文章编号:1000-5404(2009)11-1037-04

论著

微阵列比较基因组杂交分析18等臂双着丝粒染色体胎儿全基因组拷贝数变化

张艳亮[1],戴 勇[1],涂植光[1],李启运[2],吴 瑛[3],曾 君[2],林秀华[2],张 丽[2] ([1]重庆医科大学教育部临床检验诊断学重点实验室,重庆 400016;深圳市人民医院:[2]临床医学研究中心,[3]超声科,广东 深圳 518082)

摘 要:目的 了解18q等臂双着丝粒染色体[idic(18)(p11→qter)]胎儿全基因组拷贝数变化的情况,确定idic(18)(p11→qter)的结构和组成,探讨微阵列比较基因组杂交在分子细胞遗传诊断中运用的可行性和优越性。**方法** 运用微阵列比较基因组杂交芯片对一被传统G显带和荧光原位杂交诊断为idic(18)(p11→qter)的胎儿进行全基因组高分辨率扫描和分析。**结果** 微阵列比较基因组杂交显示胎儿存在18p11.21→pter缺失、18p11.21→qter复制,断裂点位于12 104 527~12 145 199(距离18p端粒),确定idic(18)(p11→qter)是idic(18)(p11.21→qter)。另外,还检测出了21个亚显微拷贝数变化。**结论** 与传统的细胞遗传分析方法相比,微阵列比较基因组杂交不仅能准确、高分辨率和高通量地检测出基因组拷贝数变化,还能高分辨率地确定拷贝数变化的断裂点。

关键词: 微阵列比较基因组杂交;18等臂双着丝粒染色体;拷贝数变化
中图法分类号: R318.04; R446.69; R714.55 **文献标识码:** A

Experimental study of whole genomic copy number variations in a fetus with a *de novo* isodicentric chromosome 18 by array-based comparative genomic hybridization

ZHANG Yan-liang[1], DAI Yong[1], TU Zhi-guang[1], LI Qi-yun[2], WU Ying[3], ZENG Jun[2], LIN Xiu-hua[2], ZHANG Li[2] ([1]Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Research Institute of Clinical Medicine, [3]Department of Ultrasound Diagnosis, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518082, Guangdong Province, China)

Abstract: Objective To understand the genomic copy number variations (CNVs) in a fetus with a *de novo* isodicentric chromosome 18q[idic(18)(p11→qter)], identify the organization and components of the idic(18)(p11→qter), and investigate the possibility and superiority of array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) in molecular cytogenetic diagnosis. **Methods** The whole genome of a fetus with idic(18)(p11→qter) diagnosed by G-banding and fluorescence in situ hybridization was scanned and analyzed by array-CGH. **Results** The results of array-CGH showed deletion of 18p11.21→pter and duplication of 18p11.21→qter. The breakpoint was between 12 104 527 and 12 145 199 (from the telomere of 18p), indicating the idic(18)(p11→qter) was idic(18)(p11.21→qter) actually. Further more, 21 submicroscopic genomic CNVs were identified. **Conclusion** Compared with conventional cytogenetic analysis, array-CGH can not only detect genomic CNVs with high accuracy, high resolution, and high-throughput, but also identify breakpoints of CNVs with high resolution.

Key words: array-based comparative genomic hybridization; isodicentric chromosome 18; copy number alterations

基因组拷贝数变化(copy number variations, CNVs)用来描述患者与正常参考之间基因组DNA拷贝数的差异,以及导致微缺失和微复制综合征的基因组不平衡[1]。最近的研究表明,CNVs的发生率至少是单核苷酸多态性(SNPs)的3倍,在许多人类疾病(如肿瘤、遗传性疾病、心血管疾病及糖尿病)的发生、发展中起重要作用[2]。

许多细胞遗传分析技术,如染色体显带技术、荧光原位杂交(FISH)、实时定量PCR(RT-qPCR)、多重连接介导的探针扩增(MLPA)和比较基因组杂交(CGH)等都能用于CNVs的检测和描述,但这些技术要么由于分辨率低,难以检测亚显微CNVs,更难以确定CNVs的大小和断裂点;要么由于低通量性,仅能对有

作者简介:张艳亮,男,云南省瑞丽市人,博士研究生,主要从事分子细胞遗传诊断方面的研究。E-mail:zylyh2007@yahoo.cn
通信作者:戴 勇,电话:(0755)25533018-2780, E-mail:daiyong22@yahoo.com.cn

收稿日期:2008-07-17;修回日期:2008-12-15

限的基因组位点进行分析,无法对整个基因组进行筛查。最近,微阵列比较基因组杂交(array-based comparative genomic hybridization ,array-CGH)作为一种新型的强大的细胞遗传分析方法,为细胞遗传诊断和研究提供了一个新的平台。array-CGH 与传统 CGH 的原理相似,但用吸附于固体载体(如玻片)上的大量 DNA 探针取代了中期染色体,分辨率达到了空前的高度。因此,array-CGH 结合了传统 CGH 高通量和 FISH 高分辨率等优点,一次检测相当于对基因组同时进行了成千上万个独立的 FISH。

本研究运用 array-CGH 对一严重四肢畸形和心脏缺陷、传统细胞遗传诊断为 18q 等臂双着丝粒染色体[idic(18)(p11→qter)]的胎儿进行全基因组扫描,了解胎儿全基因组 CNVs 的情况,探讨 array-CGH 在分子细胞遗传诊断中运用的可行性和优越性。

1 资料与方法

1.1 病例资料

28 岁孕 3 产 0 孕妇,此次妊娠 26 周时,因超声检查发现胎儿多发畸形而收住本院。超声检查发现胎儿双侧桡骨缺失并双手畸形,双侧肱骨较短,右侧足内翻,Taussing-Bing 综合征(室间隔缺损,肺动脉骑跨),双侧脉络膜囊肿,颈项软组织增厚。该孕妇否认近亲结婚,否认高血压、糖尿病、肾病、肝炎、结核病等病史,否认家族遗传病史。G 显带染色体分析结果为:46,XY,-18,+der(?)。FISH 显示衍生染色体可能是 18q 等臂双着丝粒染色体[idic(18)(p11→qter)],确切的断裂点尚无法确定。父母的核型均正常。

1.2 细胞收集

孕妇妊娠期间,收集经 G 显带染色体检查后剩余的脐带血细胞培养悬液,-20 ℃保存。收集一核型和表型均正常的男性个体的外周血细胞培养悬液作为正常对照,-20 ℃保存。

1.3 array-CGH 分析

运用 Agilent Technologies Array CGH Kits (Santa Clara,美国)进行 array-CGH 分析,此芯片平台的探针是 60-mer 的寡核苷酸,能以约 20 kb(Kit 244A)的分辨率进行全基因组扫描。DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen 公司,德国)提取胎儿和对照标本的基因组 DNA,片段化。用 GenomePlex®(Sigma 公司)进行全基因组扩增,纯化。用 Genomic DNA Labeling Kit PLUS (Agilent 公司)通过随机引物法对两样本进行标记,用 Cy5-dUTP 和 Cy3-dUTP 分别标记胎儿和对照标本。纯化标记产物并检测标记效率,将标记产物和 50 μg Cot-1 DNA 混合、变性和预退火后,于 65 ℃与芯片旋转杂交 40 h。冲洗 2 次后,用 Scanner and Feature Extraction Version 9.5(Agilent 公司) 对杂交结果进行扫描,所得数据由 CGH Analytics 3.4 (Agilent 公司)进行分析。CNVs 的筛选标准:相邻的 4 个探针向同一方向变化,且 $\log_2$(待测/对照)≤ -0.5 或≥0.5,分别用于评估 CNVs 的缺失或复制。

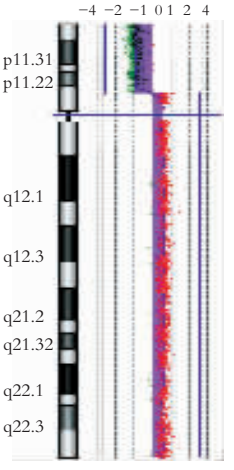
1.4 RT-qPCR

为了验证 array-CGH 检测结果的准确性,选择 2 个亚显微 CNVs(一个微复制和一个微缺失),按照 Qiao 等[3]所用的方法在复制(22q11.23)和缺失(14q11.1 - q11.2)的基因组区域中选择非多态性片段进行 RT-qPCR 检测。复制区域的引物:正义链:5′-GGCCTTGTCTGTTCTGTTGTT-3′,反义链:5′-TTCTTTCCATTCGGTATCCAC-3′;缺失区域的引物:正义链:5′-TACAGCCTCAGCACAATACCG-3′,反义链:5′-TAACAAACCTCCTCCTTCCAGT-3′;以 GAPDH 为内参:正义链:5′-AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC-3′,反义链:5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′。反应条件为:95 ℃ 5 min;40 个 PCR 循环(95 ℃ 10 s;59 ℃ 15 s;72 ℃ 20 s)。通过比较患者与对照样本同一位点的 C_t 值来计算患者此位点拷贝数的相对变化,数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析[4]。

2 结果

2.1 array-CGH 分析结果

对胎儿进行全基因组 array-CGH 扫描分析后,显示 18p11.21→pter 缺失,18p11.21→qter 复制,断裂点位于 12 104 527 ~ 12 145 199(距离 18p 端粒,图 1),表明 idic(18)(p11→qter)实际上是 18 等臂双着丝粒染色体[idic(18)(p11.21→qter)]。由于父母的核型均正常,因此,idic(18)(p11.21→qter)是新生成的。另外,从其他 13 条染色体中共检测出了 21 个亚显微 CNVs 并被分为 2 组(表 1)。A 组含有 13 个公共病理性 CNVs 数据库[the Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/)]已报道过的 CNVs,且大都是已报道的 CNVs 片段当中的 1 个区段。B 组中的 8 个 CNVs 与公共良性 CNVs 数据库[the Database of Genomic Variants(http://projects.tcag.ca/variation/)]中的 CNVs 相重叠。13 个 CNVs(A 组有 7 个,B 组有 6 个)是微复制,最小的 CNV 仅 13.91 kb。在 21 个亚显微 CNVs 中,9 个(A 组有 8 个)含有 OMIM 数据库列出的基因(n = 12),分别涉及人类免疫、代谢、转录调节、解毒和肿瘤发生等生物功能。



左边是 18 染色体的模式图,右边是 18 染色体探针的 $\log_2$(比值)以及在染色体上所处的位置,每个点代表 array-CGH 芯片上的 1 个探针。拷贝数缺失(18p11.21→pter)的 $\log_2$(比值)≤ -0.5,移向左边;拷贝数复制(18p11.21→qter) 的 $\log_2$(比值)≥0.5,移向右边;无 CNVs 区域的 $\log_2$(比值)为 0

图 1 18 染色体的 array-CGH 扫描结果

2.2　RT-qPCR

表 2 计算结果显示对照组中 22q11.23 的拷贝数为 1,则在病例组中的拷贝数为 3.12,表明 22q11.23 微复制;表 3 计算结果显示对照组中 14q11.1－q11.2 的拷贝数为 1,则在病例组中的拷贝数为 0.48,表明 14q11.1－q11.2 微缺失。2 个亚显微 CNVs(1 个微复制和 1 个微缺失)的 RT-qPCR 检测结果与 array-CGH 的检测结果相吻合。

表 1　array-CGH 鉴定出的所有亚显微 CNVs

染色体区带	起点和终点	大小(kb)	复制	缺失	OMIM 列出的基因	生物功能
A 组						
4q13.2	69 073 931～69 163 102	89.17		－	UGT2B17	类固醇代谢
4q31.22	145 186 300～145 255 477	69.18		－		
6p21.33	29 967 450～30 030 232	62.78	＋		HLA-A	介导免疫反应
7p14.1	38 276 360～38 340 209	63.85	＋			
7q31.1	110 772 120～110 847 783	75.66	＋		IMMP2L	蛋白代谢
10q21.1	57 140 052～57 271 333	131.28		－		
11q11	55 123 519～55 203 906	80.34		－		
11q25	133 658 268～133 716 778	58.51	＋			
13q12.11	19 856 522～19 988 701	132.18		－	CRYL1	蛋白代谢
17q12	31 448 491～31 635 665	187.17	＋		CCL4 CCL3L1 CCL3L3	HIV-1 免疫反应性
19q13.11	39 872 173～39 922 593	50.42	＋		ZNF181	转录调节
22q11.23	22 683 573～22 721 242	37.67	＋		GSTT1	解毒
22q13.1	37 685 701～37 713 248	27.55		－	APOBEC3A APOBEC3B	肿瘤发生
B 组						
2p12	75 843 629～75 896 398	52.77	＋			
3q26.1	164 009 121～164 108 253	99.13	＋			
6p21.32	32 564 961～32 668 667	62.78	＋		HLA-DRB5	介导免疫反应
6p21.32	32 723 444～32 742 999	19.56	＋			
11p15.4	5 745 129～5 764 727	19.6		－		
14q11.1－q11.2	18 539 664～19 494 616	954.95		－		
16q12.2	54 356 504～54 376 987	20.48	＋			
16p13.3	1 079 625～1 093 537	13.91	＋			

表 2　患者微复制的 RT-qPCR 检测结果

组别	C_t(GAPDH)	C_t(22q11.23)	C_t(22q11.23)－C_t(GAPDH)	$\triangle\triangle C_t$	$2^{-\triangle\triangle C_t}$
对照组	18.48	25.72	7.24	0	1.00
病例组	18.04	23.64	5.60	－1.64	3.12

表 3　患者微缺失的 RT-qPCR 检测结果

组别	C_t(GAPDH)	C_t(14q11.1－q11.2)	C_t(14q11.1－q11.2)－C_t(GAPDH)	$\triangle\triangle C_t$	$2^{-\triangle\triangle C_t}$
对照组	18.48	26.54	8.06	0	1.00
病例组	18.04	27.15	9.11	1.05	0.48

3　讨论

1 条染色体的两臂在形态与遗传上相同并借 1 个或 2 个着丝粒连接在一起,称为等臂染色体。根据着丝粒的来源,双着丝粒染色体可以分为 3 种类型[5]:①异源双着丝粒染色体,着丝粒来源于非同源染色体;②同源双着丝粒染色体,着丝粒来源于 2 条同源染色体;③等臂双着丝粒染色体,着丝粒来源于同一染色体,在遗传上完全一致,两臂成镜像关系。等臂双着丝粒染色体的形成机制包括[5]:①在 S 或 G_2 期,姐妹染色单体发生等位 U 型交换(姐妹染色单体等位断裂后于断裂点处重接);②染色体在 G_1 期发生缺失,缺失后的染色体进行复制,随后,姐妹染色单体于断裂点处发生 U 型重接。

18 等臂染色体[i(18q)或 i(18p)]是一种罕见的细胞遗传异常。由于仅靠显带分析,很难确定双着丝粒模式,所以 18 长臂和短臂等臂双着丝粒染色体取代一正常 18 染色体的报道更加罕见。到目前为止,仅报道过几例断裂点位于 18p 的 18 假等臂双着丝粒染色体病例[6－12]。q 臂的三体和 p 臂的单体,单着丝粒 18q[i(18q)]等臂染色体患者通常同时表现出 Edwards 综合征和 18p 单体综合征的特征,而如果是 idic(18)(p11→qter),则可能只表现出 Edwards 综合征的特征[13]。本病例是 idic(18)(p11.21→qter),存在 18p11.21→pter 缺失和 18p11.21→qter 复制,也仅表现出 Edwards 综合征的特征。因为缺乏 18p-综合征的特征,本病例支持 18p-相关的 Turner 样特征可能是由 18p11 的单体所决定[9],并推断关键区域可能位于 18p11→18p11.21 之间。另外,18p-综合征的缺乏,也可能是由于 18p 单体的表型较轻微,常被 Edwards 综合征严重的表型所掩盖。至于多余的着丝粒究竟如何抑制 18p 单体综合征表型的出现以及 18p-相关的 Turner 样特征是否由 18p11→18p11.21 的单体所决定

有待进一步研究。本病例存在严重的四肢畸形,定位于18p的SALL3的剂量不平衡可能是导致桡骨缺失的原因[14]。尽管本病例与Wulfsberg等[9]报道的病例间核型十分相似,但表型却有很大差异。这除了缺失或复制染色体片段的大小和位置不同外,基因组其他位点的亚显微CNVs、遗传修饰因子和阈值的影响也可能是造成表型差异的原因[15]。

传统的G显带分析由于分辨率不高,很难确定衍生染色体畸变片段的大小、断裂点和来源,因此难以判断衍生染色体是否为idic(18)(p11.21→qter),更无法检测其他染色体的亚显微CNVs。通过FISH分析,虽然证明了衍生染色体是idic(18)(p11→qter),但仍无法确定断裂点的位置、缺失和扩增片段的大小以及其他的CNVs。通过array-CGH进行全基因组扫描后,不仅把idic(18)(p11→qter)确定为idic(18)(p11.21→qter),而且把断裂点定位于12 104 527~12 145 199(距离18p端粒),表明18p并未完全缺失,尚存在18p11→18p11.21的复制。另外,还发现了21个亚显微CNVs,最小的一个仅13.91 kb,有9个CNVs(A组有8个)含有OMIM列出的基因,这些基因分别介导免疫反应(HLA-A、HLA-DRB5、CCL4L2、TBC1D3C和CCL3L1)、代谢(UGT2B17、IMMP2L和CRYL1)、解毒(GSTT1)、转录调节(ZNF181)和肿瘤发生(APOBEC3A和APOBEC3B)等生物功能。因为A组和B组的CNVs分别与公共病理性和良性CNVs数据库中的CNVs重叠,且A组中有8个CNVs含有OMIM列出的基因,因此,A组的13个CNVs可能是病理性的,B组的8个CNVs可能是良性的。这些含有基因的CNVs对本病例的畸形表型是否有影响,以及不含基因或OMIM列出基因的CNVs有何临床意义有待进一步研究。通过RT-qPCR对2个亚显微CNVs进行验证,结果证明array-CGH的检测结果是准确的。

此研究表明,作为一种新型的分子细胞遗传分析方法,array-CGH能够准确、高分辨率和高通量地检测等臂染色体和传统显带分析无法检测到的亚显微CNVs,并把结果直接定位于基因组,与相应的基因联系起来,为全面和准确地检测和描述染色体畸变以及基因型-表型相互关系的研究提供了一种强大的分析方法。相信不远的将来,array-CGH可能成为一种常规的细胞遗传分析方法用于临床诊断。

参考文献:

[1] Lee C, Iafrate A J, Brothman A R. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders[J]. Nat Genet, 2007, 39(7 Suppl): S48-S54.

[2] Redon R, Ishikawa S, Fitch K R, *et al*. Global variation in copy number in the human genome[J]. Nature, 2006, 444(7118): 444-454.

[3] Qiao Y, Liu X, Harvard C, *et al*. Large-scale copy number variants (CNVs): distribution in normal subjects and FISH/real-time qPCR analysis[J]. BMC Genomics, 2007, 8: 167.

[4] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[5] Lin C C, Li Y C, Liu P P, *et al*. Identification and characterization of a new type of asymmetrical dicentric chromosome derived from a single maternal chromosome 18[J]. Cytogenet Genome Res, 2007, 119(3-4): 291-296.

[6] Laurent C, Biemont M C, Philip T, *et al*. Translocations termino-terminales de novo entre deux chromosomes 18. A propos de deux observations 46, XY, ter rea(18;18)(pter;pter)[J]. Ann Genet, 1978, 21(1): 78-82.

[7] Ward B E, Bradley C M, Cooper J B, *et al*. Homodicentric chromosomes: a distinctive type of dicentric chromosome[J]. J Med Genet, 1981, 18(1): 54-58.

[8] Fioretti G, Stabile M, Pagano L, *et al*. A case of Edward's syndrome with pseudodicentric isochromosome 18: 46, XY, i dic(18)(p11::p11)[J]. Ann Genet, 1982, 25(2): 116-118.

[9] Wulfsberg E A, Sparkes R S, Klisak I J, *et al*. Trisomy 18 phenotype in a patient with an isopseudodicentric 18 chromosome[J]. J Med Genet, 1984, 21(2): 151-153.

[10] Menguid N A, Habibian R. Isodicentric chromosome 18 in an abnormal infant using chromosome specific DNA probe[J]. Clin Genet, 1992, 41(5): 225-228.

[11] Brandt C A, Djernes B, Stromkjaer H, *et al*. Pseudodicentric chromosome 18 diagnosed by chromosome painting and primed in situ labelling (PRINS)[J]. J Med Genet, 1994, 31(2): 99-102.

[12] Gravholt C H, Bugge M, Strokmkjaer H, *et al*. A patient with Edwards syndrome caused by a rare pseudodicentric chromosome 18 of paternal origin[J]. Clin Genet, 1997, 52(1): 56-60.

[13] van-Dyke D L. Isochromosomes and interistitial tandem direct and inverted duplications[M]//Daniel A. The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements. New York: Alan R Liss, 1988: 635-665.

[14] Kohlhase J, Hausmann S, Stojmenovic G, *et al*. SALL3, a new member of the human spalt-like gene family, maps to 18q23[J]. Genomics, 1999, 62(2): 216-222.

[15] Shaffer L G, Bejjani B A, Torchia B, *et al*. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future[J]. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2007, 145(4): 335-345.

(编辑 王 红)