维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)03-0289-03

从孕妇外周血中捕获胎儿遗传信息的方法学探讨

朱 静[1]，邓 兵[1]，王宁遂[1]，周 瑾[2]，康格非[3]

（1. 重庆医科大学儿科研究所 重庆 400014；2. 重庆医科大学第二临床学院妇产科 重庆 400010；
3. 重庆医科大学检验系 重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨从孕妇外周血细胞中检测胎儿基因组DNA和血浆中捕获胎儿游离核酸方法的实用性。方法：在SRY基因高保守区设计两对性别特异性引物，利用巢式聚合酶链反应(nest-PCR)分别对50例孕妇外周血胎儿基因组DNA和血浆中游离核酸进行特异性扩增，聚丙烯酰胺凝胶电泳分析(PAGE)，DNA测序验证扩增产物的准确性。结果：50名孕妇中28名分娩男婴，22名分娩女婴。SRY基因片段阳性检出率：基因组为75%（21/28）；游离核酸组为32%（9/28）。22名分娩女婴者除1例基因组检测结果阳性外，其余均为阴性结果。本研究检测系统灵敏度为52.8pg/μl。结论：孕妇外周血中胎儿基因组DNA和游核酸检测可作为产前基因诊断的途径，两者联合应用有助于提高胎儿遗传信息的检出率。

【关键词】孕妇外周血；胎儿遗传信息；巢式聚合酶链反应；产前基因诊断

【中国图书分类法分类号】R715.5；R694 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-09-10

Exploration to the approach of detecting fetal genetic information in maternal peripheral blood cell and plasma

ZHU Jing, et al

(Pediatric Research Institute , Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: This study was to explore the feasibility of detecting fetal genetic information in maternal peripheral blood cell and plasma. *Methods*: The specific fragment of SRY gene was amplified by nest-PCR in peripheral blood eukaryotic cells and plasma from 50 pregnancies. Then the PCR produces were identified by DNA sequence. *Results*: 28 boys and 22 girls were born from 50 pregnancies. SRY gene specific fragment was detected in maternal peripheral blood eukaryotic cell from 21 (75%) of the 28 pregnancies with male fetuses and in maternal plasma from 9 (35%) pregnancies with male fetuses. However, positive SRY signal in maternal blood eukaryotic cell was seen in only one of 22 pregnancies with female fetuses. *Conclusion*: Detecting fetal DNA from maternal peripheral blood could be a feasible and safe approach of non-invasive prenatal diagnosis. Our data demonstrate that it will be more effective to detect the fetal genetic information by combining analysis of eukaryotic cells and plasma from maternal peripheral blood.

【Key words】Maternal peripheral blood; Fetal genetic information;Nest-PCR; Prenatal diagnosis

对于性连锁遗传病产前诊断而言，确定胎儿性别是一重要环节。本研究利用巢式聚合酶链反应（Nested PCR）从直观的胎儿性别鉴定入手，探讨孕妇外周血细胞基因组DNA和血浆游离核酸中检测胎儿遗传物质，以明确其在无创性产前基因诊断中应用的可行性。

1 对象与方法

1.1 实验组

重庆医科大学第二临床学院产科围产保健孕妇50例（8～40孕周），其中早孕期(＜12周)4名，中孕期（13～28周）10名，晚孕期（29～40周）36名；对照组：市三院门诊体检正常男性20人，正常未孕女性20人。两组人员均取外周抗凝血5ml（枸橼酸钠109mmol/L，1:9），控制在3h内分离，血浆立即-20℃冻存备用。

1.2 基因组的提取

分离的有核细胞，采用饱和氯化钠-氯仿抽提系统提取基因组DNA，以适量TE溶解备用。血浆标本采用本室自行研制的吸附剂处理后，洗脱，取10ul洗脱液参加反应。

1.3 引物

设计两对Y染色体SRY基因高保守区特异性巢式引物，

作者介绍：朱 静（1967- ），女，主管检验师。
主要研究方向：小儿遗传性疾病。

基金项目：重庆市科委应用基础项目，编号[2001]54-66.

维普资讯 http://www.cqvip.com

其序列分别是:

P3（上游引物） 5'-GAATATTCCCGCTCTCCGGAG -3'

P4（下游引物） 5'-ACC TGTTGTCCAGTTGCACT - 3'

作为第一轮PCR引物，扩增片段长419bp;

P5（上游引物） 5'-ACTCAGAGATCAGCAAGCA-3'

P6（下游引物） 5'-CTTCCGACGAGGTCGATAC-3'

作为第二轮PCR引物，扩增片段长143bp。

1.4 扩增体系及循环参数

首轮扩增按25μl反应系统，其中包括10X缓冲液2.5μl；Mg^{2+}浓度控制在2.5mmol/L；dNTPS终浓度为20μmol/L；引物工作浓度20pmol/L，取0.5μl；DNA模板加量，细胞基因组DNA为2μl，血浆游离核酸组为10μl；Taq酶1U/每反应。循环温度94℃ 45s，58℃ 45s，72℃ 1min，35次循环。第二轮扩增Mg^{2+}浓度降至1.5mmol/L；DNA模板取上轮扩增产物5μl，其余同前。经94℃ 5min预变性后，温度降到80℃，加入Taq酶1U/每反应作热启动，循环温度94℃ 45s，62℃ 1min，30次循环。6%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增结果。

1.5 扩增体系灵敏度检测

对照组男性和女性基因组DNA标本各一，适量TE溶解，紫外检测定量。用女性基因组DNA作为稀释液，倍比稀释，使男性基因组DNA在女性基因组DNA中呈一定的梯度浓度构成，所能检出的反应管最低限为此反应体系的灵敏度计算公式:

男性基因组DNA稀释后浓度C_n= 起始管浓度C_0（μg/μl）×（1/2）^{n};

第n管女性基因组DNA浓度C_n = 起始管浓度C_0（μg/μl）×[1+（1/2）^{n}];

第n只稀释管两者比值 =（1/2）$^n C_0$（男性）/ [1+(1/2)^n] C_0（女性）

1.6 特异性实验

对照组20名正常男性和20名正常未孕女性基因组DNA，经紫外检测定量，稀释成常规工作浓度0.5～2μg/μl后即按前面叙述程序进行巢式扩增，视结果进行评定。

1.7 扩增产物序列分析

送上海基康生物制品有限公司进行，检出的结果与原始序列比对，以验证扩增片段的准确性。

2 结 果

受检者出生证实为男婴的有28人，胎儿细胞基因组检出为阳性结果的21人，血浆游离核酸组阳性结果为9人，检出率分别为75%和32%。其中(1)两组均为阳性有7人；(2)2人血浆游离核酸检出为阳性结果，细胞基因组检出为阴性结果；(3)14人细胞基因组检出为阳性，血浆游离核酸组为阴性。受检者出生证实为女婴的有22人，除1人细胞基因组检出为阳性外，其余均为阴性结果（见图1、2）。

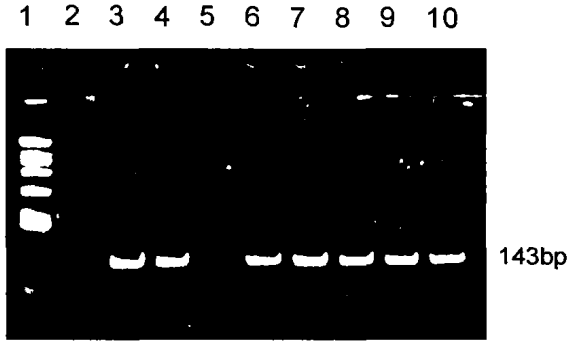


图1 血浆标本游离核酸SRY基因巢式PCR检测的结果（3～10），2为空白对照，1为分子量标准

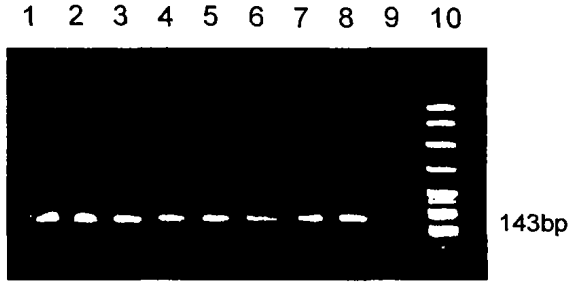


图2 同样标本经胎儿有核细胞基因组DNA SRY基因巢式PCR检测的结果

检出的最低极限，即灵敏度为52.8pg/μl(见图3)。男性起始管浓度为14μg/μl，女性为10μg/μl，所以此管对应的男性基因组DNA浓度经公式计算，得出它在整个稀释体积中所占的比例约为1:180000。

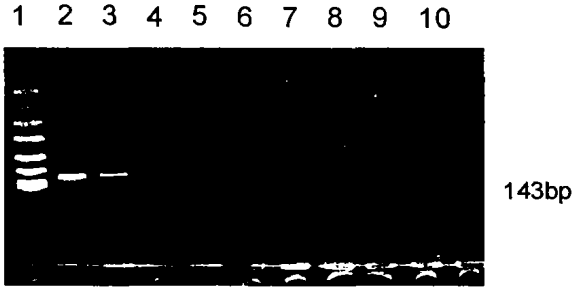


图3 灵敏度检测部分结果显示1为分子量标准，2～10男性DNA浓度分别为0.875μg/μl, 50ng/μl, 3.4ng/μl, 1.7ng/μl,110pg/μl,52.8pg/μl,26.4pg/μl,13.2pg/μl,6.6pg/μl

特异性实验检测对照组20个正常男性标本均为阳性结果，而20个未孕女性标本均为阴性结果，说明此反应体系有较强的特异性。

经上海基康生物工程有限公司测序结果，与原始序列比对，可以判断扩增产物确为SRY基因片段。

3 讨 论

维普资讯 http://www.cqvip.com

孕妇外周血中存在胎儿细胞已有明确的报道。自1997年Y.M.Lo等提出“无宿主游离核酸”（non-host cell free DNA）概念以来，可否应用于产前基因诊断确引起了一些讨论[1]。尽管聚合酶链式反应是一种十分灵敏的检测技术，但由于孕妇外周血中胎儿遗传信息含量极低，对检出率影响较大。据资料估计，孕妇外周血中胎儿的有核细胞所占比例约为0.04%～0.23%，甚至有人认为可能小于0.01%[2]；而血浆中游离核酸的检测却又受限于其结构的完整性，当胎儿细胞经过胎盘屏障，细胞整体结构或被母体的免疫机制所破坏，或由于机械作用而破裂，基因组释放，进入孕妇血液循环，再经自身凋亡或机械性断裂，必然造成检测的结果受诸多偶然因数影响，当未能捕捉到特异性片段模板时，很可能导致检测结果的假阴性。

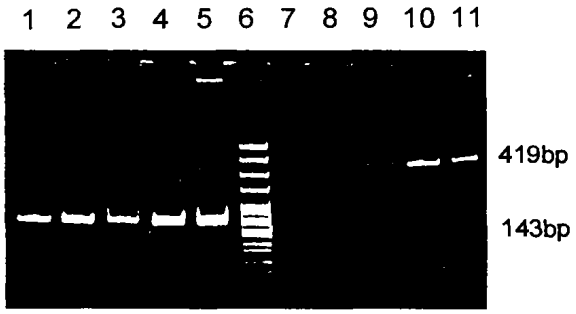


图4 1～5为SRY引物P3/P4单扩增结果显示，6为分子量标准，7～11为同样标本经P5/P6巢式扩增后结果显示。

在以往单扩增的基础上，本研究选用巢式扩增的方法，以增加检测的特异性和灵敏度（见图4），而且对于游离核酸，通过这种方式还可以扩大特异性的模板背景，进而达到提高检测率的目的。本研究考虑到微量检测系统的影响因素，进行了相应的实验条件摸索。首先，引物的设计选择Y染色体SRY高保守区域进行，已有研究证明，在染色体上只要缺失了SRY区域，个体就会发育成女性；其次，利用热启动，不仅可以增加PCR的特异性，还能增加其敏感性，并减少了引物二聚体的形成和引物的自我复制；第三，经实验降低了dNTPS的浓度以增加PCR产量，调节特异性与合成忠实性间的平衡。通过实验，细胞基因组检测比较稳定，检测率基本同于以往资料报道。但血浆游离核酸组检测结果与相关的报道出入较大。据Y.M.Lo研究小组进行的孕妇外周血胎儿游离核酸检测报道，经单引物扩增SRY基因，阳性检出率平均为70%～80%[3]。正因如此，他于1997年提出了“无宿主游离核酸”的概念，将孕妇外周血中的胎儿游离核酸应用于如性别，RH血型检测[3]。1999年8月法国门松举行的“第一届世界游离核酸应用大会”上，孕妇外周血中的胎儿游离核酸应用有一专题讨论[4]。有研究是利用荧光定量聚合酶链式反应对孕妇血浆中胎儿DNA的浓度进行定量监测，结果平均为3.4%～6.2%，并且随孕龄的增加浓度也增加，到分娩前有的竟高达12倍[5]。经本研究证实，血浆游离核酸组处于中、晚期妊娠标本的阳性检出率（40%）高于早期(12.5%)，提示，随着孕龄的增加胎儿游离核酸确有增加的趋势，分析可能与进入晚期妊娠，胎盘通透性增大，胎儿的遗传物质更易穿过胎盘屏障，释放入母血有关。胎儿细胞在孕妇体内滞留的时间看法不一，有人认为在产后8周即消失，有的却认为可在母体内存在几十年[6]。本研究中1名分娩女婴者出现阳性结果，分析与此原因有关。随着优生优育研究工作的不断深入，我们可以清楚的认识到，无创性产前基因诊断在遗传性疾病研究中显得尤为重要。本课题证明，通过孕妇外周血血浆可以捕获胎儿的遗传信息。联合有核细胞及血浆检测，有助于提高阳性检出率。

参 考 文 献

[1] Diana W. Bianchi.Fetal DNA in maternal plasma:The plot thickers and the placental barrier thins[J]. Am.J.Hum.Genet, 1998;62:763-764.

[2] Hiromi Hamada, Tadao Arinami, Takeshikubo, et al. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood:frequency and relationship to gestational age[J]. Human Genetics, 1993;91:427-432.

[3] Y.M.Dennis.Lo, N.Magnus Hjelm, Carrie Fidler, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma[J]. The New England J.Med, 1998;339(24): 1734-1738.

[4] Fleischhacker M. Meeting report-First international symposium on circulating nucleic in plasma/serum implication in cancer diagnostics,prognosis or follow up and in prenatal diagnosis-Menton France,August 18-20,1999[J]. Eur J Med Res, 1999;4(11)488-490.

[5] Y.M.D.Lo, Mark S.C.Tein, Tze K.Lau, et al. Quantitative analisis of fetal DNA in matarnal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis[J]. Am J.Hum. Genet, 1998;62:768-775.

[6] Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996;93:705-708.