·论　著·

多重定量荧光 PCR 快速检测染色体非整倍体疾病*

江　帆[1],丁　渭[2],王　霞[1],袁玉枝[1],屈艳霞[1],陈桂兰[1],卢　航[1],陈华云[2](1.广东省广州市人口和计划生育科学研究所　510460;2.中山大学达安基因诊断中心,广州　510665)

【摘要】 目的　探讨多重定量荧光 PCR 快速检测染色体非整倍体标本疾病的价值。**方法**　利用 21,18,13 号及 X 染色体上 15 个 STR(短串联重复序列)位点进行多重 PCR 扩增,在 24 h 内快速检测染色体非整倍体标本。通过建立两个多重 PCR 体系,对 921 例临床标本(包括外周血、绒毛膜及羊水标本)进行检测。**结果**　921 例标本中 915 例结果与染色体核型结果相符,其中 2 例 45,X 外周血标本,2 例 21-三体综合征标本、1 例 46,XX 标本未检出,1 例羊水标本分析失败,与传统染色体核型分析方法相比,其灵敏度及特异度分别为 97.64%、99.85%。**结论**　多重定量荧光 PCR 技术可用于快速诊断非整倍体疾病。

【关键词】 多重定量荧光 PCR 染色体核型分析;　21-三体综合征;　Klineflter′综合征;　Turner′综合征

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.15.011　**文献标志码:**A　**文章编号:**1672-9455(2012)15-1846-02

Multiplex QF-PCR detection of aneuploid in chromosome X,Y,13,18,21*

JIANG Fan[1],*DING Wei*[2],*WANG Xia*[1],*YUAN Yu-zhi*[1],*QU Yan-xia*[1],*CHEN Gui-lan*[1],*LU Hang*[1],*CHEN Hua-yun*[2](1.*Guangzhou Institute for Population and Family Planning*,*Guangzhou*,510460,*China*;2.*Daan Gene Diagnositic Center*,*Sun Yat-sen University*,*Guangzhou*,*Guangdong* 510665,*China*)

【Abstract】 Objective　To explore the value of Multplex QF-PCR detection of aneuploid in chromosome X,Y,13,18,21. **Methods**　The detection of sex and aneuploidies involving chromosomes 21,18,13 and X using short tandem repeat (STR) provides an exceptionally valuable tool for the prenatal diagnosis within 24 h after amniocentesis, CVS or fetal blood samples. Two separate multiplex PCR systems were established for the co-amplification of the specific 15 genetic markers. 921 clinical samples including amniocentesis,fetal blood and peripheral blood were carefully verified. **Results**　The results from QF-PCR were concordant with the karyotype for 915 of the 921 samples. A total of the remaining 6 samples required additional test. Two samples had a karyoptype 45,X and was uninformative for all X markers. One amniotic fluid sample was dark red stained and was suspected of being contaminated. Two samples had only one informative marker for chromosome 21,and the sample which had a karyotype 46,XX had only one informative marker for chromosome X. The sensitivity and specificity of QF-PCR were 97.64%,99.85%. **Conclusion**　Quantitative fluorescent PCR could be applied in rapid diagnosis of aneuploidies.

【Key words】 quantitative flourescence PCR karyotypic analysis;　Trisomy 21;　Klineflter′ syndrome;　Turner′ syndrome

目前,染色体非整倍体疾病的产前诊断最主要的方法仍是以细胞遗传学检测为主,但该方法需要进行羊水细胞培养,时间较长(约 2～3 周),且受羊水培养环境、显带等多种因素的限制。多重定量荧光 PCR(QF-PCR)主要是通过扩增微卫星标记物 STR 来提供检测对象的遗传图谱,以达到检测目的[1],由于 21、13、18、X、Y 5 条染色体非整倍体发生率约占所有染色体异常活婴的 95%[2],应用多重 QF-PCR 检测,能满足临床上大多数染色体病的产前诊断的需要。本研究对临床收集的 921 例标本分别应用染色体核型分析方法和多重 QF-PCR 方法进行检测,以探索多重 QF-PCR 在临床检测上的应用价值,现报道如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料　共收集胎儿脐血标本 272 例、羊水标本 139 例以及外周血标本 510 例,所有样本均进行细胞培养及染色体核型分析方法,同时进行多重 QF-PCR 检测。

1.2　方法

1.2.1　样本 DNA 提取　从 250 μL 外周血标本或者 1～2 mL 羊水标本中用 TaKaRa 公司的基因组提取试剂盒进行 DNA 提取。用分光光度计对 DNA 进行定量测定。

1.2.2　引物设计　针对 21 号染色体上特异的 3 个 STR 位点(D21S1435、D21S1411、D21S11),18 号染色体上 4 个 STR 位点(D18S386、D18S391、D18S535、D18S1002),13 号染色体上 4 个 STR 位点(D13S305、D13S628、D13S634、D13S742)及 X 染色体 3 个 STR 位点(DXS981、DXS6809、X22)和一个性别位点(AMXY)进行引物设计,并在所设计引物的 5′端标记荧光(表 1)。本实验引物由上海博亚公司合成和纯化。

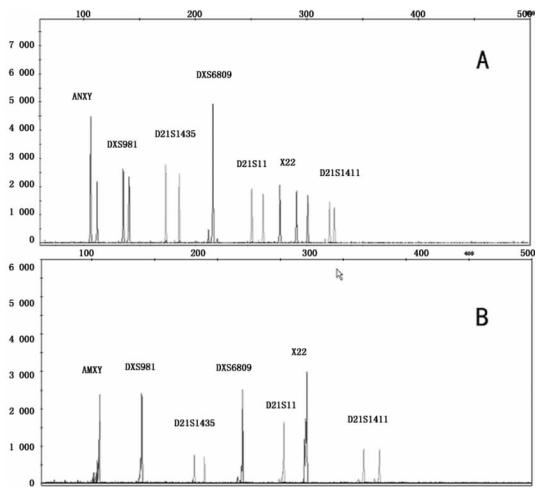
1.2.3　两个多重 PCR 体系建立　用 ABI9700PCR 扩增仪同时进行两个多重 PCR 体系扩增,一个扩增体系同时扩增 AMXY、DXS981、DXS6809、X22、D21S1435、D21S11 和 D21S1411 位点,一个体系扩增 D18S386、D18S391、D18S535、

*　**基金项目:**广东省计生委基金资助项目(2007030)。

D18S1002、D13S305、D13S628、D13S634 及 D13S742 位点。扩增体系具体如下。12.5 μL 体系:基因组 DNA(体系中保证 5 ng DNA 提取物足够),240 μmol/L dNTPs,每种引物浓度为 400～900 nmol/L,PCR 缓冲液(Applied Biosystems Inc,USA) 0.08 U/μL,其他还包括 Ampli Taq Gold (Applied Biosystems Inc,USA)及体系增强剂。扩增条件:95 ℃热启动 11 min,94 ℃变性 1 min,58 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,26 个循环后,60 ℃延伸 60 min。PCR 产物结果分析:借助于 ABI3100 测序仪进行基因片断扫描法(Genescan)分析。PCR 产物变性体系:PCR 产物1 μL,去离子甲酰胺 13.5 μL,Genescan-500(Applied Biosystems,USA)0.5 μL,95 ℃ 5 min 后,迅速将产物放在预置冰上,处理产物放置于 ABI3100 上进行毛细管电泳分析。

表 1　各 STR 位点名称、荧光标记片段大小及位置

系统	位点	荧光标记	大小(bp)	位置
PCR 系统 1	AMXY	6-FAM	X106,Y112	Xp22.3/Yp11.2
	DXS981	6-FAM	120～190	Xq11.2-q13.1
	DXS6809	6-FAM	198～240	Xq
	X22	6-FAM	250～400	Xq/Yq
	D21S1435	HEX	160～200	21q21
	D21S11	HEX	240～280	21q21
	D21S1411	HEX	300～352	21q22.3
PCR 系统 2	D18S1002	6-FAM	114～146	18q11.2
	D18S391	6-FAM	174～222	18pter-18p11.2
	D18S535	6-FAM	227～279	18q12.2
	D18S386	6-FAM	295～371	18q22.1
	D13S628	HEX	147～191	13q31-q32
	D13S742	HEX	212～308	13q12.1
	D13S634	HEX	312～372	13q14.3
	D13S305	HEX	378～422	13q12.1-q14.1



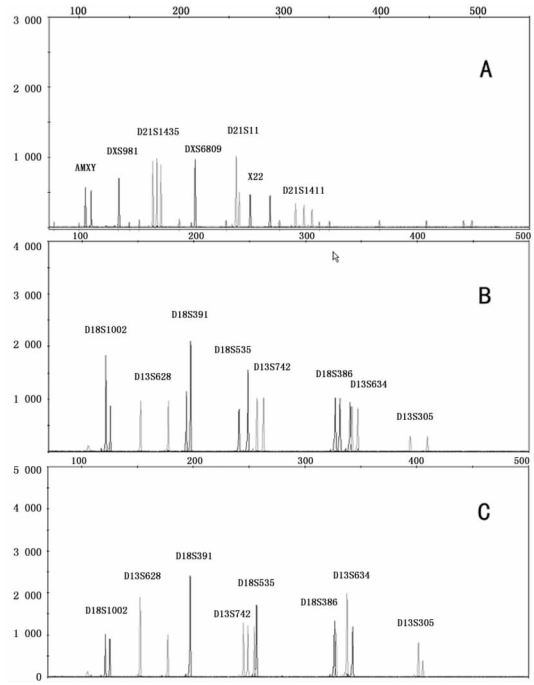
注:X 轴表示 PCR 产物长度,Y 轴表示荧光强度,每个峰所对应的是扩增位点;A 图显示为 1 例 47,XXY 的标本,X22 及 AMXY 位点上各峰值比值分别为 1∶1∶1 及 2∶1;B 图则显示为 1 例核型为 45,X 的标本,性别扩增位点上均表现为 1 个峰。

图 1　X 染色体 STR 位点及 AMXY 位点图

1.2.4　结果判读　按照国际统一判断标准(ACC/CMGS)进行判定。结果表现为 3 个荧光峰:峰值比接近 1∶1∶1 或者表现为双峰,但峰值比小于 0.65 或者大于 1.8 可判断为 21-三体综合征。

2　结　果

多重 QF-PCR 结果与染色体核型分析结果比较,收集的 921 例 21-三体标本中,其中 704 染色体核型分析确定为正常的标本中 703 例通过多重 QF-PCR 检出,1 例 46,XX 标本未检出,特异度为 99.85%,而 212 例染色体异常的标本中,多重 QF-PCR 方法检出 207 例,其中 2 例 45,X 外周血标本,2 例 21-三体标本未检出,主要原因是由于所扩增的 STR 位点所提供的信息无法进行判读,1 例羊水标本分析失败,灵敏度为 97.64%。结果见图 1、2。



注:X 轴表示 PCR 产物长度,Y 轴表示荧光强度,每个峰所对应的是扩增位点。A 图显示的是在 21 号染色体上 3 个 STR 位点表现为 1∶1∶1 或 2∶1 的绿色荧光峰,同时扩增的性染色体 STR 位点则表现为正常模式;B 图显示的是 18 号染色体上 4 个 STR 位点表现为 1∶1∶1 或 2∶1 的蓝色荧光峰,而 13 号染色体上扩增的 STR 位点比值在正常范围;C 图显示 13 号染色体上上 4 个 STR 位点表现为 1∶1∶1 或 2∶1 的蓝色荧光峰,而 18 号染色体上扩增的 STR 位点比值在正常范围。

图 2　21 号、18 号、13 号染色体上 STR 位点图

3　讨　论

多重 QF-PCR 扩增微星位点已经被很多文献证实是一种快速有效的产前诊断方法。本研究所选取的 STR 位点均为目的染色体所特有,杂合度高,而且这些 STR 位点在国外文献中出现和使用的频率高[3]。多重 QF-PCR 检测 21-三体综合征等非整倍体疾病在国内外文章中均有报道过,然而,以往文献中往往同时扩增位点少且最多为 6 个,主要原因是由于同一扩增体系中所有扩增位点无论片段大小均用一种荧光标记,如何平衡各位点扩增同时减少非特异性扩增是一个难题,这就需要优化多重 PCR 体系。本研究两个多重 PCR 体系分别试着同时扩增 7 个和 8 个 STR 位点,通过体系优化,每个位点之间扩增相对均衡,而且检测的 921 例样本中,灵敏度和特异度均大于 97%,未检出的 5 例标本中,2 例为 45,X 标本和 1 例 46,XX 标本,无法用多重 QF-PCR 检测出来的原因(下转第 1849 页)

进行鉴别。

治疗真菌性鼻窦炎首选在鼻内镜下手术治疗[8]，鼻内镜具有提供高亮度照明、有放大效果、观察细致等优点[9]，手术治疗中一个难点是清除上颌窦腔内壁及下壁的真菌球块、息肉、纤维蛋白膜。在损伤相对小的情况下将上颌窦腔内病灶清除干净，涉及术后康复时间、复发率及术后并发症等问题。

如用圆头形上颌窦探针，因头部为圆形，头部表面积增大，将真菌块与窦壁之间进行分离时不能很好进入两者之间，而容易直接进入真菌块内，由此容易造成部分真菌块仍与窦壁粘连，不易清除。厂家生产的上颌窦探针头部常为圆头形，在清除上颌窦内壁、下壁病灶时容易残留。本院选用小半圆头形自制探钩，能解决圆头形上颌窦探针之不足。当然术中在特殊情况下也需结合下壁道开窗等路径。

真菌性上颌窦炎手术中将真菌球块彻底清除是手术中的关键，也是影响术后疗效的最重要的因素[10]。术中围绕彻底清除真菌球块所需鼻腔相关结构及窦口处理也是必要的。本组病例术前、术后均未全身或局部使用抗真菌药物，取得了理想疗效，与有关报道相符[11]。

本组病例手术体会侧重于选用一个较为合理的方法清除病灶，通过本院手术经验，结合应用自制上颌窦探钩进行上颌窦腔内真菌球块等病灶彻底清除的方法行之有效，事半功倍，取得了较好的疗效。

参考文献

[1] 吕秋萍，孙敬武，叶非常，等. 鼻窦真菌病的双径路鼻内窥镜手术体会[J]. 耳鼻咽喉头颈外科杂志，2002，9(1)：56-57.

[2] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编委会，中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学会鼻科分会. 慢性鼻-鼻窦炎诊断和治疗指南[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志，2009，44(1)：6-7.

[3] 杨秀敏，王毓新，刘铭，等. 100 例真菌性鼻窦炎的病原菌分析[J]. 耳鼻咽喉头颈外科，2000，7(1)：9-13.

[4] 农辉图，李菊裳，黄光武，等. 鼻腔鼻窦真菌学和临床诊疗研究(附 51 例报告)[J]. 耳鼻咽喉头颈外科，2000，7(1)：3-8.

[5] Yanagi K，Haruma K. Moriyama of zhe maxillary sinus and endoscopic surgery[J]. J Otoiaryngol，1992，14(10)：1602.

[6] 俞肖一，朱杰敏，崔金才，等. 真菌性鼻窦炎 CT 表现和病例分析[J]. 医学影像学杂志，1999，10(1)：4-6.

[7] 张书文，孙士铭. 真菌性鼻窦炎的 CT 与临床诊断[J]. 临床放射学杂志，2002，21(10)：778-780.

[8] 刘铭，刘华超，韩德民. 鼻及鼻窦的真菌性疾病[J]. 耳鼻咽喉头颈外科，2000，7(4)：252-256.

[9] 秋建立，陈中华. 鼻内镜下射频治疗隐蔽性鼻出血 46 例临床观察[J]. 重庆医学，2006，35(16)：1489.

[10] 郑富春，唐红梅. 鼻内镜下手术治疗非侵袭性真菌性鼻窦炎 80 例[J]. 陕西医学杂志，2010，39(9)：1258-1259.

[11] 吴建，范静平，廖建春，等. 72 例非侵袭性真菌性鼻-鼻窦炎鼻内镜手术[J]. 临床耳鼻咽喉杂志，2005，19(14)：658-659.

(收稿日期：2012-02-18)

(上接第 1847 页)

是由于在所扩增的性别 STR 位点上均为单峰，无法提供相关的判读信息。据文献报道，约有 0.2% 的健康妇女在所有目前使用的性别 STR 位点上均表现为纯合子[4]，虽然这个概率很低，但是说明存在运用多重 QF-PCR 无法区别健康女性和 Turner′综合征的情况，而减少这种情况发生只能尽可能在 Xq/Yq 染色体上寻找更多的杂合度高的 STR 位点进行扩增。2 例未检出的 21-三体标本原因同上，解决办法也是尽可能扩展了个更多的 21 号染色体上 STR 位点以达到检测目的。

与传统 QF-PCR 和染色体核型分析方法相比，多重 QF-PCR 方法无需细胞培养，从而可以避免培养过程中污染事件的发生，所需样本量少，一次 PCR 反应仅需 5 ng 基因组 DNA 即可检测，而染色体核型分析仅需要 600 μL 外周血、20 mL 羊水标本，其操作过程自动化，可减少人为因素的干扰，检测周期短，24 h 内即可发送报告，而染色体核型分析至少需要 2 周时间，检测时间缩短可减少因孕妇心理压力增加导致的流产事件发生，减少所需费用[5-6]，而且可以用于分析多出来的染色体来源是父方还是母方；与荧光原位杂交技术(FISH)相比，所需费用相对低廉，而且更适于大规模检测，但两者均只能检测染色体数目异常疾病，对于染色体结构异常如染色体倒位等还是无法达到检测目的，因此，无法完全替代染色体核型分析方法。

参考文献

[1] Patterson D. The integrated map of human chromosome 21. In Etiology and Pathogenesis of Down syndrome[M]. Wiley-Liss，1995：43-55.

[2] Writters I，Devriendt K，Legius E，et al. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 in 5 049 consecutive uncultured amniotic fluid samples by fluorescence in situ hybridization (FISH) [J]. Prenat Diagn，2002，22 (1)：29.

[3] C iriglianol V，Voglino G，Canadas J，et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18 000 consecutive clinical samples [J]. Mol Hum Reprod，2004，10(11)：839-846.

[4] Cirigliano V，Ejarque M，Fuster C，et al. X chromosome dosage by quantitative fluorescent PCR and rapid prenatal diagnosis of sex chromosome aneuploidies[J]. Mol Hum Reprod，2002，8(11)：1042-1045.

[5] Kimpton CP，Fisher D，Watson S，et al. Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci[J]. Int J Legal Med，1994，106(6)：302-311.

[6] Whitaker JP，Clayton TM，Uruhart AJ，et al. Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster：high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples[J]. Biotechniques，1995，18(4)：670-677.

(收稿日期：2012-02-20)