage)，常常使 DNA 的品質產生變化，使接下來的分析結果受到影響。因此，老舊的 DNA 並不適合用來偵測 CTG 的擴增，造成有時需要第二次採血，相當不方便。在我們的經驗中，多數人對於抽血都非常排斥，特別是長期受到病痛煎熬的病人，若是要求抽血時，常會遭到拒絕。為此，我們嘗試一種檢體收集、保存及 DNA 純化的方法，稱為 FTA[®] Gene Guard System。利用此一系統，檢體可以長期保存而不影響純化後的 DNA 品質。因此，不只在採取檢體時更方便，且因不具侵襲性，受檢者的接受程度較高(表二)，可使此一疾病在家族檢體收集、遺傳特性分析、及

盛行率調查等方面更為順利。

傳統上，對 genomic DNA 進行 Southern blot 的分析，其流程約需 7-10 天，除了技術上的困難度較高之外，所需的 DNA 量至少在 5 μ g 以上(表一)。此外，Mahadevan 等人的文獻報告也指出，約有 30% 的 DM 病人無法以南方點漬法檢測出來(Mahadevan et al. 1992)。在 PCR 技術之應用方面，除了特異性的考量，CTG 重複序列的長度愈長時 PCR 效率愈低，產物也就愈難偵測。為了提高偵測之敏感度以及縮短分析時程，我們利用 Advantage-GC DNA polymerase 進行 PCR，並以 Alkaline phosphatase-conjugated (CTG)₁₀ 為探針對 PCR 產物作 Southern blot 之分析。以 (CTG)₁₀ 為探針進行雜交時，雖然含擴增 CTG 重複序列的 PCR 產物較少，但因其含有較多的 CTG 重複，所以較多 (CTG)₁₀ 探針會黏合上去，因此訊號較易偵測得到(附圖十一)。此一 PCR-based Southern blotting 方法用來偵測 DM 係 Mahadevan 等人於 1992 年時首先提出(Mahadevan et al. 1992)。他們以同位素標幟之 (CTG)₁₀ 為探針，雖能區分正常及 DM alleles，但無法定出患者 CTG 重複次數。Cheng 等人(Cheng et al., 1996) 在 PCR 反應溶液中加入 7-deaza-dGTP/dGTP 代替原來的 dGTP 以改進反應效率，但其結果顯示，依不同的 CTG 長度需加入含 20% 到 90

% 不等 7-deaza-dGTP 之 7-deaza-dGTP/dGTP。由於一般臨床受檢者 CTG 重複次數並不清楚，此方法在實際應用上並不容易。在此論文中，我們呈述一種不需要使用 7-deaza-dGTP 且能準確偵測大片段 CTG 重複序列次數之方法。

在 PCR 反應最適條件之建立方面，除了 DNA polymerase 之測試外，我們亦探討了以下變因：

1. 引子延伸(extension)時間:若是延伸的時間不夠，將無法偵測到已擴增較長的 CTG 序列，因此我們將延伸的時間定為 5 分鐘。在此條件下，目前偵測過最高 CTG 重複次數為 1,200 次，所以一般典型 DM 病人((CTG)_{<1000})之偵測應無問題。
2. 引子的位置:以 ER 為例(如圖一)，因 ER 緊鄰著 CTG 重複區域，所以當 CTG 重複序列擴增時，可能由於 CTG 區域二級或三級結構的改變，使得 ER 不易在模版 DNA 找到相對應之互補序列(annealing)，而導致 PCR 效率低。因此對於 PCR-based Southern blotting 方法，我們建議以 DR 或其他非緊鄰 CTG 區域之序列為引子。
3. 模版 DNA 的濃度:可能是因為常出現在病人體內 CTG 長度之異質性的關係，當 DNA 用量過高時(>1 ng)，易使測得之訊號呈

現帶狀而不易判定CTG擴增長度，若將模版的濃度降至100pg~1ng時，可以得較清晰的單一訊號(圖四)。

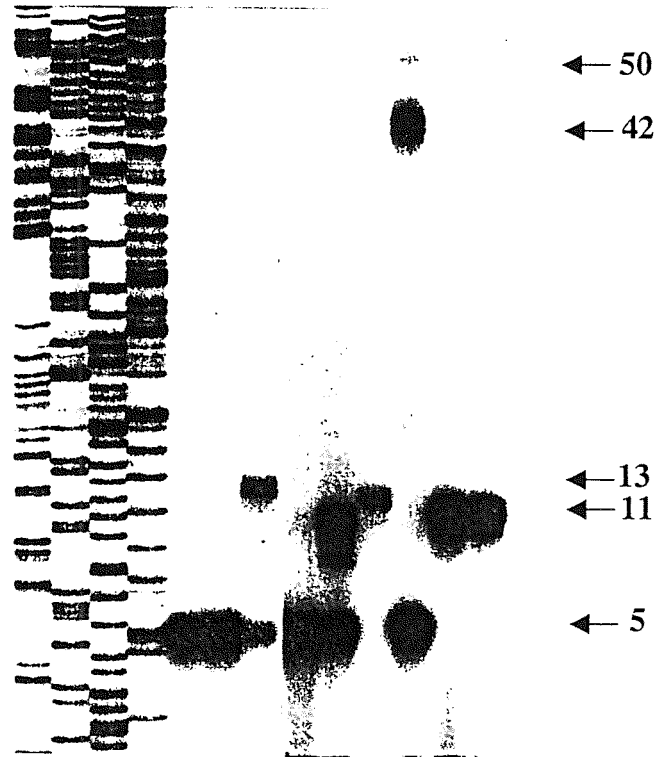
結合 FTA 檢體收集、保存、DNA 純化及 PCR 分析方法(³²P-incorporated PCR 或 PCR-based Southern blotting)，我們發展出一可以偵測正常範圍及擴增突變 CTG 序列長度之 FTA[®]-PCR 系統。利用此一系統，約 10-20 個細胞，無論是血液細胞、口腔細胞、或羊水細胞，即足夠一次分析之用。因此 FTA[®]-PCR 系統可應用在 DM 之產前診斷及盛行率調查。茲將 CTG 序列長度之分析流程示於(圖十二)。除 DM 之外，此分析流程應可診斷其他因三聯核酸擴增導致的疾病，如：Huntington's disease (HD), Spinal bulbar muscular atrophy (SBMA), Dentatorubral pallidolusyan (DRPLA), 及 Machado-Joseph disease (MJD) 等等。

結論，第一點：我們建立了一個簡單又方便的採檢、可長期保存檢體及迅速檢測的系統；第二點：此方法在偵測突變之 CTG 重複不只是非放射性操作、操作容易、靈敏度高而且操作時間短；第三：此系統僅需很少量的血液細胞、口腔細胞、或羊水細胞即可診斷 CTG 重複序列的長度。

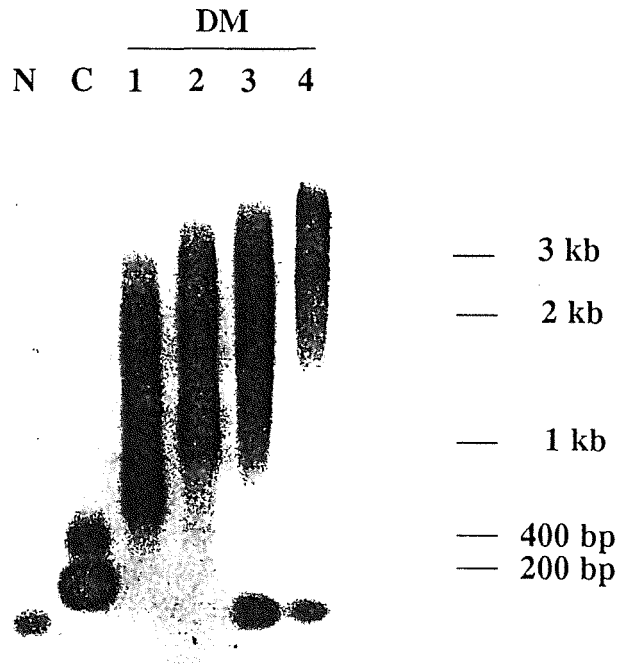


圖一 引子的位置：在 **DMPK** 基因上，於 **CTG** 重複序列兩側的引子的位置，灰色框框部分為 **CTG** 重複的位置；而引子 **H** 及 **C** 為順式的引子，引子 **ER** 及 **DR** 則為反式的引子；左側的數字是表示於 **DMPK** 基因上 **genomic** 的序列。

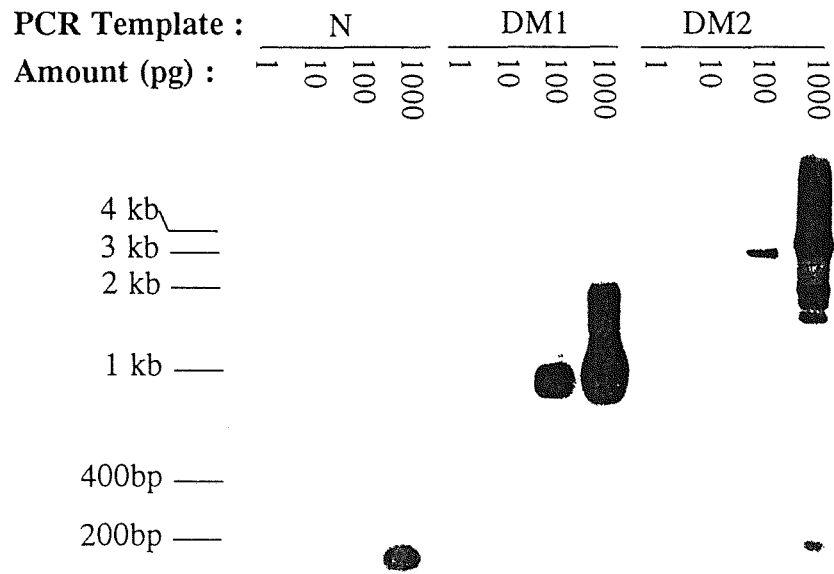
A T C G 1 2 3 4 5 6 7 8 9



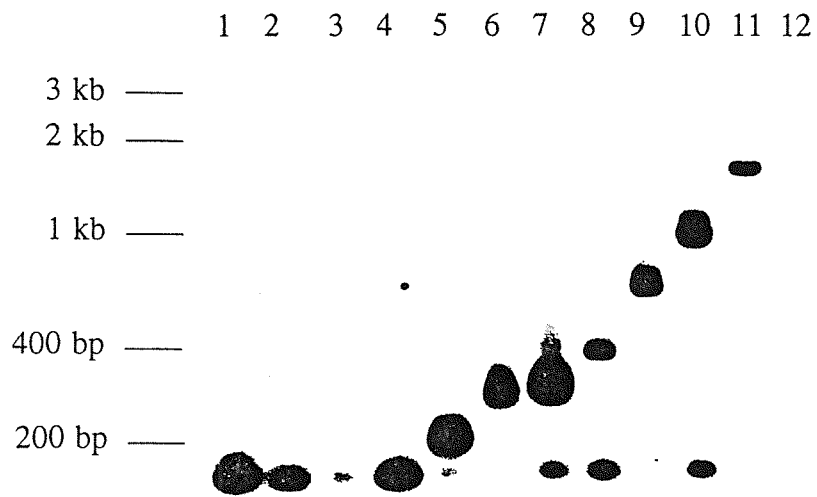
圖二 ^{32}P -PCR 偵測正常 CTG 重複次數：以 ^{32}P -PCR 的方式來計算 CTG 重複的次數，lane 1、2、4、6、8、9 為 DM 患者，lane 3、5、7 則為正常人。PCR 產物大小是以(pGEM-3Zf(-)) 為 DNA sequence marker。



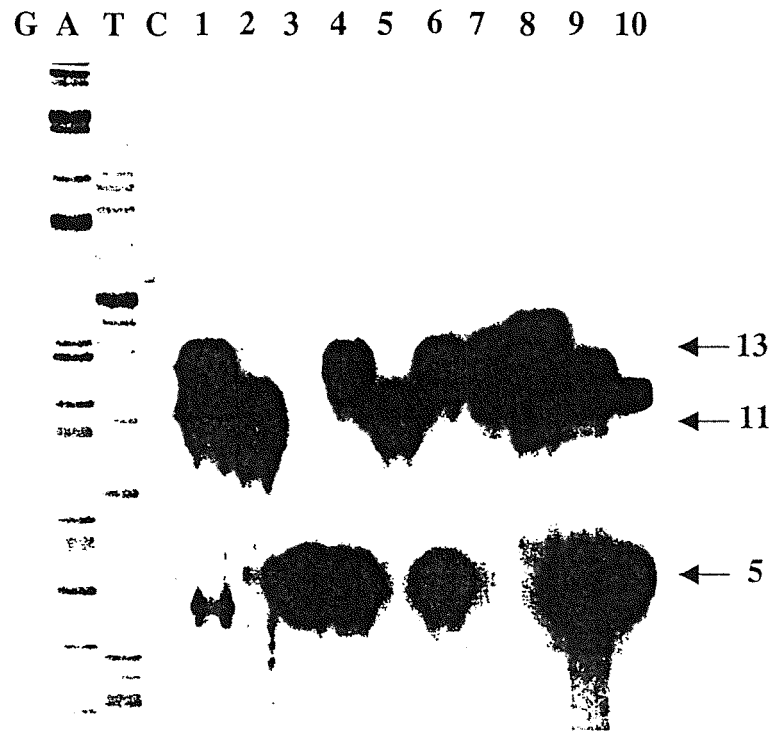
圖三 正常及擴增 CTG 重複序列之偵測：以 100ng 之 genomic DNA 為模版進行 PCR-based Southern blotting 來偵測正常及擴增的 CTG 重複序列。N 表示為正常人，C 表示帶因者，而 DM 1 至 DM 4 則表示具有不同長度 CTG 重複次數之 DM 患者。



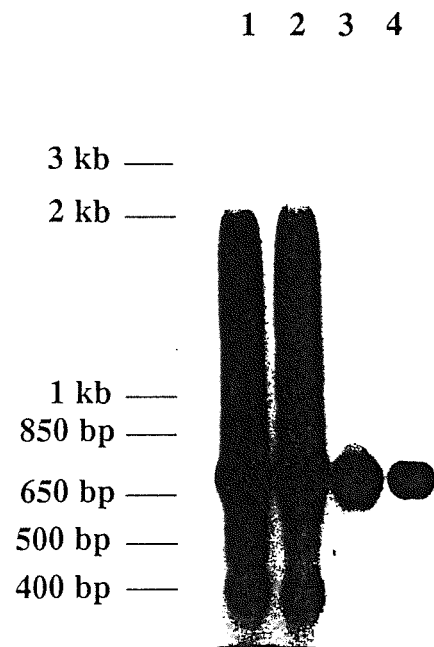
圖四 DNA 模版的濃度對偵測擴增 CTG 重複序列的影響：以 PCR-based Southern blotting 偵測擴增的 CTG 重複序列，將一個正常人(N)及兩個 DM 患者(DM 1 及 DM 2)的 DNA 依不種濃度做稀釋(詳見材料與方法)。



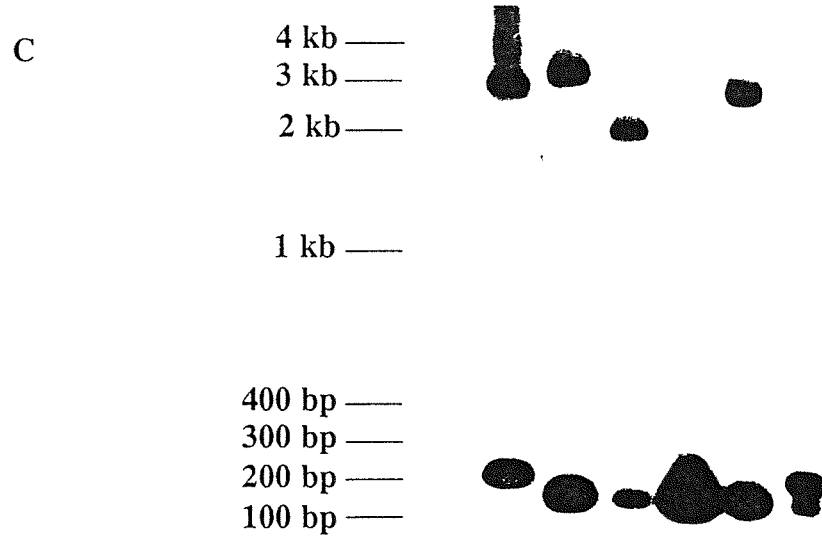
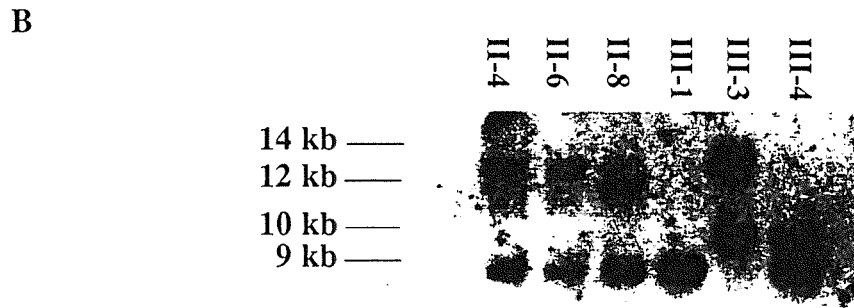
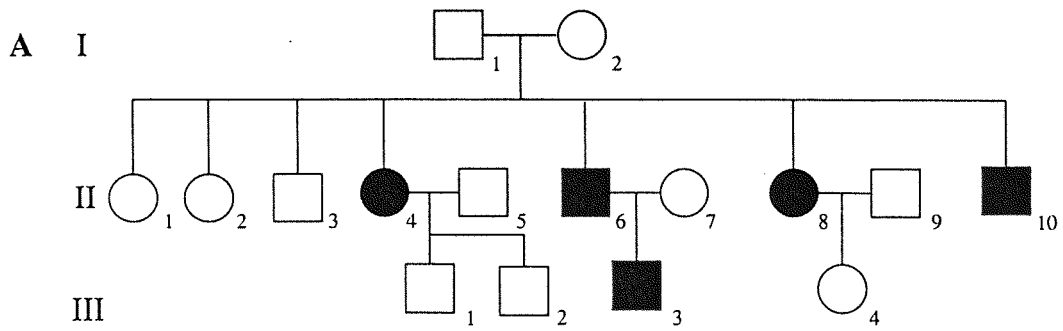
圖五 擴增 CTG 重複次數之偵測：從血液中純化 DNA，並稀釋成 100pg 作為 PCR 模版，進行 PCR based Southern blotting 分析。Lane 1-4 為正常人，lane 5-7 為 asymptomatic carrier(帶因者)，lane 8-12 則為 DM 患者。



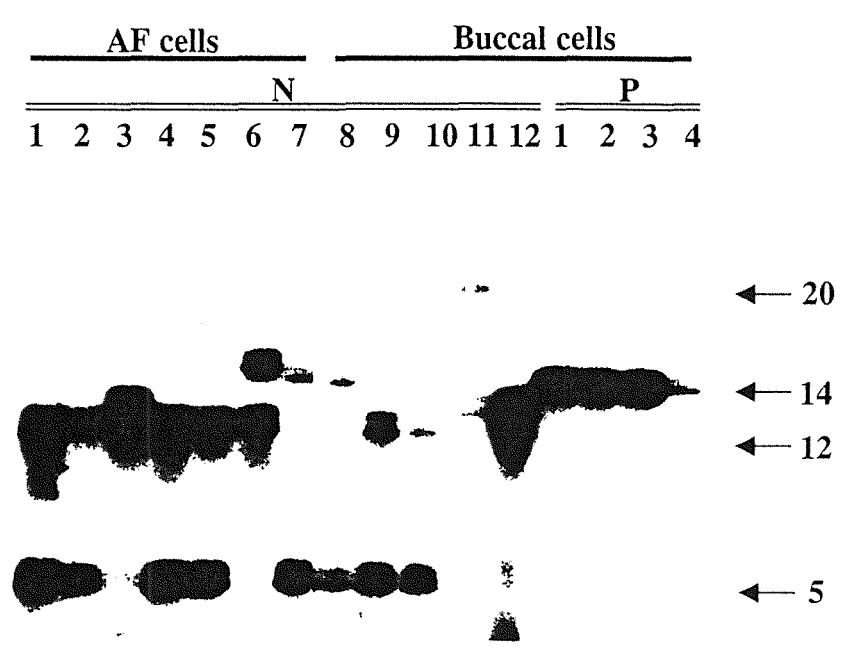
圖六 正常 CTG 重複次數之偵測：將 1 μ l 血液滴於 FTA card 上乾燥及純化後，以 32 P-PCR 來偵測正常人的 CTG 重複次數



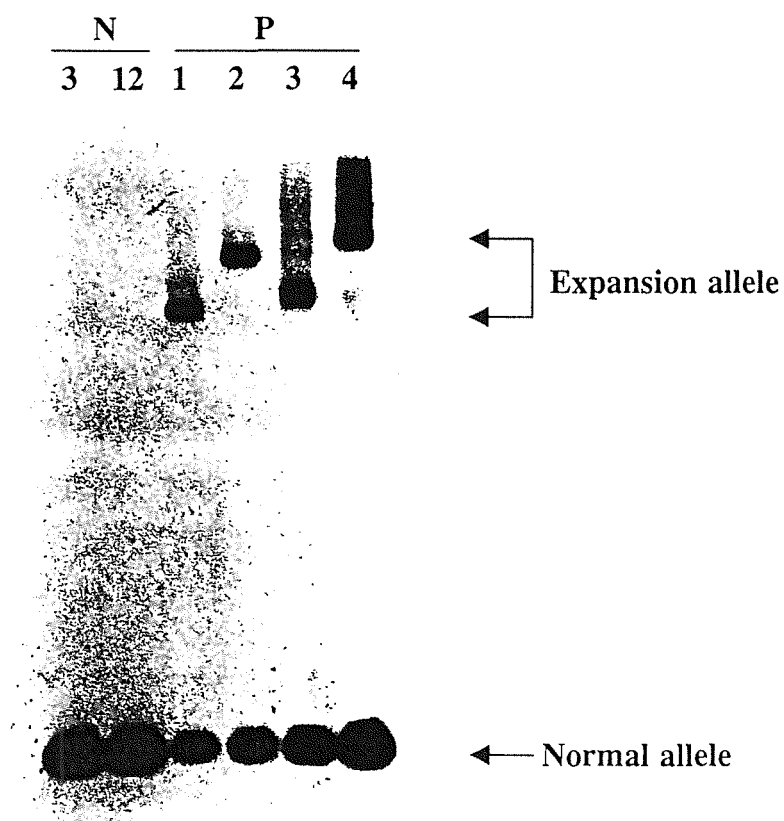
圖七 FTA[®]-PCR 系統靈敏度分析：將不同數目之已轉型淋巴細胞滴於 FAT card，並進行 PCR-based Southern blotting 分析。Lanes 1-4 細胞數分別為 200、100、20 及 10 個。



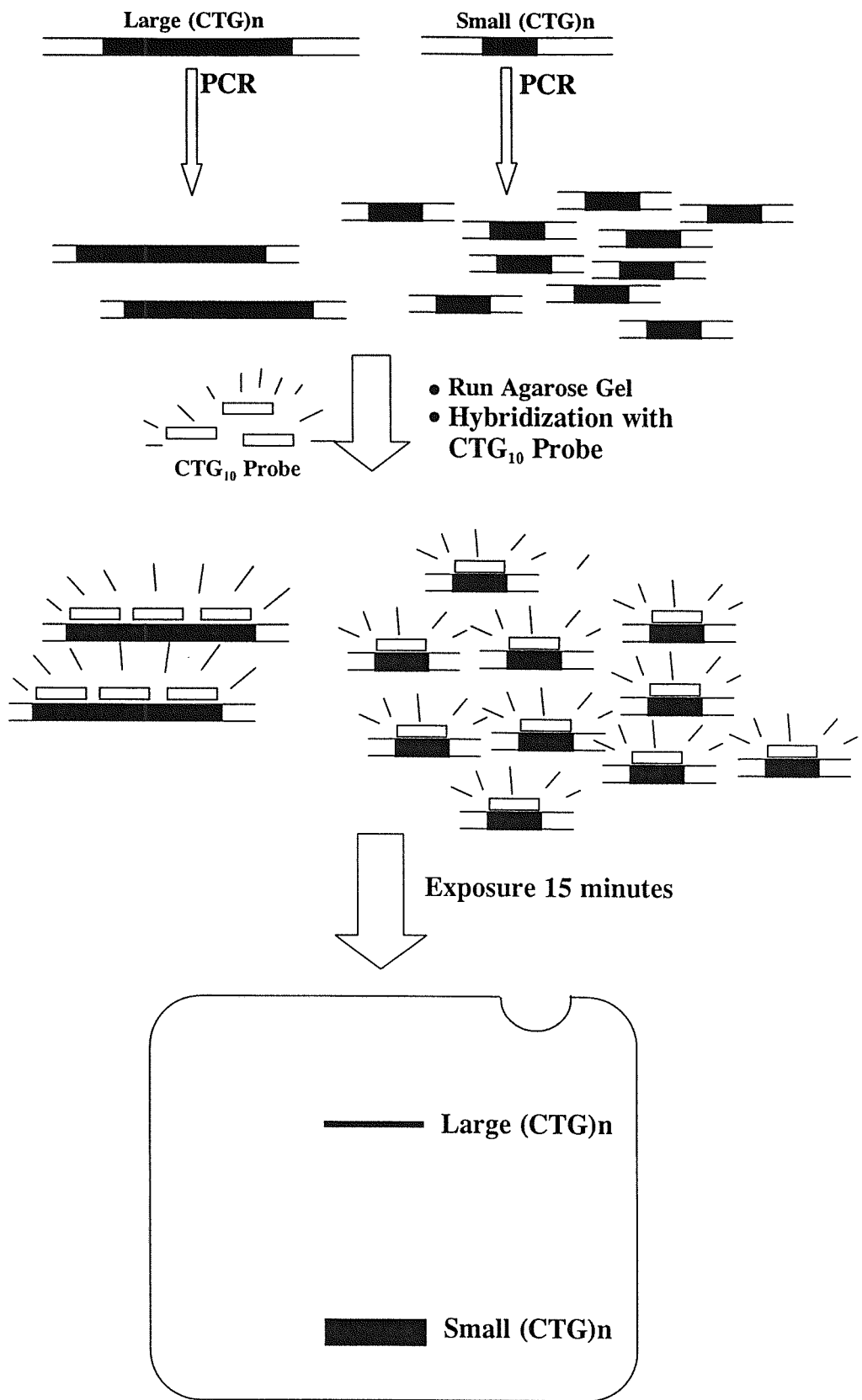
圖八 以 10 個細胞進行 FTA-PCR 分析 DM 家族：A 圖為 DM 家族之圖譜，其中六個人的 10 個轉型細胞進行 FTA[®]-PCR 來分析 CTG 重複序列(C 圖)，並經南方點漬法來證明 CTG 重複次數(B 圖)。



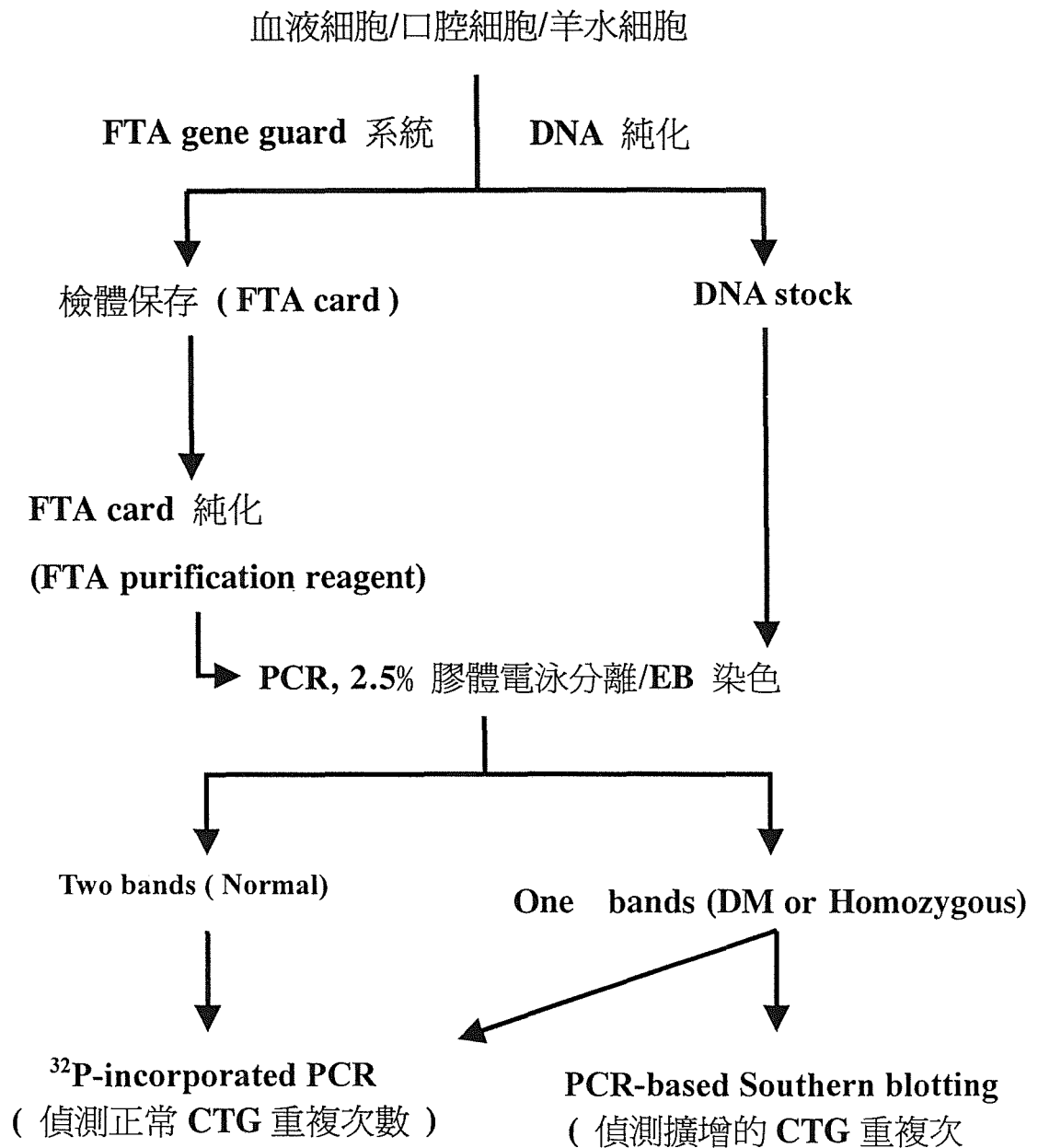
圖九 利用羊水細胞及口腔內膜細胞偵測 CTG 重複次數：
 以 2,000 個於 FTA card 上的羊水細胞及口腔內膜細胞為模版，進行 ³²P-PCR 來偵測 CTG 重複的次數。
 N1-N12 為正常人；P1-P4 為 DM 患者。N1-N7 為羊水細胞(AF cells)；N9-N12 及 P1-P4 則為口腔內膜細胞(buccal cells)。



圖十 偵測羊水及口腔內膜細胞正常及擴增 CTG 重複：利用 10-20 個羊水細胞及口腔細胞的 FTA card 為模版進行 FTA-PCR 來偵測 CTG 重複。N3、N12、P1-P4 和圖十的檢體標示是相同的。



圖十一 PCR based Southern blot 的原理



圖十二 肌強直肌肉萎縮症(DM)之診斷流程

(表一)

Genomic Southern blot 和 PCR-based Southern blot 分析方法之比較：

	Southern blotting	PCR-Based Southern
1.DNA 用量	5 μ g-10 μ g	1ng 至 100pg
2.特異性	高	高, (以(CTG) ₁₀ 探針)
3.標幟	同位素或非放射線	非放射線
4.操作所費時間	3-5 天	2 天
5.壓片時間	2-7 天 (視訊號強弱)	10-20 分鐘
6.敏感性^a	低	高
備註		

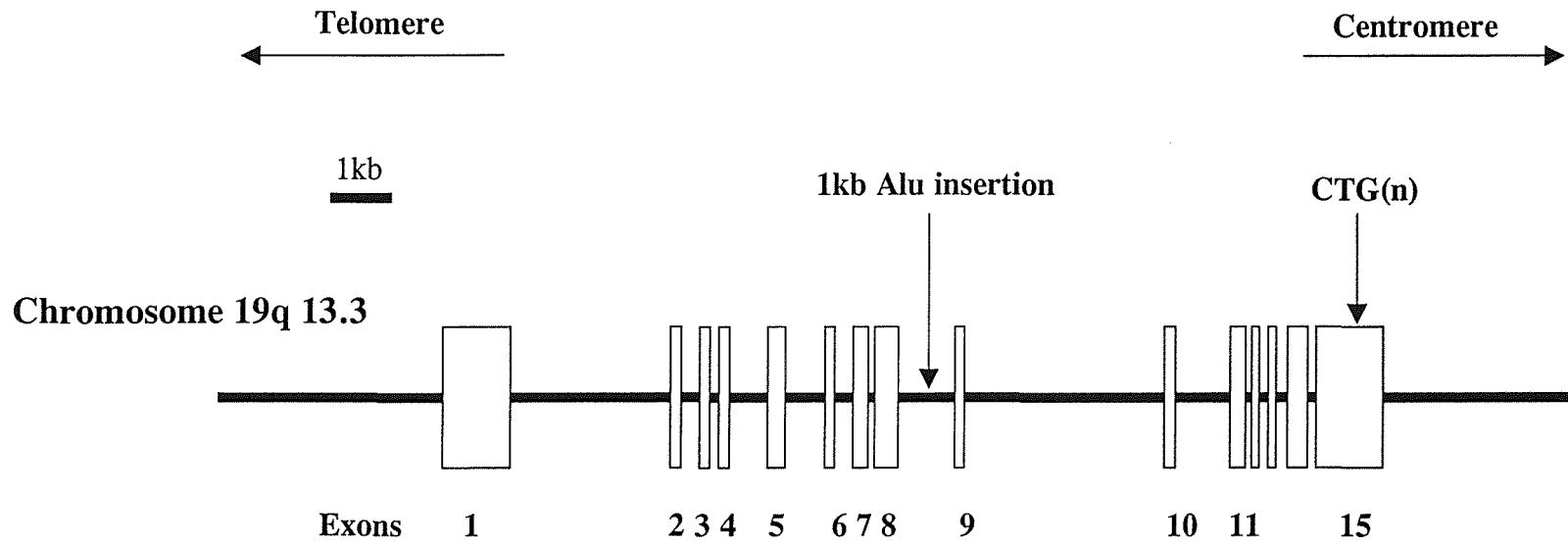
^a1992 年 M. Mahadevan 指出 30%的檢體無法以 Southern blot 分析偵測到突變的 allele，但以 PCR-based Southern blot 方法只有 2/98 的家族偵測不到。

(表二)

FTA[®] Gene Guard System 和傳統血液檢體在保存及 DNA 純化的優點：

	FTA[®] Gene Guard system	Blood
1.受檢者的接受度	高	非常排斥
2.所需檢體的量	約十數個至數十個細胞	1-10 ml 不等
3.安全性	可防止微生物生長	易污染
4.穩定性	至少 2 個月,(最長達 9 年)	不宜存放過久
5.分離 DNA 時間	少於 1 個小時	1-2 天
6.使用範圍	1. PCR-based Southern blot 2. PCR	1. PCR-based Southern blot 2. PCR 3. Southern blotting 4. Transform cell
7.應用	a.大量篩選檢體 b.血液以外的檢體	a.一般檢查
備註		

(附圖一)



Myotonic Dystrophy Protein Kinase (DMPK) 基因圖

Hum. Mol. Genet. 1994, Neville et al.

第二章

台灣地區肌強直型肌肉萎縮症突變途徑之遺傳分析

Genetic analysis of the expansion pathway of
myotonic dystrophy in Taiwan

英文摘要

Myotonic dystrophy (DM) is an inherited, autosomal dominant neuromuscular disease caused by an expansion mutation of a (CTG)_n trinucleotide repeat in the 3' untranslated region (3' UTR) of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) gene. By studying the linkage disequilibrium between Alu polymorphism and various CTG repeat lengths, Imbert et al. proposed that the DM mutations were derived from the pool of alleles with 19-30 CTG repeats, and themselves derived from a very small number of ancient expansions from the major (CTG)₅ allele. However, our data indicated that the expansion pathway could be continuous, that is, the mutation process is random, progressive from (CTG)₅ to (CTG)₅₀. Through the study of the relationship between CTG repeat lengths and several single base polymorphism present flanking the CTG region, our results showed that the DM alleles in Taiwanese population have a specific haplotype, which is the same as that observed in Caucasian population. Since our preliminary result is consistent with the continuous model of CTG expansion, a more complete haplotype analysis including additional markers using (CTG)₁₈₋₄₀ alleles will further elucidate the CTG mutation pathway.

序論

肌強直肌肉萎縮症(DM)是目前已知盛行率最高的一種神經肌肉方面的遺傳疾病,特別是在西歐(2.2-5.5/100,000; Harper, 1989)及日本(5.5/100,000; Davies et al., 1992)地區。高於 99% DM 之發生是因為一段位於染色體 19q13.3 之 CTG 三聯核酸重複序列擴增突變而導致(Harley et al., 1992)。在正常人的染色體內,此一存在於 DMPK 基因 3' UTR 之 CTG 重複序列次數在 5-40 之間,而 DM alleles 之 CTG 重複序列次數則超過 50 (Brook et al., 1992; Fu et al., 1992)。一般而言,DM 患者體內的 CTG 重複序列長度愈長,則其發病年齡愈早,臨床症狀也愈嚴重。可能是由於較長之 CTG 三聯核酸重複序列較不安定的緣故,DM 家族內常呈現“phenomenon of anticipation”,也就是說,子代臨床症狀之出現較親代早且嚴重(Aslanidis et al., 1992; Buxton et al., 1992)。

在 DMPK 基因第八個 intron 距離(CTG) n 重複序列約 5kb 處存在有一 Alu 1kb 的多型性(Alu 1kb insertion/deletion polymorphysim)。根據 Mahadevan 等人對白種人口中 DM alleles

之分析(Mahadevan et al., 1992), Alu 多型性和 DM alleles 有聯鎖不平衡的現象, 也就是說 CTG 擴增皆發生於 Alu 1kb insertion 的 allele, 唯一的例外是非洲奈及利亞的一個 DM 家族(Krahe et al. 1995), 因此推測 DM 的突變很可能是來自於同一個或少數的祖先。基於 DM 與 Alu 多型性連鎖不平衡之關係, Imbert 等人(Imbert et al., 1993)調查正常範圍內 CTG 重複序列數目與 Alu 多型性及距 CTG 序列約 90kb 處之 (CA)_n 雙核酸重複序列多型性之相關性, 結果發現 (CTG)₅, (CTG)₁₀, 及 (CTG)₁₉₋₃₀ 只出現在 Alu+1kb allele, 而 (CTG)₁₁₋₁₃ 則幾乎只出現在 Alu-1kb allele, 並且不同 (CA)_n 雙核酸重複序列長度與 (CTG)₅、(CTG)₁₁₋₁₃、及 (CTG)_{>19} 之 alleles 也有一定程度之聯鎖關係。所以提出 CTG 倍增突變途徑係經由 (CTG)₅₋₁₀, 跳過 (CTG)₁₁₋₁₃, 到 (CTG)₁₉₋₃₀, 而最後至 (CTG)_{>50}, 而且當 (CTG) 序列變長時其突變速率 (mutation rate) 也相對變大。而 Mahadevan 及 Neville (Mahadevan et al., 1993; Neville et al., 1994) 等人則是利用多個位於 CTG 區域兩側附近的單一鹼基多型性組合而成的單套型 (haplotype) 來作分析。結果發現 DM 患者具有一特定的單套型 (DM haplotype), 而由 (CTG)₅₋₃₅ 之 alleles 中有部分和 DM alleles 相同的單套型看來, 突變過程中, (CTG)₅ 也有可能擴增至 (CTG)₁₁₋₁₃ 再到 (CTG)_{>13}, 也就是說, 這是一連續式突變過程。最近,

Tishkoff 等人(Tishkoff et al. 1998)分析了 25 個不同族群共 1,235 個正常人之單套型，發現少數 $(CTG)_{>19}$ 之 alleles 為 Alu deletion，這樣的結果亦說明了 Alu deletion allele 可能並不如預期的穩定。在台灣地區我們分析了 10 名 DM 患者和 53 位正常人 CTG 重複序列數目與單套型的關係，結果顯示台灣地區 DM haplotype 與以前之報告一致，符合”DM 之發生具有 Founder effect”之說法。而研究正常人的單套型之結果顯示多個 $(CTG)_{11-17}$ 之 alleles 具有和 DM alleles 相同的單套型。而且，非 DM haplotype 並不僅出現於 $(CTG)_{11-13}$ 之 alleles，還出現於 $(CTG)_{6-17}$ 。配合臺灣地區正常 CTG 序列長度分佈曲線之資料，顯示原本可能有二個主要不同 CTG 序列長度之 alleles 族群($(CTG)_5$ & $(CTG)_{11-13}$)，它們各有其 haplotype，在演化過程中經突變(expansion & retraction)以及 DNA 重組而產生具有不同 haplotype 之各種 CTG 序列長度之 alleles。可能是因為 genomic compositions 會影響突變之發生，所以具有 DM haplotype 之 alleles(不論其 CTG 序列長度)較易發生擴增突變而致病。總之，我們的結果更加肯定 CTG 序列的擴增突變係連續且漸進式的一種突變過程。

結果

一、單套型分析方法之建立：

所使用的方法是參考 Mahadaven (Mahadevan et al., 1993) 及 Neville (Neville et al., 1994) 等人的方法。此方法係利用 CTG 重複序列兩側約 30kb 內八個單一核酸多型性位置，設計 PCR 反應條件並以核酸限制酶來分析單套型(詳細步驟請見材料與方法；分析結果如表一及圖一)。我們依據核酸限制酶反應情形將每個檢體特別位置之 allele type 可分為三種：一、PCR 產物不被限制酶作用而只出現大片段者為【1, 1】(lane 4)；二、若部分 PCR 產物被限制酶作用而出現一大一小兩個訊號者為【1, 2】(lane 5-6)；三、若全部 PCR 產物被限制酶作用而只出現小片段者即判定為【2, 2】(lane 3)；為方便對照，在旁邊附有未經過限制酶切割的 PCR 產物(lane 2)，而產物的大小則以 100 bp marker 【lane 1】判斷，未切割及切割後的 PCR 產物大小，請參考表一；而 Alu 1kb 的多型性則是以 Alu-PCR 來決定(詳見材料與方法)，可分為 Alu 1kb insrtion 同型合子【1, 1】、Alu 1kb deletion 同型合子【2, 2】及異型合子【1, 2】(附圖一)。

二、DM alleles 之單套型分析：

為了分析台灣地區 DM 單套型的情形，我們以收集到的六個 DM 家族來析 DM allele 的單套型。圖二係以一個 DM 家族為例，利用上述方法經連鎖分析八個多型性後得到之 DM 單套型。經和 Neville 等人(Neville et al., 1994)所統計的結果(附圖三)比較，發現 DM alleles 的單套型均為單套型 A (haplotype A)。此結果顯示 DM 之發生確有"founder effect"。

三、早期 CTG 序列增生突變途徑之分析：

為了解 CTG 重複序列擴增的路徑，所以我們挑選了完全沒有血源關係的 109 個人之檢體，首先進行 CTG 序列長度以及 Alu 多型性分析。接著將 Alu 多型性為同型合子的檢體挑選出來，利用單套型分析中的 Hinf I 及 Fnu4HI 二種限制酶來分析這些檢體的 allele type，最後再將這些多型性標幟均為同型合子之檢體(也就是二個 alleles 具有相同之單套型)紀錄其 CTG 重複次數及單套型(表二)。因為 Alu、Hinf I、及 Fnu4HI 三個多型性組成之單套型主要集中於二種，因此我們將其分成 α 型及 β 型，其中 α 型可代表 DM 單套型(單套型 A 型)，而 β 型則包含了 Neville 等人所分析的單套型 B、C、或 D。結果發現(CTG)₅ alleles 皆為 α 型，而(CTG)₁₁₋₁₄

alleles 主要為β型。但α型分佈於 $(CTG)_5$ ， $(CTG)_{12-14}$ ，以及 $(CTG)_{>14}$ 之alleles，而β型則存在於 $(CTG)_{6-17}$ 之alleles。顯示DM突變 $(CTG_{>50})$ 之發生極可能從 $(CTG)_5$ 之allele開始，並且會經過 $(CTG)_{12-14}$ ，最後再到 $(CTG)_{>16}$ 以上。而含β型之 $(CTG)_{11-14}$ alleles亦不如以往預期穩定，可能發生擴增突變(expansion)到達 CTG_{17} 或減少(retraction mutation)至 CTG_6 。

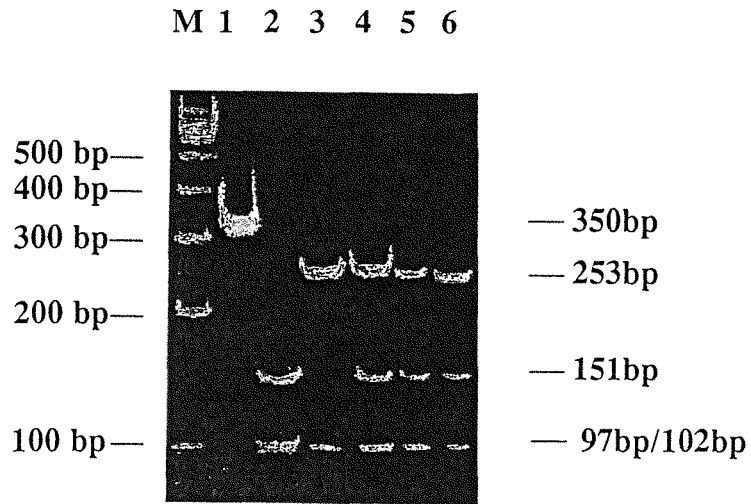
討論

在進行單套型分析時我們係利用存在於 CTG 重複區域兩側的單一鹼基多型性造成之 restriction-site polymorphism (RSP) 作為標幟 (Mahadevan et al., 1993; Neville et al., 1994)。分析結果發現台灣地區的 DM alleles 皆具有同一單套型 (Haplotype A or DM haplotype)。而 CTG 重複次數較高之正常 alleles ((CTG)₂₅ & (CTG)₄₀) 也具有同樣之單套型。其中具有 (CTG)₄₀-allele 者之子代已出現 DM 的臨床症狀，經分析後得知其子代的 CTG 重複次數擴增至 1000 次，而 (CTG)₂₅ 正常人之子代的 CTG 重複次數則維持在 25 次。這些結果顯示 (CTG)_{>50} 之 DM alleles 極可能來自所謂 large-sized 之正常 alleles ((CTG)₃₀₋₅₀)。根據臨床家族資料中 CTG expansion pathway 的文獻報告，有擴增突變之最短 CTG 序列重複次數是 34 (Dow et al. 1997)，而突變途徑大致上可分為二個階段。第一階段發生在正常人體內 (i. e. (CTG)_{n<50})。此階段的擴增以很緩慢的速度進行，如 (CTG)_{34→35} (Dow et al. 1997) 以及 (CTG)_{44→46} (Yamagata et al. 1994)，而且正常 CTG 長度之 alleles 安定性高，因此其突變率非常低。而第二階段發生在 DM carrier 或病人體內 (i. e. (CTG)_{n>50})，此階段的擴增速度很快且伴隨著 CTG 長度異質性 (CTG length heterogeneity)

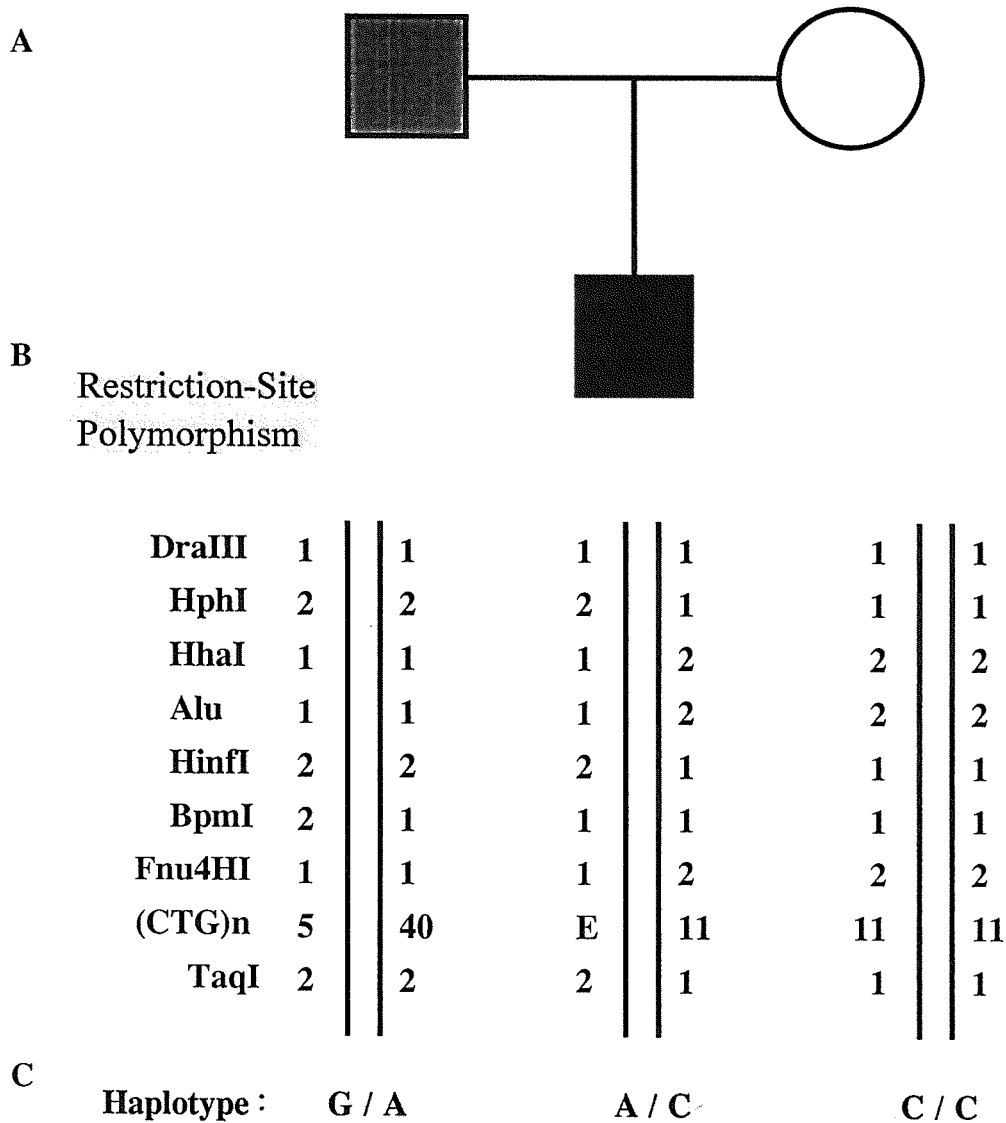
的出現(Barcelo et al. 1993 ;Lavedan et al. 1993)。截至目前為止，雖然有(CTG)₄₆擴增至(CTG)₃₃₀的報告(Yamagata et al. 1994)，但從未有 CTG 長度異質性出現在(CTG)_{<50} 正常個體內的報告。探討(CTG)_{<40} 正常個體內 CTG 長度異質性之研究或將對 CTG 突變途徑之闡釋有所助益。

根據 Imbert 等人之研究(Imbert et al., 1993) (附表二)，Alu 1kb insertion 與 CTG 數目為 5、大於 19 及 DM 的 allele 有非常緊密之連鎖關係，而 Alu 1kb deletion 則主要出現在 CTG 次數為 11-13 之 alleles，因此推測 CTG 的擴增突變是從 5 次跳過 11-13 次直接到 19-30 次，再跳至 30-50 次，最後導致 DM。Neville 等人(Neville et al., 1994)利用 CTG 重複區域兩側的 restriction site polymorphism (RSP)，來觀察這些 RSP 組成之單套型與 CTG 序列長度的關係(附表一)。結果發現 DM alleles 皆具有相同的單套型-單套型 A 型(haplotype A)，而在正常人的單套型中 A 型者大約佔了所有的單套型的 50% ，而且 CTG 次數從 5 次到 35 次均有單套型 A 型，其中(CTG)₅者佔了 73% ，(CTG)_{>19}者佔了 18% ，亦有少部分(CTG)₁₃有單套型 A 型。最近，Tishkoff 等人(Tishkoff et al., 1998)使用三種 RSP 的單套型分析包含了 25 族群的 1,235 個人，結果發現

從 CTG_{5-35} 都有和 DM 一樣的單套型，而且不同的人種其 CTG 重複長度和單套型的關係並非完全一致，因此不同人種可能有不同的增生途徑；另外 Tishkoff 等人也發現在某些人種中也可以見到 $(CTG)_{>19}$ 卻出在 Alu deletion 的 allele 上，所以 Alu deletion 的 allele 也有可能由 $(CTG)_{>19}$ 增加到 $(CTG)_{30-50}$ 及 $(CTG)_{>50}$ 。而我們的結果顯示不論單套型 α 或 β 型均存在 $(CTG)_{11-17}$ 之 alleles，因此我們認為 CTG 重複序列擴增的途徑可能是由 $(CTG)_5$ 漸漸的增加至 $(CTG)_{>19}$ ，並不會跨過 $(CTG)_{11-14}$ 的區域；而且 Alu deletion allele (單套型 β 型) 者也很可能會增生到 $(CTG)_{>19}$ 。此外，我們分析的結果顯示正常人中約有 1% $(CTG)_{>19}$ 之 alleles，因此台灣地區 DM 之發生途徑有可能是經由漸進、連續之方式。未來經由更大規模之篩選及單套型分析，希望未來能對台灣地區 DM 之發生途徑有更深入之瞭解。



圖一 **Hinf I-Restriction-site polymorphism (RSP)**: 利用引子 458/424 所得到的 PCR 產物，經由 **Hinf I** 限制酶的切割後，切割片段則以膠體電泳來分離，lane 1 為未經切割的 350bp PCR 產物，具有 253bp 產物者為 allele 1，具 151 bp 產物則為 allele 2 (A 圖)；所有產物的大小是以 100 bp marker 為準(M)。



圖二 肌強直肌肉萎縮症的單套型：(圖 A)為一個肌強直肌肉萎縮症的家庭圖譜，灰色表示帶因者，黑色實心表示 DM 患者，空心表示正常人。將多組的 RSP 經聯鎖分析可以得到單套型的組合(圖 B)，數字 1、2 表示 RSP 的 allele type，E 表示擴增的 CTG 重複序列。(圖 C) 表示其所屬之單套型。

(表一)

Linkage Analysis Summary

	<i>Dra</i> III	<i>Hph</i> I	<i>Hha</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Bpm</i> I	<i>Fnu</i> 4HI	<i>Taq</i> I
PCR Primer	F: 839 R: 823	F: 463 R: 600	F: 445 R: 42	F: 458 R: 424	F: 458 R: 424	F: 473 R: 474	F: 565 R: 564
PCR Product	183bp	334bp	544bp	350bp	350bp	428bp	676bp
Allele 1	183bp	189bp + 145bp	491bp + 53bp	253bp	350bp	282bp +	676bp
Allele 2	158bp + 25bp	189bp + 124bp + 21bp	419bp + 72bp + 53bp	151bp + 102bp	299bp + 51bp	155bp + 127bp +	574bp + 102bp
Location In DMPK	Telomere to exon 1	Intron 4	Intron 5	Intron 9	Exon 10	Intron 11	15kb centro- meric
Annealing T _m	59°C	59°C	59°C	55°C	55°C	55°C	59°C

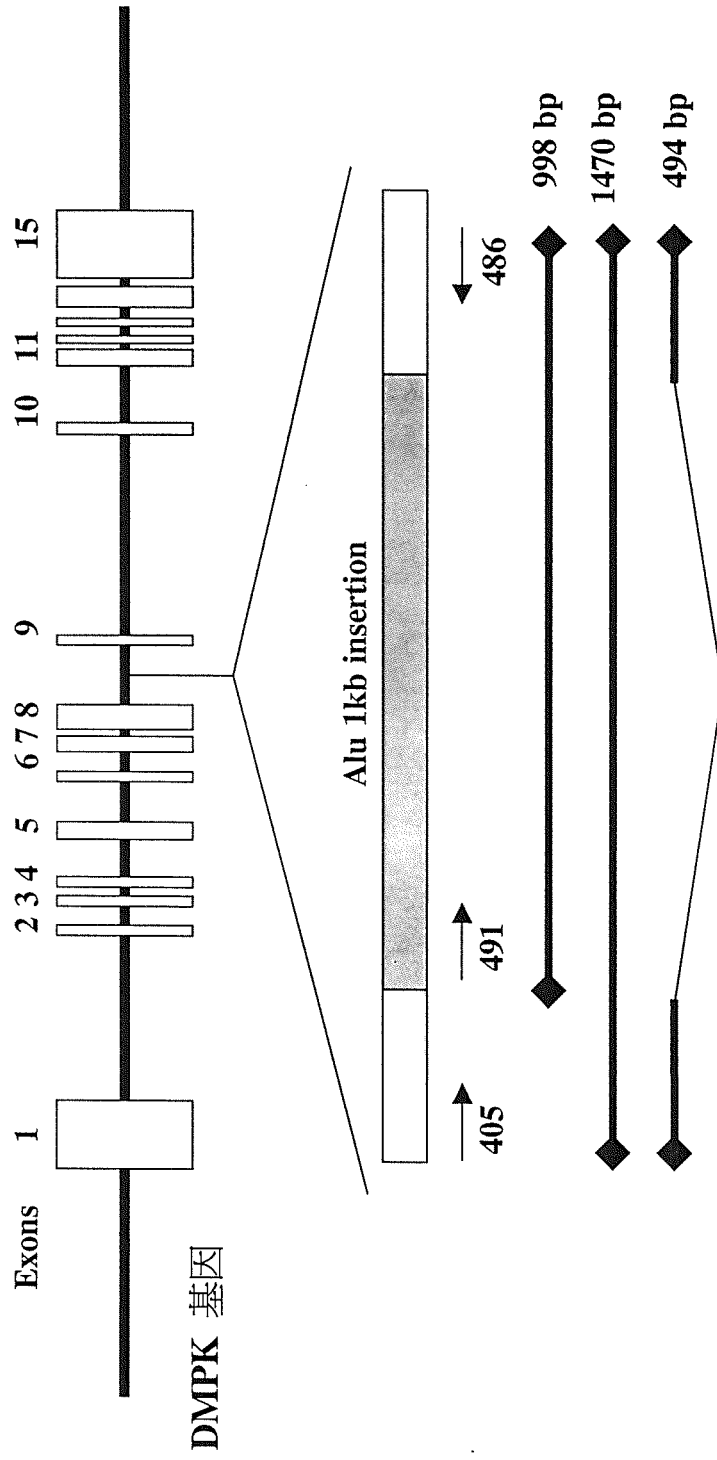
(表二) 台灣地區 CTG 重複次數和單套型相關性之分析

(CTG)n	Haplotype α No. of chromosomes	Haplotype β No. of chromosomes
5	19	
6		1
7		1
8		2
9		
10		2
11		11
12	2	42
13	2	16
14	1	12
15		3
16		2
17	2	2
25	1	
40	1	
Expansion	10	
Total	38	94

NOTE : Haplotype α : (Alu 1kb/ HinfI/ Fnu4HI) -> (1/ 2/ 1)

Haplotype β : (Alu 1kb/ HinfI/ Fnu4HI) -> (2/ 1/ 2)

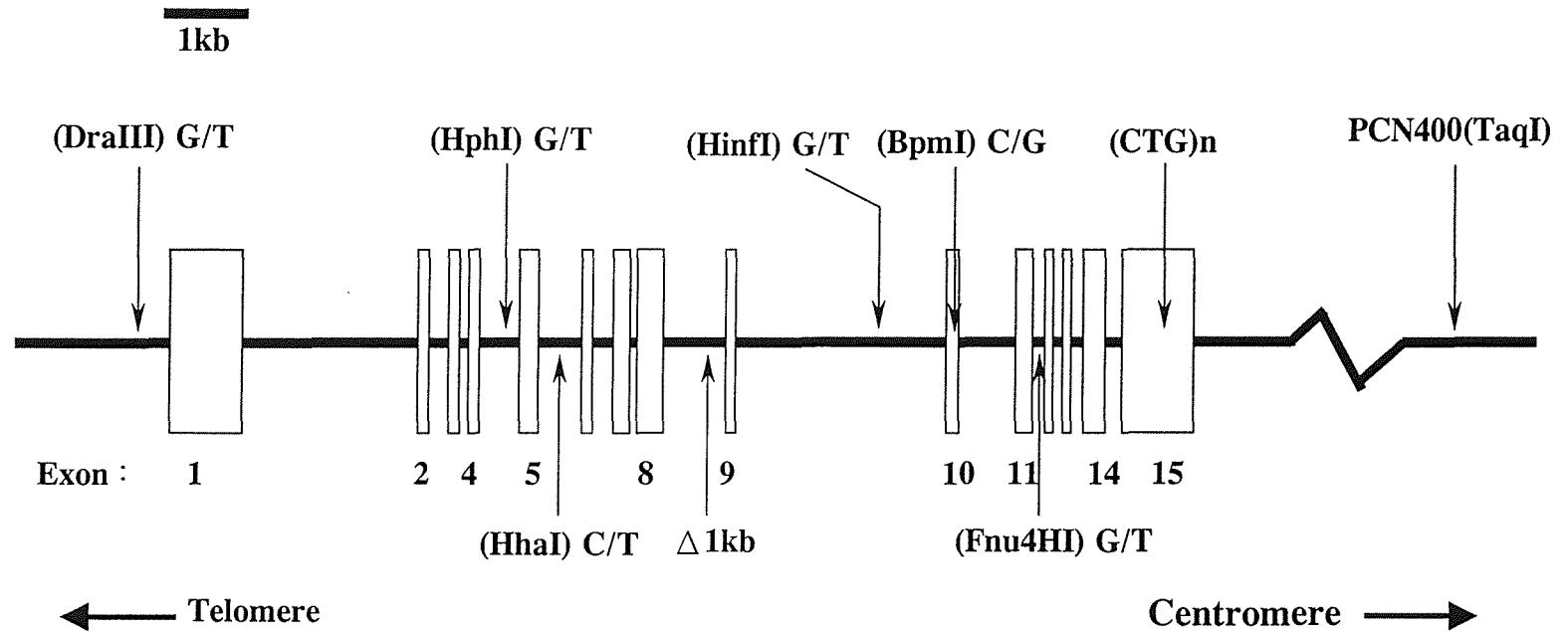
(附圖一)



Alu-PCR 引子的相對位置圖

順式引子：405、491 及反式引子：486

(附圖二)



Restriction-Site Polymorphism (RSP)

RSP 於 DMPK 的相關位置

Hum. Mol. Genet. 1994, Neville et al.

(附圖三)

Sequence polymorphism									
Haplotype	DraIII (G/T)	HphI (G/T)	HhaI (C/T)	Alu+/- Δ 1kb	HinfI (G/T)	BpmI (C/G)	Fnu4HI (G/T)	TaqI (D19S463)	Haplotype Frequency
DM	1	2	1	1	2	2	1	2	100%
A	1	2	1	1	2	2	1	2	49%
B	2	2	2	2	1	2	2	1	27%
C	1	1	2	2	1	1	2	1	16%
D	1	2	2	2	1	2	2	1	8%
E	2	2	2	2	1	2	2	2	<1%
F	1	1	2	2	1	2	2	1	<1%
G	1	2	1	1	2	1	1	2	<1%
H	2	2	2	2	2	2	2	2	<1%
I	1	1	2	2	2	2	1	1	<1%

Haplotype	A	B	C	D
(CTG)n repeat	5-35	11-14	11-14	11-14

Hum. Mol. Genet. 1994, Neville et al.

(附表一)

Association of (CTG)_n alleles and the Alu 1kb insertion/deletion polymorphism

CTG repeats	Allele 1 number (insertion)	Allele 2 number (deletion)
5	104	
6		1
7	1	
10	4	
11		45
12		42
13	1	43
14	11	7
15		2
16	1	
17	1	
19	1	
20	9	
21	3	
22	2	
23	1	
24	3	
25	3	
26	3	
27	3	
28	1	
30	2	
36	1	
Total	155	140

nature genetics 1993, Imbert et al .

材料和方法

1. 檢體的收集及淋巴球細胞的轉型

正常人血液檢體的收集係透過自願的方式，每位自願者抽取約 1ml，取得 DNA 後，以聚合酶連鎖反應(PCR)和南方點漬法(Southern blot analysis)進行分析。DM 病人及其家屬檢體的收集係透過醫師的合作，跟病人及其家屬溝通、並取得同意後，在醫護人員陪同下到其家裡抽取約 10ml 血液或刮取少許口腔細胞以進行分析。或者，醫師取得檢體後直接將血液或血液 DNA 送給我們分析。由於檢體收集不易，我們儘可能將 DM 病人及其家屬之淋巴球細胞轉型為 lymphoblastoid cell line，以備將來分析之用。淋巴球細胞轉型之方法係參考 Neitzel 的報告修改而來(Neitzel, 1986)。詳細步驟呈述如下：7.5ml 含有 heparin 之血液，用 1XPBS 等量稀釋，同時準備 15ml 之離心管並加入欲注入之 1XPBS 稀釋後血液量 1/2 體積的 Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech)。接者緩緩加入稀釋血液，在 1,500rpm 下離心 30 分鐘之後(離心機：HITACHI 05P-21)，將 buffy coat(離心後分成四層，此為灰白色之第二層)置於新的離心管並加入 10ml 的 1XPBS 清洗(上下 pipeting 3-5 次)，離心 1,500rpm，10 分鐘之後，倒

掉上清液再重覆此一清洗步驟。然後，倒掉上清液並視 pellet 之大小加入至少 2ml 之 transformation medium。此 medium 的成份如下：2 μ g/ml cyclosporin A (Sandoz)+1/7(v/v)filtered Epstein-Barr virus (EBV: ATCC 1395-8)+RPMI medium(RPMI 1640+20% FBS+1% L-glutamine+1% PSN)。混合均勻後再將約 2ml 含淋巴球細胞的 medium 轉置到直徑為 16mm 之 well 中(每一 plate dish(NUNC)有 24 個 wells)，放入 incubator 中(37°C, 5% CO₂)培養。3 天後，加入 2-3 點(用 26G 的針頭)的 PHA(Phytohemagglutinin; GIBCO)；再四天後，培養液更換為 maintenance medium(1 μ g/ml cyclosporin A+RPMI medium)。每七天換一次 medium，視細胞生長狀況(colony 之多寡)，2-4 個禮拜後將細胞轉置到 25cm² flask 中繼續培養。

取得的羊水細胞約 10-20ml，將其分裝到 10ml 的離心管，以 1,500rpm 離心 10 分鐘(centrifuge 05P-21, Hitachi)，倒掉上層液後，加入 5ml 的 Bio-AMF-1 media 培養液(Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek)，並換至培養瓶並於 37°C, 5% CO₂ 培養箱中培養，5 天後換掉舊的培養液，加入 5ml 新的培養液，往後每 3-4 天置換新的培養液，一直培養至細胞數夠使用為止，回收細胞前一天需換上新的培養液。接著將培養液倒掉，再

以 5ml 1XHBSS 清洗培養瓶 2 次，將 1XHBSS 倒掉後，加入 0.5ml trypsin-EDTA 並置於 37°C 培養箱作用數分後(視細胞脫離培養冊的情形而定，通常在 5 分鐘以內)，加入 2ml 培養液終止 trypsin-EDTA 的作用，取出細胞後於 phase contrast microscope (Nikon)下做細胞計數，並計算細胞總數，之後將細胞溶成 2000 cells/ μ l 的濃度，再將此濃度的細胞懸浮液稀釋為 20 cells/ μ l、100 cells/ μ l 及 200 cells/ μ l，並取 1 μ l 不同濃度的細胞懸浮液滴於 FTA card 上，每一個濃度可以多點 10-20 點保存。

口腔細胞的處理方式，係先請受檢者以牙籤於口腔內壁輕輕地來回刮五回，再將牙籤置含 500 μ l 1XPBS 的離心管壁來回磨擦使口腔細胞懸浮於 1XPBS 中，再以 phase contrast microscope 計算細胞數目及細胞數總和，把細胞以 10,000rpm 離心沉澱，再加入 1XPBS 使細胞濃度成為 2000 cells/ μ l，再稀釋成 200 cells/ μ l 及 20cells/ μ l 兩種濃度，接著取 1 μ l 不同濃度的溶液滴於 FTA card，每一個濃度可滴 10 至 20 點保存，以方便往後使用。或者將含口腔細胞的牙籤直接塗於 FTA card 上，不過由於如止一來便無法估計細胞的數目，因此對於實驗上又多一個不可控制的變數，所以我們主要還是使用前述的方法來採取檢體。

2. Genomic DNA 的純化：

方法一：利用 Genomic DNA isolation kit (Puregene, Gentra system)。此方法較省時、簡單，可很快取得 DNA 以進行以下的實驗。操作方法乃參照 Genomic DNA isolation kit (Puregene, Gentra system)所附的操作手冊。

方法二：參考 Maniatis 的方法並做一些修改 (Maniatis et al. 1988)，以含有 heparin 的針筒抽血 5ml 混合均勻後，加入相對量的 solution I (10Mm Tris pH:7.6 ; 10mM KCl ; 10Mm MgCl₂)。然後加入 120μl Nonidet P40 (NP-40, Sigma)，並混合均勻。以 2000rpm 離心 10 分鐘後，移去上層液，加入 solution I 至 10ml。以 2000rpm 離心 10 分鐘，吸去上層液。加入 300μl solution I，混合均勻後轉換到 1.5ml 離心管。加入 350 μl solution II (10mM Tris pH:7.6 ; 10mM MgCl₂ ; 1% SDS ; 4mM EDTA)，在 60°C 至 65°C 水浴至溶液澄清為止。待細胞核溶解後，加入 700 μl 的 phenol (含 0.2% β-mercaptoethanol)粹取一次。再以 700 μl 的 phenol/chloroform (含 0.2% β-mercaptoethanol)粹取一次。最後以 700ml 的 chloroform 粹取二次。然後加入 0.8 倍體積的異丙醇(isopropanol)來沉澱 DNA，經 70% 酒精洗去多餘的鹽類一次，乾燥後，將 DNA 溶於 200μl TE buffer，再以光度比色儀

(Spectrophotometer ; DU-640 , Beckman)測波長 260nm 的相對吸光值及 260nm/280nm 吸光比值，來得知 DNA 的質與量。

3. CTG 三聯核苷酸重複序列長度之偵測：

A. 正常 allele 之 CTG 三聯核苷酸重複序列數目之偵測-以 ^{32}P -incorporated PCR 方法行之。Primer 的設計和反應條件係參考 Monckton et al. (1995)及 Monckton et al. (1997)的方法。在 20 μl 的 PCR 反應溶液中，含有 1.5mM MgCl_2 , 0.2mM dNTP, 0.5 μM primer, 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH9.0), 0.1% Triton X-100, 4 μCi 的 α -[^{32}P]dCTP(10mCi/ml), 2.5% DMSO 和 0.4unit 的 Pro-Taq DNA polymerase (PROtech technology)。將此反應溶液置於迴反應器(Perkin-Elmer 480)中，反應條件為 96 $^{\circ}\text{C}$, 5min, 96 $^{\circ}\text{C}$, 45sec/ 62 $^{\circ}\text{C}$, 45sec/ 72 $^{\circ}\text{C}$, 1min 30sec 35cycles, 72 $^{\circ}\text{C}$, 10min。所使用之 forward primer 為 primer DM-H: 5'-TCTCCGCCAGCTCCAGTCC-3'; reverse primer 為 primer DM-ER: 5'-AAATGGTCTGTGATCCCCC-3'。PCR 反應產物經加熱 95 $^{\circ}\text{C}$, 5分鐘後以定序膠體電泳分析(Bio-Rad. acylamide : bisacylamide=19 : 1 並含 7M urea)，電泳時所使用的功率為 60W，用來分離 DNA 片段的時間為 1 小時 40 分

鐘，完成後將膠體浸置於 5% methanol 及 5% acetic acid 溶液中固定(fix)15 分鐘，以真空乾燥機(MODEL 583 GEL DRYER, BIO-RAD)乾燥膠體後並壓片，並視訊號強弱調整壓片時間，再以 autoradiography (BIOMAX-MS, Kodark)上的訊號判讀產物大小，經與 DNA marker sequence(Pgem-3Zf(-))比對後即可決定 CTG 重複的數目。

B. DM allele 內 CTG 三聯核苷酸重複序列長度，傳統上主要以南方點漬法(Southern blot analysis)來偵測大範圍 CTG 序列的擴增突變。其步驟詳述如下：在 200 μ l 反應溶液，加入 5 μ g-10 μ g 的 genomic DNA 及 100unit 的限制酶 EcoRI，於 37 $^{\circ}$ C 中作用 16-20 小時。在作用完全之反應溶液中加入 500 μ l 的 98% 酒精後，置於-20 $^{\circ}$ C，經 3-4 小時，於桌上型離心機 (centrifuge 5415c, Eppendorf)離心 1,200rpm 10 分鐘，去除上層液之後，將沉澱之 DNA pellet 置於室溫中乾燥 3-5 分鐘，再將 DNA 溶於 30 μ l TE buffer。接著以 0.8% 洋菜膠 (agarose gel) 在 40 伏特的電壓下分離 16 小時，以投影片將 marker 位置記錄下來，並拍照存檔。接著以 0.5M NaOH/1.5M NaCl 處理洋菜膠 45 分鐘，使 DNA 變性，再以 0.5M Tris(pH7.4)/1.5M NaCl 45 分鐘來中和膠體。接著以 10XSSC

將變性之 DNA 轉移至 nitrocellulose membrane (CELLULOSENITRAT(E), Schleicher & Schuell), 此步驟至少需 18 小時。將 DNA 以 UV-cross link (1.5 焦耳/每平方公分) 固定在 membrane 之後, 將 membrane 置於含 single-stranded salmon sperm DNA(50 μ g/ml) 的 pre-hybridization 溶液中, 在 42 $^{\circ}$ C 下作用 4-6 小時。DNA probe 以 primer-a-gene kit (Promega) 和 α -[32 P]dCTP 來標幟(label), probe 則是以 primer X 及 primer DR 經 PCR 並且經過純化之方式獲得, 標幟方式係參照套組所附的操作手冊, 標幟完成後, 再以 column 來分離探針及多餘的放射性同位素。Column 的製作過程如下: 以 1ml 的針筒填上一層玻璃棉(glass wool), 再填入經 TE buffer(pH:8.0) 處理過的 Sephadex G50 樹脂, 待樹脂沉澱到達特定高度時, 將針筒置於離心機(HIMAC CENTRIFUGE, HITACHI) 以 1,000rpm 離心 1 分鐘, 以取得高度在 0.8ml 左右之 Sephadex G50 column, 取出過濾液(含標幟好的探針) 並以 95 $^{\circ}$ C, 5 分鐘將探針變性, 再將變性的探針加入雜交溶液中。雜交溶液(hybridization solution) 中則含有 50% formamide, 5X SSC, 5X Denhardt's solution, 0.02M Na₂PO₄, 10% dextran sulfate 和 100 μ g/ml single-stranded DNA。雜交反應在 42

°C 下用 16-20 小時。清洗的步驟分為冷洗及熱洗；冷洗係於含 2X SSC 和 0.1% SDS 溶液，在室溫下清洗二次，每次各 15 分鐘。熱洗則在含 0.2X SSC 和 0.1% SDS 溶液，59°C 下清洗二次，每次 30 分鐘，若背景質(background)小於 3cps(count per second)即可，將 membrane 放在 3MM 紙上，並置於通風櫥中使其乾燥後並壓片。最後以 autoradiography(BIOMAX-MS, Kodark)的結果來判定 CTG 是否有倍增突變及判定擴增的大小。引子序列為 primer X：5'-CTCCGGGATCTCCCTAGATAACCTCC-3' 及 primer DR：5'-CTTCCCAGGCCTGCAGTTTGCCCATC-3'。

4. FTA-PCR 分析：

此一系統係利用 FTA gene guard system (Life Technologies) 來收集、保存檢體，以及純化 DNA，方式是將檢體固著在 FTA 濾紙後，並純化 FTA card 作為模版，進行聚合酶連鎖反應以放大 CTG 三聯核苷酸重複區域。其中，FTA gene guard system 包括 FTA card 及 FTA purification reagent。FTA card 內含強力的變性物質 (denatures) 可防止微生物的生長，避免核酸酶、氧、以及紫外

線的傷害，因此可以長時間保持良好的 DNA 品質。操作時，只要先將 1-2 μ l 血液檢體、少量的口腔細胞、羊水細胞、或含已轉型之淋巴球細胞之溶液滴至 FTA card 上，於室溫下，讓濾紙上的溶液乾燥至少一個小時以上。若將含檢體之 FTA card 覆以膠膜 (plastic wrap)，在室溫下可保存至少二個月以上，假如將 FTA card 置於乾燥器 (desiccator) 內，甚至可以保存數年之久，而且不影響 PCR 分析的結果。接著以 1.2mm 的打洞器 (HARRIS MICRO-PUNCH™ from Life Technologies) 將含檢體之濾紙打出，置於 PCR amplification tube 內。用 200 μ l FTA purification reagent 清洗三次後再用 200 μ l Tris-EDTA (10mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1mM EDTA) 清洗二次，乾燥至少一個小時後，加入 20 μ l PCR 反應溶液即可進反應。

5. PCR-based Southern blot :

首先，先進行一 PCR 反應，而 PCR 反應所需模版係從血液檢體或細胞抽取之 DNA，或是純化過已固在 FTA card 上的 DNA。在 20 μ l PCR 反應溶液中，含有 1XGC 2 PCR Buffer, 1M GC-Melt™, 1XdNTP, 0.6 μ l Advantage-GC 2 Polymerase mix (Clotech) 及

0.5 μ M primer (H/ER 或 H/DR)。將此反應溶液置於迴溫反應器 (Perkin-Elmer 9600) 中，反應之條件為 94 $^{\circ}$ C 3min, 94 $^{\circ}$ C 20sec/68 $^{\circ}$ C 5min 35cycles, 68 $^{\circ}$ C 5min，之後保持在 15 $^{\circ}$ C。接著 PCR 產物之 Southern blot 之分析，乃利用非放射性的 Quick-Light detection system (Life Codes)。其步驟簡述如下：首先將 PCR 產物以 1.5% 洋菜膠分離，後轉移至 filter membrane (GeneScreen Plus, NENTM Life Science)；filter membrane 與探針 (alkaline phosphatase-coupled (CTG)₁₀) 於 42 $^{\circ}$ C 做雜交，再依操作手冊條件清洗。接著將 Lumi-Phos 480 dioxetane solution 均勻噴灑在 filter membrane 上，用 development folder 封好，等待 30 分鐘後壓片 (expose 約 15 分鐘即可)，以 autoradiography (X-Omat Blue XB-1, Kodak) 來計算 CTG 重複擴增的大小，所得之結果再和南方點漬法之結果比對，加以証實。

6. Alu+/- 1kb 多型性 (polymorphism) 之判定：

位於 DMPK 基因 intron 8 內有 1kb Alu insertion/deletion 多型性 (polymorphism) 的現象，為確定台灣地區 DM 患者其 CTG 之

倍增突變是否發生於 Alu+ 1kb insertion 之 allele，我們利用 PCR 的方法(稱為 Alu-PCR)來偵測。此法參考 Mahadevan 等人之作法(Mahadevan et al. 1993)，所用之 primer 包含二個 forward primer(primer 405 位於 1kb Alu insertion 之 upstream，以及 primer 491 位於 1kb Alu insertion 內)和一個 reverse primer(primer 486 位於 1kb Alu insertion 之 downstream)(如附圖一)。在 20 μ l 的 PCR 反應溶液中，含有 100-200ng 的 genomic DNA, 1.5mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 0.5 μ M primer 以及 0.4unit 的 pro-Taq 聚合酶。將此反應溶液置於迴溫反應器(Perkin-Elmer 2400)中，反應之條件為 94 $^{\circ}$ C, 4min, 94 $^{\circ}$ C, 15sec/ 60 $^{\circ}$ C, 1min 30sec/ 72 $^{\circ}$ C, 2min 40cycles, 72 $^{\circ}$ C, 10min。PCR 產物以 1.5% 洋菜膠來分離，以 ethidium bromide(EB)染色後並以 Polaroid type 667 拍照存檔。以 primers 405/486 放大可得 1470bp(含有 Alu 1kb insertion)或 494bp(不含 Alu 1kb insertion)的 PCR 產物(如附圖一)。Primer 的序列如下：primer 405, 5'-CTGTATACTCAGCTACTAGGGT-3'；primer 491, 5'-AAATAGGCTGGACCGCGG-3'；primer 486, 5'-CTCAGGGGTTATCTAAAGTGGC。

7. 正常及突變 DM alleles 單套型分析(Haplotype analysis)

在 DM locus 附近，有多個多型性限制酶切點 (restriction-site polymorphism, RSP) 存在。為了調查這些多型性和正常及突變 DM allele 之間的關係，我們將利用聚合酶連鎖反應的方法，在存有多型性的鹼基附近區域合成 primer，經 PCR 放大後，將 PCR 產物純化，再以限制酶來分析(程序請參考 Neville et al. 1994)。經由這樣的分析可將這些多型性分為兩種，若 PCR 產物不會被限制酶切割者稱之為 " allele 1 "，而會被切割者則稱為 " allele 2 "。而方法第 6 點中的 Alu 1kb insertion /deletion 也包含於此單套型的分析中，其中含 Alu 1kb insertion 者為 allele 1，不含 Alu 1kb insertion 者為 allele 2，此方法乃參考 Mahadevan 及 Neville 等人的方法(Mahadevan et al. 1993 及 Neville et al. 1994)。所使用的限制酶包括了：HinfI、BpmI、Fnu4HI、HhaI、DraIII、HphI 及 TaqI 共七種，其個自所使用的引子如下：DraIII 組：primer 839 (5'-AGG GCC CCT CAT CAA AGT CCA CGG TGT-3')、primer 823 (5'-ACG GTT CTG CAG AGT GGA AGT-3')；HphI 組：primer 463 (5'-CCG TCT CCA CTC TGT CTC

ACT-3')、primer 600 (5'-GCT CTT GTC CCT CTT CCT AGG C-3')；
BpmI 組；primer 458 (5'-CTG CAG AAG GTT TAG AAA GAG C-3')、
424 (5' TCA TCC TGT GGG ACA CCG AGG 3')；Fnu4HI：primer 473
(5'-AGC CAC AGG CAG CCT TAA GC-3')、474 (5' TCC GGG GAA GGG
GAC ACA TGA 3')；TaqI 組 primer 565 (5'-TCT AGA ACA CAT GGG
AAA TAA TGT-3')、564 (5'-ATC TAA ATG CTA AGT GGC AAG TGT-
3')；HhaI 組 primer 445 (5'-GAC CTG CTG ACA TGC TGA GC-3')、
472 (5'-GTG CCT TCC ATC CCT CAT CAG-3')；HinfI 組 primer 458
(5'-CTG CAG AAG GTT TAG AAA GAG C-3')、424 (5'-TCA TCC TGT GGG
ACA CCG AGG-3')，引子的鹼基下方若有“-”者，表示此鹼基無法
和模版的鹼基配對(mismatch)。而 PCR 所用之條件：HinfI、BpmI
及 Fnu4HI 三組之 PCR 條件相同為：96°C 4min, 96°C 30sec/ 55
°C 1min/ 72°C 1.5min 40cycles, 72°C 5min；而 HhaI, DraIII,
HphI, 及 TaqI 四組則使用同一個條件為：96°C 4min, 94°C
30sec/59°C 1min/72°C 1.5min 40cycle, 72°C 5min。而 PCR 反
應溶液所含的成分請參照方法第 6 點。至於 PCR 產物的純化則是
使用套組(伯森 PCRclean Kit)方法請參照操作手冊，最後溶於
10µl 的滅菌過的 d₂H₂O₂。接著進行限制酶反應，反應溶液中含 1X
reaction buffer 及 2unit 的限制酶並加入上述的粹取物至

10 μ l，和加入一滴滅過菌的礦物油，置於適當的溫度中至隔天，以 4% 的聚丙醯膠 (polyacrylamide gel (acrylamide : bisacrylamide=19 : 1)) 於直立式電泳槽 (Model V16, GIBCOL BRL, LIFE TECHNOLOGIES) 中分離限制酶所作用的產物，並以 ethidiumbromide 染色並拍照存檔，分析電泳結果。最後需將親代和子代 RSP 的結果相互比對及組合，經過聯鎖 (linkage analysis) 分析，才能進一步判讀出單套型的結果。再和 1994 年 Neville 單套型的結果比對，看看是屬於那一型的單套型。

8. CTG 重複序列長度異質性之確定：

如果以 ^{32}P -PCR 結果若出現兩個以的不同 CTG 數目的 allele 存在同一個個體內，則進一步將其選殖出來並利用 DNA 定序來証實。首先我們以非放射性的 PCR 來將欲選殖的片段放大，再以 2% 的洋菜膠分開不同片段的 PCR 產物，以 EB 來染色，在長波的手提紫外燈 (MODEL UVL-56, San Gabriel) 下，將欲選殖的片段從洋菜膠上挖下來，並以套組 (Gel Extraction Kit/300, JETsorb, GENOMED) 將 DNA 從洋菜膠中回收，再將這些回收的產物和載體 (TA-vector (pGEM-T Easy Vector System, Promega)) 接

在一起後，送入 competent cell(XLI-blue)中，詳細步驟如下：
將剛從-80°C拿出來的 competent cell 置於冰上待其融解後，加入 1/2 的 DNA 及載體接合反應溶液至 competent cell 中(體積勿超過 10 μ l)，並混合均勻，再置於冰上 30 分鐘，接著放在 42°C 水浴中 90 秒，迅速放回冰上等待 1 分鐘後加入 900 μ l 的 LB，並於 37°C 培養 45 分鐘至 1 個小時，再以 1,000rpm 離心 3 分鐘，吸去 800 μ l 的 LB 後，將含菌的溶液混合均勻並加入 10 μ l 50mg/ml ampicillin, 10 μ l 100mM IPTG 及 25 μ l 4% X-Gal.，取 100 μ l 菌液塗在 LB 的培養皿，置於 37°C 培養 12 至 16 小時。第二天時，從培養皿上挑選白色(無色)的菌落至 2ml 的 LB 在 37°C 培養 18 至 20 小時，將質體 DNA 抽取出來，以限制酶來確定欲序的 DNA 是否有插入載體中，若有則以順式或反式的 M13(lacZ)為引子來定序(AmpliCycle Sequencing Kit, Perkin Elmer)，壓片後，從 autoradiography(BIOMAX MR, Kodark)光片上讀取序列並算出 CTG 重複的次數。Forward M13 (lacZ) primer : 5'-GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA-3' ; reverse M13 (lacZ) PRIMER : 5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'。

質體 DNA 的純化(mini preparation) : 2ml 菌液中取 1ml 至 1.5ml 的小離心管，用桌上型離心機以最高速離心 20 秒，將上

層液吸乾淨，加入 200 μ l 的 solution I(50mM glucose, 25mM Tris-cl pH:8.0, 10mM EDTA pH:8.0)並混合均勻，加入 200 μ l 新泡的 solution II(0.2N NOH, 10% SDS)後輕輕來回搖動 7 次，待作用 3-5 分鐘，再加入 200 μ l 的 solution III(5M potassium acetate 60ml+glacial acetate acid 11.5ml/100ml)輕輕搖動 7 次，待作用 3-5 分鐘。以 1,5000rpm 離心 10 分鐘，吸取 500 μ l 的上層液至新的離心管，並加入 500 μ l 的 phrenol/CHCl₃，劇烈振盪 30 秒，再以 1,5000rpm 離心 2 分鐘。小心的吸取上層液 450 μ l 至另一新的離心管後，加入 100% 酒精 1ml 來回搖動數次，在 4 $^{\circ}$ C 下離心 5 分鐘，倒去上清液，並加入 200 μ l 70% 的酒精洗掉多餘的鹽類後，最後乾燥之並加入含 RNase(50ng/ μ l)的水。

Competent cell 的製備：取 100 μ l 菌液(stock)到 2ml 含抗生素的 LB 培養液中，以 37 $^{\circ}$ C 培養至隔天，第二天取 1ml 菌液至 50ml LB 培養液中並加入抗生素，37 $^{\circ}$ C 培養至 OD 260 吸光值為 0.6 左右時，以落地式離心機(Model J2-21M, BECKMAN)於 4 $^{\circ}$ C 以 5,000rpm 離心 4 分鐘，倒掉上層液後，並將細菌輕輕拍散，再加入 25ml competent cell solution I (Mops 10mM, RbCl 10mM)，於 4 $^{\circ}$ C 以 5,000rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，加入 25ml competent cell solution II(Mops 100mM, RbCl 10mM, CaCl₂ 50mM)拍散細

菌後，置於冰上 30 分鐘，再以 5,000rpm 在 4°C 離心 5 分鐘，吸去上清液。加入 1.5ml 的 competent cell solution II 將細菌拍散並加入 60% 甘油(glycerol)，將此兩者混合均勻，以每 100 μ l 為單位分裝至 0.5ml 的小離心管內，標示好日期及菌種，放置於 -80°C 的冰箱保存。

參考文獻

- Ashizawa T, and Epstein HF: Ethnic distribution of the myotonic dystrophy gene. *Lancet* 338:642-643, 1991.
- Barcelo JA, Mahadevan MS, Tsilfidis C, MacKenzie AE, and Korneluk RG: Intergenerational stability of the myotonic dystrophy protomutation. *Hum. Mol. Genet.* 2:705-709, 1993.
- Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion J-P, Hudson T, Sohn R, Zelman B, Snell RG, Rundle SA, Crow S, Davies J, Shelbourne P, Buxton J, Johns C, Juvonen V, Johnson K, Harper PS, Shaw DJ, and Housman DE: Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68:799-808, 1992.
- Brown WT: The fragile X: progress toward solving the puzzle. *Am. J. Hum. Genet.* 47:175-180, 1990.
- Buxton J, Shelbourne P, Davies J, Jones C, Tongeren TV, Aslanidis C, de Jong P, Jansen G, Anvret M, Riley B, Williamson B, and Johnson K: Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature* 355:547-548, 1992.
- Cheng S, Barcelo JM, Korneluk RG: Characterization of large CTG repeat expansions in myotonic dystrophy alleles using PCR. *Human Mutation*

7:304-310, 1996.

Davies J, Yamagata H, Shelbourne P, Buxton J, Ogihara T, Nokelainen P, Nakagawa M, Williamson R, Johnson K, Miki T: Comparison of the myotonic dystrophy associated CTG repeat in European and Japanese populations. *J. Med. Genet.* 29:66-769, 1992.

Dow DJ, Rubinsztein DC, Yates JRW, Barton DE, and Ferguson-Smith MA: Instability of normal (CTG)_n alleles in the DM kinase gene. *J. Med. Genet.* 1997.

Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RG, King Jr, Pajnarayan S, Dunne PW, Dubel J, Nasser GA, Ashizawa T, de Jong P, Wieringa B, Korneluk R, Perryman MB, Epstein HF, and Caskey CT: An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255:1256-1258, 1992.

Harley HG, Brook JD, Rundle SA, Crow S, Reardon W, Buckler AJ, Harper PS, Housman D, and Shaw DJ: Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* 355:547-548, 1992.

Harley HG, Rundle SA, MacMillan JC, Myring J, Brook JD, Crow S, Reardon W, Buckler AJ, Harper PS, Housman DE, and Shaw DJ: Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 52:1164-1174, 1993.

Harley HG, Rundle SA, Reardon W : Unstable DNA sequence in myotonic dystrophy.

Lancet 339:1125-1128, 1992.

Harper PS: Myotonic dystrophy, 2nd ed., WB Saunders, London, 1989.

Harris S, Moncrieff C, and Johnson K: Myotonic dystrophy: will the real gene please step forward. *Hum. Mol. Genet.* 5:1417-1423, 1996.

Hecimovic S, Barisic I, Muller A, Petkovic I, Baric I, Ligutic I, Pavelic K: Expand long PCR for fragile X mutation detection. *Clin. Genet.* 52:147-154, 1997.

Krahe R, Eckhart M, Ogunniyi AO, Osuntokun BO, Siciliano MJ, Ashizawa T: De novo myotonic dystrophy mutation in a Nigerian kindred. *Am. J. Hum. Genet.* 56:1067-1074, 1995.

Lavedan C, Hofmann-radvany H, Shelbourne P, Rabes J-P, Duros C, Savoy D, Dehaups I, Luce S, and Johnson K: Myotonic dystrophy :size - and sex-dependent dynamic of CTG meiotic instability and somatic mosaicism. *Am. J. Hum. Genet.* 1993.

Mahadevan MS, Amemiya C, Jansen G, Sabourin L, Baird S, Neville CE, Wormskamp N, Segers B, batzer M, Lamerdin J, de Jong P, Wieringa B, Korneluk RG: Structure and genomic sequence of the myotonic dystrophy (DM kinase) gene. *Hum. Mol. Genet.* 3:299-304, 1993.

Mahadevan MS, Foitzik MA, Surh LC, Korneluk RG: Characterization and

- polymerase chain reaction (PCR) detection of an *Alu* deletion polymorphism in total linkage disequilibrium with myotonic dystrophy. *Genomics* 15:446-448, 1993.
- Mahadevan MS, Tsilfidis C, Sabourin L, Shutler G, Amemiya C, Jansen G, Neville C, Narang M, Barceo J, O'Hoy K, Leblond S, Earle-Macdonald J, de Jong PJ, Wieringa B, and Korneluk RG: Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255:1253-1255, 1992.
- Martorell L, Keith J, Catherine A, Boucher and Montserrat B: Somatic instability of the myotonic dystrophy (CTG)_n repeat during human fetal development. *Hum. Mol. Genet.* 4:1-8, 1995.
- Martorell L, Monckton DG, Gamez J, Johnson KJ, Gich I, de Munain AL, Baiget M: Progression of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients. *Hum. Mol. Genet.* 7:307-312, 1998.
- Monckton DG, Coolbaugh MI, Aashizawa KT, Siciliano MJ, Caskey CT: Hypermutable myotonic dystrophy CTG repeats in transgenic mice. *Nature Genet.* 15:193-196, 1997.
- Monckton DG, Wong LJC, Ashizawa T, Caskey CT: Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 4:1-8, 1995.

- Neitzel H: A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum. Genet.* 73:320-326, 1986.
- Neville CE, Mahadevan MS, Barcelo JM, Korneluk RG : High resolution genetic analysis suggests one ancestral predisposing haplotype for the origin of the myotonic dystrophy mutation. *Hum. Mol. Genet.* 1:45-51 1994.
- Petronis A, HenG HHQ, Tatuch Y, Shi X-M, Klempan TA, Tsui L-C, Ashizawa T, Surh LC, Holden JJA, and Kennedy JL: Direct detection of expanded trinucleotide repeats using PCR and DNA hybridization techniques. *Am. J. Med. Genet.* 67:85-91, 1996.
- Redman JB, Fenwick RG, Fu YH, and Pizzuti A: Relationship between parental trinucleotide GCT repeat length and severity of myotonic dystrophy offspring. *J. Am. Med. Assoc.* 269:1960-1965, 1993.
- Tishkoff SA, Goldman A, Calafell F, Speed WC, Deinard AS, Bonne-Tamir B, Kidd JR, Pakstis AJ, Kidd KK: A global haplotype analysis of the myotonic dystrophy locus: implications for the evolution of modern humans and for the origin of myotonic dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 62:1389-1402, 1998.
- Yamagata H, Miki T, Sakoda S, Yamanaka N, Davies J, Shelbourne P, Kubota R, Takenaga S, Nakagawa M, Ogihara T: Detection of a premutation in

Japanese myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 3:819-820.

臺灣遺傳性神經肌肉疾病研究小組, 中華民國肌萎縮病友協會, 中華民國神經
大學學會, 高雄市醫界聯盟協會: 認識肌肉萎縮症 (肌肉萎縮症病友衛教資
料). 1997.