论著

文章编号:1000-5404(2012)08-0768-04

母体血浆游离DNA分子浓度和片段完整性分析

苗 杰[1],黄 庆[1],常 青[2],徐 婷[1],王学静[1],姚 宏[2],府伟灵[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院:检验科[1],妇产科[2])

[摘要] **目的** 应用荧光定量PCR技术研究母体血浆游离DNA分子的浓度和片段的完整性的分子生物学特性。**方法** 提取本院2011年8月42例门诊16~20周妊娠女性和40例进行体检的非妊娠女性的血浆游离DNA,靶基因为leptin基因和SRY基因,用荧光定量PCR技术分别对其不同片段进行特异性扩增。leptin基因的扩增片段长度为80、202 bp,SRY基因为83、206 bp,观察其片段完整性和DNA浓度的变化。**结果** 妊娠组和对照组leptin基因80 bp片段长度的DNA浓度平均值分别为681、439拷贝/ml($P<0.01$);在片段长度为202 bp的DNA浓度平均值分别为157、91拷贝/ml,中位数为134、85拷贝/ml,表明均有显著性差异($P<0.01$)。妊娠组胎儿SRY基因83 bp和206 bp的DNA浓度的平均值为94(38~369)拷贝/ml、80(71~88)拷贝/ml,与妊娠组leptin基因比较,有显著性差异。**结论** 妊娠女性血浆DNA分子浓度明显高于非妊娠正常女性和胎儿游离DNA分子浓度。

[关键词] 胎儿NDA;产前检测;荧光定量PCR;血浆游离DNA片段完整性;非整倍体检测
[中图法分类号] R329.28;R446.11;R714.5 [文献标志码] A

Level and different segments of free DNA molecules in maternal plasma

Miao Jie[1], Huang Qing[1], Chang Qing[2], Xu Ting[1], Wang Xuejing[1], Yao Hong[2], Fu Weiling[1] ([1]Department of Medical Laboratory, [2]Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the level and segments of free DNA molecules in maternal plasma by fluorescence quantitative PCR. **Methods** Free DNA was isolated from plasma of 42 pregnant women with a gestational period of 16 – 20 weeks and 40 non-pregnant women undergoing physical examination in our department in August 2011. Different segments of the target genes, leptin and SRY, were specifically amplified. The length of amplified leptin gene segments was 80 bp and 202 bp respectively, while that of the SRY gene segments was 83 bp and 206 bp respectively. Their intact gene segments and DNA level were observed. **Results** The average DNA level in 80 bp and 202 bp segments of leptin gene was significantly higher in maternal group than control group (681 copies/ml *vs* 157 copies/ml, 439 copies/ml *vs* 91 copies/ml, $P<0.01$), while the average DNA level in 83 bp and 206 bp segments of SRY gene was significantly lower than that in 80 bp and 202 bp segments of leptin gene in maternal group than in control group (94 copies/ml and 80 copies/ml *vs* 681 copies/ml and 439 copies/ml, $P<0.01$). **Conclusion** The free DNA level is significantly higher in pregnant women than in non-pregnant women and fetus. The difference in free DNA molecules of maternal and fetal plasma found in this study provides a novel idea for the enrichment of fetal DNA and the evidence for research on fetal molecular makers and noninvasive prenatal diagnosis.

[**Key words**] fetal DNA; prenatal diagnosis; fluorescence quantitative PCR; intact free DNA egment; aneuploidy detection

Supported by the Project of National Commfittee of Population and Family Planning (2009-GJKJS-019、2009-GJKJS-018), the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2011AA02A121) and the National Natural Science Foundation of China (81071429, 81071430).
Corresponding author: Fu Weiling, Tel:86-23-65460801, E-mail: weilingfu@yahoo.com

[基金项目] 国家人口和计划生育委员会课题(2009-GJKJS-019、2009-GJKJS-018);国家高技术研究发展计划(863计划,2011AA02A121);国家自然科学基金(81071429,81071430)
[通信作者] 府伟灵,电话:(023)65460801,E-mail: weilingfu@yahoo.com

产前检查是当前预防胎儿出生缺陷提高人口质量的重要措施。传统的产前检查技术包括羊膜腔穿刺、绒毛取样以及脐带取血等,这些有创的操作对母体和胎都易造成潜在的危险,如感染、流产等,且受多种因素影体和胎儿影响其检测结果的准确性。因此,临床上亟需一种安全无创的产前检查技术。1997 年,Lo 等[1]在怀男性胎儿的妊娠母体血浆中检测到 Y 染色体特异性序列,为无创性产前检查的发展提供了新的契机。然而由于强大的母体游离 DNA 背景的存在影响了这些检测的特异性和灵敏度,使得胎儿基因位点的检测很难实现,如点突变、胎儿非整倍体检测[2]。基于此,本研究探索母体和胎儿游离 DNA 之间浓度和片段差异,以便为胎儿游离 DNA 的富集和标志物的选择提供一定依据。本实验选择位于人类 7 号染色体的 leptin 基因和男性 Y 染色体的 SRY 基因作为靶基因进行研究,观察母体血浆游离 DNA 的浓度和片段完整性差异。

1 资料与方法

1.1 临床资料

随机数字法选取 2011 年 8 月在本院门诊进行唐氏筛查的孕妇 42 例为研究组,年龄 20 ~ 34(27.0 ± 2.3)岁,无基础疾病,经 B 超确认男胎 23 例;同法选取同期在体检中心进行体检的未孕女性 40 例,其查体结果:1 例甲亢,8 例高脂血症,4 例乙肝活动期患者,其余 27 例体检结果正常;选择 27 例无基础疾病的未孕女性为对照组,年龄 20 ~ 34(28.0 ± 3.5)岁。均经其知情同意,采取肘正中静脉血 2 ml 于 EDTA. K2 抗凝管中。

1.2 主要试剂与仪器

血浆 DNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司;引物及探针序列由上海生物技术有限公司合成。

1.3 血浆 DNA 制备

采集肘正中静脉血 2 ml 于 EDTA. K2 抗凝管中,所有标本均于 2 h 内处理。处理方法:4 ℃,6 000 × *g*,离心 10 min,然后取上层血浆≥800 μl ,4 ℃,16 000 × *g*,离心 10 min,取上层血浆 800 μl 置于无菌 Ep 管中。按照 QIAamp blood Kit 说明书提取血浆 DNA,每个标本最后洗脱液为 100 μl。

1.4 引物及探针设计

Leptin 基因共同上游引物:5′-CAGTCTCCTCCAAACAGAAAGTCA- 3′,下游引物和扩增片段长度分别为 5′-GTCCATCTTGGATAAGGTCAGGA-3′,80 bp 和 5′-CAGCTCTTAGAGAAGGCCAGCA- 3′,202 bp,探针为 5′-CGGTTTGGACTTCATTCCTGGGCTCC- 3′。SRY 基因共同上游引物为 5′-AGCTGTGCAAGAGAATATTC- 3′,下游引物和扩增片段长度分别为 5′-CACACTGATACTTAGAGTTACAG- 3′, 83 bp 和 5′-AGTTTCGCATTCTGGGATTC- 3′,206 bp,探针为 5′-CGGAGAAGCTCTTCCTTCCTT- 3′。

1.5 实时荧光定量 PCR

PCR 反应体系总体积为 20 μl,包括 10 μl Ex*Taq* Buffer,200 nmol/L上游和下游引物,100 nmol/L *Taq*Man 探针,5 μl DNA 样本,加水补充至 20 μl。每个样本和空白对照都设立重复管。反应条件:95 ℃ 1 min; 95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s(50 个循环)。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,各组数据比较采用秩和检验。

2 结果

2.1 实时荧光定量 PCR 检测

稀释已知浓度的男性基因组 DNA 作为标准曲线,稀释浓度为 10^5、10^4、10^3、10^2、10 pg/μl,反应体系可检测到单拷贝 leptin 基因和 SRY 基因,从标准曲线上可计算出 DNA 初始浓度,继而换算成拷贝数,见图 1。图 2 是绘制的标准品曲线图,可以看出不同浓度标准品的 Ct 值和起始浓度之间存在良好的线性关系,扩增效率 E 为 100.4%,相关系数 R^2 为 0.998。每个样本的 Ct 值和浓度采用 2 个复孔的平均值计算。

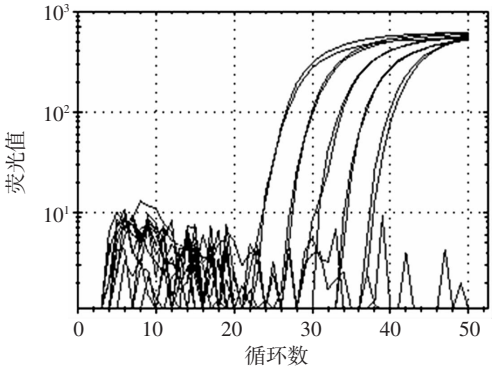


图 1 荧光定量 PCR 扩增标准品扩增曲线

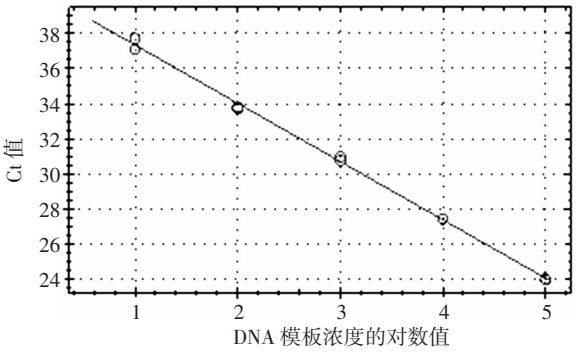


图 2 标准品曲线

2.2 妊娠组和非妊娠组血浆 DNA leptin 基因的浓度和片段完整性检测

妊娠组和对照组 leptin 基因 80 bp 片段长度的 DNA 浓度平均值分别为 681(279 ~ 1 680)、439(123 ~ 923)拷贝/ml,中位数为 608、383 拷贝/ml,两组差异有统计学意义($P < 0.01$);在 202

bp的平均值分别为157(38~826)、91(29~182)拷贝/ml,中位数为134、85拷贝/ml,两组差异有统计学意义($P<0.01$)。而妊娠组在202 bp和80 bp的DNA浓度平均值差异有统计学意义(157 *vs* 681拷贝/ml,$P<0.01$)。而相对浓度分数(相对于leptin基因的最短片段80 bp)在妊娠组和非妊娠组平均数均为24%,中位数分别为21%(7%~71%)、22%(5%~56%),差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 妊娠组胎儿DNA SRY基因定量结果

妊娠组胎儿SRY基因83 bp和206 bp的DNA浓度的平均值为94(38~369)拷贝/ml和80(71~88)拷贝/ml,中位数为77拷贝/ml和79拷贝/ml。分别与妊娠组leptin基因的80 bp和202 bp比较,片段长度为83 bp的差异有统计学意义($P<0.05$),而扩增片段206 bp长度的差异无统计学意义($P>0.05$)。23例男性胎儿中,SRY-83 bp阳性例数为20例,检出率为87%;SRY-206 bp阳性例数为9例,检出率为39%,明显低于扩增片段83 bp的检出率。

3 讨论

母体血浆游离胎儿DNA的检测为无创性产前诊断胎儿出生缺陷性疾病开辟了新纪元。研究证实胎儿DNA可以用于检测完独立于母体基因组的胎儿相关遗传位点疾病。迄今,利用母体和胎儿游离DNA分子片段和浓度的差异已成功检测了胎儿性染色体连锁疾病[3]、RhD基因分型[4]、非整倍体检测[5]以及父系遗传的单基因突变[6-7]。由于强大的母体游离DNA背景的存在限制了其发展和临床应用。

本实验选择了leptin基因和SRY基因的不同扩增片段进行荧光定量PCR扩增分析Leptin基因位于人类7号染色体[2],在人体所有细胞中都有表达,代表血浆中母体和胎儿总DNA分子片段分布;SRY基因位于Y染色体只在男性细胞中表达,代表母体血浆中胎儿游离DNA分子的片段分布。本研究显示,妊娠组leptin基因2个扩增片段的DNA浓度均显著高于非妊娠组正常女性相应的DNA浓度且妊娠组女性leptin基因随着扩增片段的增大(80~202 bp)DNA浓度明显下降,说明怀孕后母体内游离DNA分子显著增多且片段多集中在80~202 bp。这与肿瘤患者的相关研究相符[8],并且说明凋亡可能是DNA释放的重要机制[9]。通过比较相对浓度分数,可知妊娠组和对照组之间无统计学差异,平均浓度分数为24%,中位数分别为21%(7%~71%)、22%(5%~56%),说明虽然怀孕后母体内leptin基因80 bp和202 bp两个片段DNA浓度都显著增加,但是两个片段增长的幅度是差不多的。此外,23例男性胎儿中,扩增游离胎儿DNA分子SRY基因80 bp片段阳性例数为20例,分析3例出现假阴性结果原因如下:①妊娠妇女个体差异,主要指凋亡的胎儿细胞释放到母体血中时间上的差异。②操作过程中吸样失误使DNA模板浓度不够。③母体血浆中游离胎儿DNA过少,未达到扩增所需的基本量。扩增206 bp片段阳性例数仅为9例,说明随着SRY基因扩增片段的增大,阳性例数显著减少,约61%例的胎儿游离DNA分子集中在83~206 bp,与先前Fan等[10]报道相符。妊娠组leptin基因和SRY基因相比leptin基因的两个片段浓度都显著高于SRY基因的两个片段且SRY基因在206 bp片段长度的扩增有14例阴性,说明怀孕后母体游离DNA分子远多于胎儿游离DNA分子,与Lo等[2]研究结果一致。本研究应用荧光定量PCR技术检测,对较低分子量DNA片段有较高的扩增效率,因此应用该技术检测小分子片段效果较好,对大片段的检测存在一定的限制。但是相比传统的提取胎儿细胞技术,该方法的检测时间可缩短至2~3 h内完成,降低了检测成本及时间。并且肘正中静脉血的抽取量降至2 ml,极大的降低了孕妇的心理负担,同时也提高了检测效率。

当前有关血浆DNA分子生物学特性的研究不多,2004年,Chan等[11]研究显示,游离胎儿DNA分子片段短于193 bp,而母体血浆DNA分子大多数长于201 bp。同年,Li等[5]报道胎儿游离DNA分子片段短于300 bp,母体血浆DNA分子明显长于胎儿DNA分子,与Chan等报道基本一致;并利用DNA印迹法检测出长于20 kb的DNA分子。2010年,Fan等[10]利用第2代测序(配对末端测序法)直接检测母体血浆游离DNA分子的片段分布,结果显示游离DNA分子主要集中在160~180 bp之间,胎儿游离DNA分子(SRY基因)长度位于130~150 bp之间。该法增加了胎儿DNA短片段分子在母体中所占的比例。这些关于母体血浆游离DNA的分子生物学特性研究说明母体和胎儿游离DNA分子确实存在差异,因此可用于胎儿DNA分子的富集。2009年,Hahn等[3]利用母体和胎儿DNA分子的差异,将胎儿DNA富集率提高到30%~50%,因此可用于检测胎儿遗传位点的检测,如微卫星序列、点突变等。相关提取技术还包括传统的琼脂糖凝胶电泳[5]、现代的数字化核酸片段分选技术(digital NASS)[12]和微芯片分选技术[13]。

染色体非整倍体是胎儿出生缺陷性疾病最常见的病因之一,其中以唐氏综合征(21三体综合征)最为常见。早在1999年,Lo等研究结果表明怀21三体的孕

妇血浆游离胎儿 DNA 浓度明显高于正常妊娠女性。2010 年,Fan 等[10]研究表明,虽然利用 DNA 分子片段分选可以增加胎儿 DNA 分子的富集,但是不一定能增加胎儿非整倍体的检测的灵敏度。因为通过计数单分子 DNA 检测胎儿非整倍体主要依赖于胎儿 DNA 所占母体游离 DNA 的比例及游离 DNA 的分子总数。结果虽然增加了胎儿 DNA 最短片段所占母体总 DNA 分子的比例,但是总的分子几乎没有影响检测的灵敏度。因此,依赖片段长度分选检测胎儿非整倍体的应用仍然需要进一步探索[14-15]。

此外,本实验在收取门诊体检女性标本的过程中,体检结果显示有甲亢、高脂血症和乙肝活动期患者,我们一起纳入了研究。结果显示 3 种疾病状态下 DNA 分子浓度均高于正常未孕女性,其中甲亢和乙肝患者的 DNA 分子浓度甚至高于妊娠组正常女性。甲亢患者的 DNA 分子浓度 2 218 拷贝/ml,虽然只有 1 例标本,但在一定程度上可以说明问题。推测原因是由于甲亢患者新陈代谢旺盛,细胞凋亡的速度加快,所以血液中 DNA 浓度高于常人。乙肝活动期患者可能由于病毒入侵肝细胞,加速了细胞凋亡的速度,所以血浆中 DNA 的浓度也略高于正常女性。可见不仅是妊娠状态下血浆中游离 DNA 分子增多,推断任何疾病或生理状态下,只要能加快体内新陈代谢速度,血浆中 DNA 分子含量都会增高,但是这种 DNA 分子的增多没有特异性。因此,如果有针对特定疾病的 DNA 分子标志物,其分子生物学特性可为早期诊断特定疾病(如癌症)提供一定的依据。因外,通过对 13 例体检异常的非妊娠女性检测血浆游离 DNA 研究发现,血浆游离 DNA 还有助于其他疾病的早期发现,比如可以提示患者做全身检查,早期发现疾病。

总之,本实验通过对母体血浆游离 DNA 中母体和胎儿游离 DNA 分子的差异进行研究,为胎儿 DNA 的富集提供新的思路,同时为胎儿分子标志物的研究也提供了一定的依据。

参考文献:

[1] Lo Y M, Corbetta N, Chamberlain P F, *et al*. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997, 350 (9076): 485-487.

[2] Lo Y M, Tein M S, Lau T K, *et al*. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis[J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(4): 768-775.

[3] Hahn S, Jackson L G, Kolla V, *et al*. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidies and Mendelian disorders: new innovative strategies [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2009, 9(6): 613-621.

[4] Amaral D R, Credidio D C, Pellegrino J Jr, *et al*. Fetal RHD genotyping by analysis of maternal plasma in a mixed population[J]. J Clin Lab Anal, 2011, 25(2): 100-104.

[5] Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, *et al*. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms[J]. Clin Chem, 2004, 50(6): 1002-1011.

[6] 郝颖, 徐志勇, 金晴, 等. 一种新的β地中海贫血基因突变类型的分子诊断和产前基因诊断[J]. 中华血液学杂志,2011,32(4): 245-248.

[7] Li Y, Holzgreve W, Hahn S. Size fractionation of cell-free DNA in maternal plasma and its application in noninvasive detection of fetal single gene point mutations[J]. Methods Mol Biol, 2008, 444: 239-251.

[8] Jahr S, Hentze H, Englisch S, *et al*. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(4): 1659-1665.

[9] Holdenrieder S, Stieber P, Forg T, *et al*. Apoptosis in serum of patients with solid tumours[J]. Anticancer Res, 1999, 19(4A): 2721-2724.

[10] Fan H C, Blumenfeld Y J, Chitkara U, *et al*. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing[J]. Clin Chem, 2010, 56(8): 1279-1286.

[11] Chan K C, Zhang J, Hui A B, *et al*. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2004, 50(1): 88-92.

[12] Lun F M, Tsui N B, Chan K C, *et al*. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(50): 19920-19925.

[13] Hahn T, Drese K S, OSullivan C K. Microsystem for isolation of fetal DNA from maternal plasma by preparative size separation[J]. Clin Chem, 2009, 55(12): 2144-2152.

[14] Lau T K, Chen F, Pan X, *et al*. Noninvasive prenatal diagnosis of common fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma DNA sequencing[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012, Feb 24. [Epub ahead of print]

[15] Chitty L S, Griffin D R, Meaney C, *et al*. New aids for the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia: dysmorphic features, charts of fetal size and molecular confirmation using cell-free fetal DNA in maternal plasma[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2011, 37(3): 283-289.

(**收稿**:2011-10-31;**修回**:2011-12-01)

(编辑 邓强庭)