DOI:10.16016/j.1000-5404.201410169

短篇论著

多重荧光定量PCR技术在唐氏综合征筛查中的应用

张丹妍[1,2],官 燮[1],苏 燕[3],杨玉有[1],赵乐天[1],李练兵[1],杨 柳[1] (400020 重庆,国家卫生计生委出生缺陷与生殖健康重点实验室,重庆市人口和计划生育科学技术研究院[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部医学遗传学教研室[2];400016 重庆,重庆医科大学公共卫生学院生殖生物学教研室[3])

[摘要] **目的** 探讨多重荧光定量PCR技术在唐氏综合征筛查中的应用。**方法** 针对21号染色体上的D21S1409、GATA163G03、D21S1422、D21S1435基因座设计荧光引物,通过复合扩增,利用ABI3130遗传分析仪检测212个正常个体样本、6个唐氏综合征患儿家庭样本,并比较患儿家庭样本的外周血染色体核型结果,评价该技术的准确性。**结果** 选取的4个STR基因座的杂合度(H>0.64)、识别能力(DP>0.802)和信息量(PIC>0.58)均较高。检测的6个疑似唐氏综合征患儿家庭样本结果与染色体核型提示结果一致。**结论** 多重荧光定量PCR技术具有较高的敏感性和特异性,可用于唐氏综合征的高通量快速筛查。

[关键词] 多重荧光定量PCR;唐氏综合征;短串联重复序列;D21S1409;GATA163G03;D21S1422;D21S1435

[中图法分类号] R446.9;R714.5;R742.89 [文献标志码] A

目前,唐氏综合征(Down's syndrome,DS)筛查主要用化学发光法结合专门风险评估软件分析,假阳性和假阴性都比较高[1-3]。国内诊断DS以染色体核型分析和荧光原位杂交技术为主,所需时间长,对专业人员的自身技术要求高[4-5];而荧光定量PCR(quantitative fluorescent PCR,QF-PCR)分析短串联重复序列(short tandem repeat,STR),因其快速、准确、相对便宜,在国外成为最常应用的快速产前诊断方法之一。由于QF-PCR只能针对目标染色体的数目异常,故不能完全替代传统核型分析[6-8]。近年来,全基因组拷贝数变异分析技术也逐步应用于遗传病诊断,尽管它能很好地判断基因组变异情况,但成本高,检测时间也较长。因此,本研究针对21号染色体,选取遗传信息高的多个STR基因座,通过多重QF-PCR复合扩增疑似唐氏综合征患儿家庭样本和正常样本,利用ABI3130遗传分析仪检测;同时比对其外周血染色体核型分析结果,评价多重QF-PCR技术在唐氏综合征筛查中的准确性及其应用价值。

1 资料与方法

1.1 样本

212例重庆地区无关汉族个体的血样来自重庆市正鼎鉴定所2009-2013年工作积累样本,用于构建基因座等位基因分型标准物及评价基因座的多态性。以去离子水为阴性对照,已知核型正常样本为健康对照;6个疑似唐氏综合征患儿家庭血样(共18个样本)为待测样本,来自重庆市人口和计划生育科学技术研究院2009-2012年进行的8 889例病残儿医学鉴定。待测家庭患儿具有类似唐氏综合征的临床特征(如特殊面容、智力低下),需进行染色体核型检测确认是否唐氏综合征。每个样本采集4~5 mL全血,EDTA-Na_2抗凝,4 ℃保存。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取 采用北京百泰克公司全血基因组DNA快速提取试剂盒提取基因组DNA。

1.2.2 多重荧光定量PCR扩增 针对D21S1409、GATA163G03、D21S1422、D21S1435这4个基因座设计引物,经上海英骏公司合成(表1)。PCR扩增总反应体系为25 μL,其中含H_2O 9.875 μL,混合引物

[基金项目] 重庆市科委基本科研业务费计划项目(2012cstc-jbky-01706,2012cstc-jbky-01708)

[通信作者] 杨 柳,E-mail:lily882@tom.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150123.1101.001.html(2015-01-23)

1 μL、*Taq* 酶 0.125 μL、dNTP 和 Buffer-$MgCl_2$ 混合物 12.25 μL、DNA 1.5 μL。PCR 反应条件为 95 ℃预变性 5 min;94 ℃ 30 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 45 s,共 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃保存备用。

1.2.3 ABI3130 分析仪检测 取 1 μL PCR 扩增产物与 9 μL 上样液(含 LIZ-500)混匀,变性后通过 ABI 3130 遗传分析仪电泳。

表 1 引物序列及荧光标记

基因座	引物序列(5′→3′)	染料名称	荧光颜色
D21S1409	上游:GGAGGGAATACATTTGTGTAGGTA	6-FAM	蓝色
	下游:CTCTTTGTCTCTTGGAACATACGC		
GATA163G03	上游:GAGGGTTCCCTAGAGAGACAGAT	6-FAM	蓝色
	下游:CTCAAGACTCAAACTGGCTCTCT		
D21S1422	上游:GCACCCCTTTATACTTGGCTGT	Alexa	绿色
	下游:AAGACTTCTCGATCTCCAGAATCAC	Fluor 532	
D21S1435	上游:CCTCTCCAATTGTTTGTCTACCCT	Alexa	黄色
	下游:GCAAGAGATTTCAGTGCCATCAAG	Fluor 546	

1.2.4 阳性判断标准 每个 STR 基因座检测出现约 1∶1∶1等比例峰或 2∶1(或 1∶2)峰为相应染色体的三倍体,出现单峰为无意义峰,两个峰值比例在大于 0.65 或小于 1.8 间或图形难以判断属于不明确意义峰。本研究判定单样本出现 1 个等比例三峰或 1 个以上 2∶1(1∶2)峰为筛查结果阳性,其余为筛查结果阴性。

1.3 *数据分析*

数据分型采用 GeneMapper ID v4.0 软件。应用 Modified-powerstate、SPSS 18.0 软件进行数据统计及 Hardy-Weinberg 平衡检验。

2 结果

2.1 *基因频率及群体遗传数据*

重庆地区汉族群体这 4 个 STR 基因座的等位基因及基因频率见表 2。其基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律($P>0.05$)。本研究的 4 个 STR 基因座的观察杂合度为 0.731 ±0.051,理论杂合度为 0.725 ±0.035;匹配概率值为 0.128 ±0.028,多态信息含量值为 0.680 ±0.086;个体识别能力和非父排除率值分别为 0.872 ±0.028 和 0.491 ±0.084。这 4 个基因座的杂合度(H>0.64)、识别能力(DP>0.802)和信息量(PIC>0.58)均较高(表 3)。

表 2 4 个 STR 基因座的等位基因及基因频率($n=212$)

等位基因	D21S1409	GATA163G03	D21S1422	D21S1435
4			0.004 7	
5			0.014 2	
6			0.073 1	0.096 7
7			0.103 8	0.325 5
8		0.002 4	0.240 6	0.231 1
9	0.434 0	0.025 9	0.309 0	0.240 6
10	0.009 4	0.221 7	0.158 0	0.094 3
11	0.009 4	0.450 5	0.068 4	0.011 8
12	0.188 7	0.235 8	0.021 2	
13	0.358 5	0.044 8	0.007 1	
14		0.011 8	0.004 7	
15		0.007 1	0.014 2	

表 3 4 个 STR 基因座的遗传学数据($n=212$)

基因座	D21S1409	GATA163G03	D21S1422	D21S1435
等位基因数	5	8	12	6
基因型数	11	19	31	16
Ho	0.646	0.642	0.835	0.802
He	0.647	0.689	0.800	0.764
Pm	0.198	0.142	0.070	0.101
DP	0.802	0.858	0.930	0.899
PIC	0.580	0.640	0.770	0.730
PE	0.350	0.344	0.665	0.603
P 值	0.935	0.118	0.230	0.219

Ho:观察杂合度;He:理论杂合度;Pm:匹配概率;DP:个体识别能力;PIC:多态信息含量;PE:非父排除率

2.2 *待测样本的检测结果及染色体检查结果*

18 个样本的 4 个 STR 基因座的分型结果峰形均较好,清晰,可清楚判断型别。18 个样本的染色体核型结果由重庆市人口和计划生育研究院实验中心提供。2~6 号家庭的疑似患儿均出现 3 个检测峰,1 号家庭患儿虽然没有出现 3 个峰,但是 D21S1422 基因座检测结果 8 与 10 的峰值比为 3∶1,可判定为阳性。根据所检测的结果对待测样本进行判定,提示这 6 个家庭的小孩均为唐氏综合征,而他们的父母是正常。这与染色体检查结果相一致(表 4)。单个 STR 检测的阳性率为 17%~83%,4 个 STR 组合的阳性检出率约为 100%。

表 4 6 个家庭待测样本的检测结果及染色体检查结果

序号		染色体核型	基因型			
			D21S1409	GATA163G03	D21S1422	D21S1435
1	F	46,xy	9[a],12	11,11	8,9	7,8
	M	46,xx	9,11	11,12	9,10	8,9
	C	47,xy,+21/46,xy	9,9	11,11	8,10(3:1)[b]	8,8
2	F	46,xy	9,9	10,10	7,9	7,8
	M	46,xx	9,13	11,12	8,8	7,9
	C	47,xy,+21	9,13	10,11,12	7,8	7,8,9
3	F	46,xy	9,13	11,11	8,11	7,7
	M	46,xx	12,13	10,11	9,10	7,7
	C	47,xy,+21/46,xy	9,12,13	10,11	9,10,11	7,7
4	F	46,xy	12,13	12,12	9,9	7,7
	M	46,xx	13,13	10,10	7,8	8,9
	C	47,xy,+21	12,13	10,12	7,8,9	7,8,9
5	F	46,xy	9,13	12,13	9,11	8,9
	M	46,xx	9,12	11,12	8,8	7,8
	C	47,xx,+21	9,13	10,11	5,6,9	7,8,10
6	F	46,xy	9,13	11,11	6,9	7,9
	M	46,xx	9,12	12,12	7,10	7,10
	C	47,xx,+21	9,12,13	11,12	6,7,10	7,10(2:1)[a]

F:父亲;M:母亲;C:小孩;a:STR 重复碱基次数;b:峰值比

3 讨论

目前,对于染色体数目或结构异常,主要以染色体核型分析为金标准,但是其操作繁琐,检验周期长,对技术人员核型分析能力依赖性大[9-10]。其次,全基因组拷贝数分析法可以对全基因组拷贝数变异进行分析,但是该方法依赖公司芯片及大型分析设备,成本高,操作复杂,数据信息量大以致分析相对复杂[11]。本研究所采取的方法原理类似从全基因组探针中挑取出针对 21 号染色体部分探针,这样可以过滤很多与唐氏综合征的无关数据,检测迅速,分析简单,最快在 1 d 内即可完成。

本研究对 6 个家庭样本检测,均发现特异性的检测峰 1:1:1等比例峰或 2:1(或 1:2)峰现象,与染色体核型分析诊断结果进行比对,判别一致。国内学者正初步应用 QF-PCR 法进行唐氏综合征研究,张静等[12]用 4 个 STR 检测 178 例羊水标本,单个 STR 检测的阳性率为 50% ~72.2%,4 个 STR 组合的阳性检出率约为 100%;杨昕等[13]用 7 个 STR 检测检测 250 例羊水标本,单个 STR 检测的阳性率为 50% ~83%,4 个 STR 组合的阳性检出率约为 90%,7 个 STR 同时检测时阳性率可达 100%。因此,选取的 STR 基因座数量和其遗传效能、突变概率等直接影响到结果的准确性,该技术应用于羊水产前诊断仍然需要进行深入研究。另外,嵌合体样本其嵌合比例大小,也将影响扩增的效果,可能产生漏检[14]。

QF-PCR 法应用于产前诊断如何避免假阳性和漏检需进一步研究探讨,建议制定规范化流程和标准。由于本研究病例数较少,后期仍然需要扩大样本检测量和检测有效基因座的数目进一步验证和规范基因型判定及定量分析标准。

参考文献:

[1] 刘丽华, 卢小青, 刘聪慧, 等. 5823 例孕妇孕中期唐氏综合征产前筛查结果分析[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(7): 1069-1070.

[2] Ulate-Campos A, Nascimento A, Ortez C. Down's syndrome and epilepsy [J]. International Medical Review on Down Syndrome, 2014, 18(1): 3-8.

[3] 陆伟, 段胜昔, 何丽丹, 等. 2128 例孕妇唐氏筛查检测结果分析[J]. 中国伤残医学, 2013, 21(9): 206-207.

[4] 王成宇. 唐氏筛查法在高龄孕产妇产前诊断中的应用价值[J]. 求医问药, 2013, 11(3): 294.

[5] 胡美红, 刘雨生, 何国平, 等. 羊水细胞培养及染色体核型分析在产前诊断中的应用[J]. 临床输血与检验, 2011, 13(1): 23-25.

[6] 杨雪, 郑琳, 郑慧玲, 等. 荧光原位杂交技术在羊水细胞染色体非整倍体产前诊断中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(11): 39-40.

[7] 刘翠翠, 俞冬熠, 王修海. FISH 和 QF-PCR 在胎儿染色体疾病的快速产前诊断中的应用研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(5): 40-42.

[8] Sun L, Fan Z, Weng X, *et al*. Rapid detection of Down's syndrome using quantitative real-time PCR(qPCR) targeting segmental duplications on chromosomes 21 and 11[J]. Gene, 2014, 552(2): 272-276.

[9] Heywood W, Mills K, Wang D, *et al*. Identification of new biomarkers for Down's syndrome in maternal plasma [J]. J Proteomics, 2012, 75(9): 2621-2628.

[10] Faas B H, Cirigliano V, Bui T H. Rapid methods for targeted prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies [J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2011, 16(2): 81-87.

[11] 李世音, 周浩, 秦海涛, 等. 单基因遗传病与拷贝数变异的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(16): 2881-2884.

[12] 张静, 霍满鹏, 慕明涛, 等. 应用 STR-荧光定量 PCR 行产前唐氏综合征诊断的初步研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(12): 39-40, 11.

[13] 杨昕, 廖灿, 黄以宁, 等. 荧光定量 PCR 产前快速诊断唐氏综合征可行性研究[J]. 现代妇产科进展, 2006, 15(8): 599-602.

[14] 李发涛, 廖灿, 李焱, 等. 应用 QF-PCR 技术快速检测 2275 例胎儿常见染色体非整倍体结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2014, 22(3): 39-41.

(**收稿**:2014-10-28;**修回**:2014-12-03)

(编辑 汪勤俭)