

desorption/ionization imaging mass spectrometry for analyzing detailed patterns of phospholipid molecular species[J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(18):7096-7101.

[8] Groseclose MR, Andersson M, Hardesty WM, et al. Identification of proteins directly from tissue: in situ tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 2007, 42(2):254-262.

[9] Cornett DS, Reyzer ML, Chaurand P, Caprioli RM. MALDI imaging mass spectrometry: molecular snapshots of biochemical systems[J]. Nat Methods, 2007, 4(10):828-833.

[10] 黄波, 黄文方, 卢贤瑜. 表面增强激光解析电离飞行时间质谱血

清蛋白指纹图谱在肿瘤诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(10):944-946.

[11] Corbin BD, Seeley EH, Raab A, et al. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses[J]. Science, 2008, 319(5):962-965.

[12] Hsieh Y, Casale R, Fukuda E, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry for direct measurement of clozapine in rat brain tissue[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20(6):965-972.

(收稿日期:2010-05-10)

• 综 述 •

孕妇血浆中胎儿游离 DNA 用于产前诊断的研究进展

杜华荣 综述, 尹耕心, 傅克勤 审校
(安徽省计划生育科学技术研究所, 安徽合肥 230031)

关键词: 产前诊断; 胎儿; DNA; 孕妇; 血浆; 胎儿研究; 聚合酶链反应
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.04.019 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2011)04-0472-03

产前诊断是指在胎儿出生前利用各种方法诊断胎儿是否患有某种遗传病或先天性疾病的一种手段,是出生缺陷工作的重要任务,对于提高我国出生人口的素质有着特别重要的意义。现在的产前诊断技术大部分都属侵入性检查,有引起孕妇发生自然流产的危险,另外取材也受怀孕月份的限制。超声波检查虽然是非侵入性产前诊断的较好方法,只是诊断结果可能存在误差。开展非侵入性的准确的检测手段是广大高危孕妇的迫切需要。1997 年研究人员首次证实孕妇血浆(清)中存在游离的胎儿 DNA,并将其用于性连锁遗传病的产前诊断,为无创性产前诊断开辟了新的途径^[1-2]。现就孕妇血浆中游离 DNA 的产生的可能机制、提取及在临床的应用作简要综述。

1 孕妇血浆中游离胎儿 DNA 产生的可能机制

早在 1996 年,科学家们就已经发现从肿瘤患者的血浆中可以查出肿瘤 DNA。Lo 等^[1]认为,胎儿 DNA 对母体而言,也是外源性的,这同肿瘤患者的情况相类似。据此推测,孕妇血浆中也应该存在胎儿 DNA,并于 1997 年首次证实了这种推测,从孕 10 W 以后的孕妇血浆中检测到 Y 特异性 DNA,表明胎儿 DNA 在妊娠早期就能进入母体循环中并存在于整个妊娠过程中。母体血浆中游离胎儿 DNA 在分娩后以 2.24×10^4 拷贝快速消失,暗示游离胎儿 DNA 是大量地自由地连续在母体血液循环中释放^[3],但是目前对于孕妇血浆中胎儿 DNA 的来源尚未完全阐明,一般认为有以下 3 种可能:(1)来源于母体血液中的胎儿造血细胞。据推测,可能是胎儿细胞通过胎盘或其他胎儿-母体运送途径进入母液循环,在那里它们大部分发生凋亡转变,进而释放出游离胎儿 DNA^[4]。(2)来源于胎盘滋养层细胞。妊娠 18 天后,在绒毛膜滋养层的间叶细胞中可以检测到游离胎儿 DNA,而此时母体血液中尚未存在游离胎儿 DNA。因而有学者提出胎儿 DNA 可能是由胎盘滋养层细胞的胎儿-母体接触面被母体的免疫系统破坏后直接释放至母体血液,因为在胎盘循环发育完全时,有 80% 的孕妇血浆中能检测到胎儿 DNA。另外,在绒毛膜滋养层中的细胞在原位凋亡时,也可能释放至母体血液中。(3)来源于母婴转运。胎盘转运物质是双向的。羊水中胎儿 DNA 的浓度是孕妇血浆中的 200 倍,这种浓度梯度使得 DNA 分子可能通过胎盘和膜发生

直接转运^[5]。

2 母血浆中游离胎儿 DNA 的抽提

母血浆中含有游离胎儿 DNA 成分,但目前特异的胎儿 DNA 标记物很少,因此只有在胎儿所含的致病 DNA 与母体不同时才能检测出来;另一方面,尽管相对完整细胞而言孕妇血浆中游离胎儿 DNA 较丰富,但其仅占母体血浆 DNA 总量的 3%~6%,而无创伤性产前基因诊断在临床的广泛应用依赖于较高浓度的游离胎儿 DNA 及胎儿 DNA 的特异性标记。因此限制了游离胎儿 DNA 在临床中的应用。这两年来有些学者开始了这方面的研究。在提取胎儿 DNA 之前,对血液进行预处理,不同的血液预处理方法对孕妇血浆中游离胎儿 DNA 的百分含量有明显的影响。有学者用甲醛预处理孕妇外周血,通过减少母体血细胞的溶解来减少游离母体 DNA,从而提高孕妇外周血中游离胎儿 DNA 的百分含量,然而也有学者认为经甲醛处理的血浆无论用任何方法,都不能得到 RNA 的扩增,即甲醛处理的血浆不能用于对 RNA 的研究^[6]。有学者将孕妇外周血经 EDTA 抗凝之后,以离心半径 8 cm, 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液重复离心 1 次,然后按照血样 DNA 提取试剂盒(QIA amp DNA blood mini, Qiagen)说明书中血液或体液 DNA 的提取方案提取 DNA,这种方法是目前最为常用的提取方法^[7]。除此之外,目前用于提取胎儿 DNA 的方法还有煮沸法和改良的酚/氯仿法等。提取后的 DNA 可以用于巢式 PCR 技术,实时荧光定量 PCR 技术,变性高效液相色谱技术等方法进行相关检测。

3 母血中胎儿 DNA 在产前诊断中的临床应用

3.1 在新生儿溶血性疾病中的应用 新生儿溶血病是指母婴血型不合,母血中对胎儿红细胞的免疫抗体 IgG 通过胎盘进入胎儿循环,发生同种免疫反应导致新生儿红细胞破坏而引起的溶血。新生儿溶血病以 ABO 血型系统不合最为多见,其次是 Rh 血型系统不合。其中以后者的危害更大一点。Rh 血型系统不合是由于来自胎儿 RhD 阳性红细胞进入了 RhD 阴性母体的血循环,导致其产生免疫抗体,该抗体能通过胎盘进入胎儿血循环,引起胎儿发病,症状从轻度贫血到严重溶血性反应,甚至宫内死亡。RhD 阴性的孕妇,若其血浆或血清中存在胎

儿来源的 RhD 序列,则表明这是一个 RhD 阳性胎儿^[8-9]。此方法已被许多研究小组应用,他们将 RhD 基因的不同区带作为靶序列,检测的结果均与产后检测一致,证实了此法尤其是在孕中期的可靠性^[10]。另外,也有学者也建立了可以检测 RhC、E、K 的血型系统^[11-12]。

3.2 胎儿性别鉴定及性连锁遗传病的预防 巢式 PCR 检测胎儿 DNA 的原理是针对某一个待测基因,设计两对特异性引物,其中一对巢居于另一对引物的扩增产物内部。即先用外侧引物进行 PCR 扩增,获得一定量的产物后再用另一对内引物进行扩增。由于进行了 2 次扩增,使 PCR 反应的灵敏度和特异性都得到提高。根据这一原理,有学者对 73 例妊娠 26~41 周的孕妇血浆中胎儿的性别决定区(SRY)基因进行检测分析,准确率为 91.78%(67/73),敏感性为 97.37%(37/38),特异性为 85.71%(30/35)。因此,巢式 PCR 技术可用于性别鉴定,预防性连锁遗传性疾病^[13]。有学者从 56 例首次妊娠男胎的孕妇血浆中分离胎儿 DNA,用实时荧光定量 PCR 检测 Y 染色体上的 SRY 基因,结果 23 例妊娠男胎的孕妇血浆中,20 例 SRY 基因阳性;33 例妊娠女胎的孕妇血浆中,SRY 基因均为阴性^[14-15]。因此,实时荧光定量 PCR 技术用于性别鉴定具有很高的准确性,在进行无创性产前性别诊断中有重要的价值。有学者采用多重荧光 PCR 反应技术检测胎儿 DNA 的短串联重复序列,进行无创性产前诊断胎儿性别。通过不同方法检测孕妇血浆中胎儿 DNA 可以准确地鉴定胎儿性别,这为进一步诊断胎儿是否患有性连锁遗传性疾病提供了诊断基础,还可以用于定量甲基化分析^[16-18]。

3.3 在其他疾病中的应用 目前,利用母血浆中胎儿 DNA 可以诊断出的单基因病,如强直性肌营养不良和软骨发育不全等。研究表明,怀有 21 三体或 13 三体胎儿的孕妇血浆中游离 DNA 含量增多,通过检测游离 DNA 即可对胎儿非整倍体疾病进行筛查,尤其在与其他血清生化标志物结合分析时意义更大^[19-20]。此外,通过检测孕妇外周血中游离 DNA 的特定基因,如强直性肌营养不良的蛋白激酶基因、地中海贫血的血红蛋白 E 基因和囊性纤维化的 Q890X 基因突变等,还可用于排除父源性遗传病^[21]。理论上,只要是可以由基因来诊断或辅助诊断的疾病利用胎儿游离 DNA 都可以来做诊断,只是有些试验的特异性和敏感性的原因而不能应用于临床诊断^[22]。

4 问题和展望

现在的产前诊断应用主要对于男性胎儿,利用 Y 染色体的存在来鉴别胎儿 DNA,这就造成了在应用上的局限性。若要从实验室普遍地走向临床,首先必需改进从血浆中提取胎儿 DNA 的方法,QIA amp DNA Blood Mini Kit 这种离心柱型 DNA 提取试剂盒目前已经被广泛应用于母体血浆中游离胎儿 DNA 的提取实验中。但母体血浆中的游离胎儿 DNA 多为小于 300 bp 的小片段,而且在检测过程中容易被母体基因组 DNA 掩盖。所以迫切需要改进提取母体血浆中游离胎儿 DNA 的提取方法。不管胎儿的性别,我们都可以从母体血液中获得高产量、高浓度的可以鉴别的胎儿 DNA 模板;其次必需简化检测的环节,尽量早日实现自动化,以减少检测操作过程中的污染^[23]。

总之,无创性产前基因诊断在临床上的应用有着广泛的前景,对母血浆中游离胎儿核酸的生物化学性质,富集提取及其实验方法的研究将推动无创性产前基因诊断在临床应用的进程。

参考文献

- [1] Rossa W. K, Chiu Y. M, Dennis Lo. Recent developments in fetal DNA in maternal plasma[J]. Annals New York Academy of Sciences, 2004, 1022: 100—104.
- [2] Zhao Yin, Zhou Li. Application of fetal DNA in maternal plasma in noninvasive prenatal diagnosis[J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology(Medical Science), 2004, 24(1): 25—29.
- [3] FU Xian—hu, CHEN Han—ping. Medical progress advances on circulating fetal DNA in maternal plasma[J]. Chin Med J, 2007, 120(14): 1256—1259.
- [4] Bianchi D. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential[J]. Placenta, 2004, 25 (Suppl A): 93 — 101.
- [5] Sekizawa A, Yokokawa K, Sugito Y, et al. Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta[J]. Hum Genet, 2003, 113: 307—312.
- [6] Chung G, Chiu R, Chan K, et al. Lack of dramatic enrichment of fetal DNA in maternal plasma by formaldehyde treatment[J]. Clin Chem, 2005, 51: 655—658.
- [7] 朱金玲, 清云, 罗佳滨. 母血浆中游离胎儿 DNA: 无创性产前诊断的靶标[J]. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15(11): 5—6.
- [8] Clausen FB, Krog GR, Rieneck K, Lundqust R, Finning K, Dickmeiss E, et al. Antenatal determination of fetal RhD—blood type based on fetal DNA in plasma from the RhD—negative mother[J]. Ugeskr Laegar, 2006, 168: 2568—2570.
- [9] Brojer E, Zupanska B, Guz K, Orzinska A, Kalinska A. Noninvasive determination of fetal RhD status by examination of cell—free DNA in maternal plasma[J]. Transfusion, 2005, 45: 1473—1480.
- [10] Joy SD, Rossi KQ, Krugh D, O'Shaughnessy RW. Management of pregnancies complicated by anti—E alloimmunization[J]. Obstet Gynecol, 2005, 105: 24—33.
- [11] Kirstin Finning, Peter Martin, Joanna Summers, et al. Fetal genotyping for the K (Kell) and Rh C, c, and E blood groups on cell—free fetal DNA in maternal plasma[J]. Immunohematology, 2007, 47(11): 2126—2133.
- [12] 叶有玩, 胡劲辉, 邓文. 母子 ABO 血型不合的产前诊断[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2005, 26(12): 386—387.
- [13] Chen ZB, Yan M, Lei Z, et al. Application of fetal DNA in maternal plasma for non—invassive prenatal diagnosis of fetal sex[J]. Yi Chuan, 2004, 26(1): 18—22.
- [14] Deng Z, Li Q, Li D, Wang D, Gao S, Wu G. The genetic polymorphisms of nine Y—STR loci with short fragment size alleles in southern Chinese Han population and its application in forensic science[J]. Chin J Genet (Chin), 2006, 23: 470—474.
- [15] Deng Z, Wu G, Li Q, Zhang X, Liang Y, Li D, et al. Noninvasive genotyping of 9 Y—chromosome specific STR loci using circulating fetal DNA in maternal plasma by multiplexPCR[J]. Prenat Diagn, 2006, 26: 362—368.
- [16] Hwa HL, Ko TM, Yen ML, et al. Fetal gender determination using real—time quantitative polymerase chain reaction analysis of maternal plasma[J]. J Form Med Assoc, 2004, 103(5): 364—368.
- [17] 贾颐舫 吴爱华 张爱东等. 荧光定量聚合酶链反应技术检测孕妇外周血中游离胎儿 DNA 的可行性研究[J]. 中国计划生育杂志, 2010, 18(2): 100—102.
- [18] Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Cantor M, Kirkner GJ,

Spiegelman D, et al. Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (Methylight) for quantitative DNA methylation analysis[J]. JMD,2006,8:209-217.

[19] Zhong XY, Holzgreve W, Gebhardt S, Hillermann R, Tofa KC, Gupta AK, et al. Minimal alteration in the ratio of circulatory fetal DNA to fetal corticotrophin-releasing hormone mRNA level in preeclampsia[J]. Fetal Diagn Ther,2006, 21: 246-249.

[20] Stanghellini I, Bertorelli R, Capone L, Mazza V, Neri C,Percece A. Quantitation of DNA in maternal serum during the first trimester of pregnancy by the use of a DAZ repetitive probe[J]. Mol Hum Reprod,2006, 12: 587-591.

[21] Ge Q, Bai Y, Liu Z, Liu Q, Yan L, LU Z. Detection of fetal DNA in maternal plasma by microarray coupled with emulsion PCR[J]. Clin Chim Acta,2006, 369: 82-88.

[22] 王文博,张毅,孙树汉. 孕妇外周血中胎儿游离 DNA 在产前诊断中的应用[J]. 第二军医大学学报,2009,30(4):442-446.

[23] Lo YM. Recent developments in fetal nucleic acids in maternal plasma: implications to noninvasive prenatal blood group genotyping[J]. Transfus Clin Biol,2006,13:50-52.

(收稿日期:2010-05-10)

• 综 述 •

立克次体基因分型研究进展

蒋明明¹综述,毛旭虎^{1△},张守印²审校

(1. 第三军医大学医学检验系临床微生物及免疫学教研室,重庆 400038;
2. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,北京 102206)

关键词:立克次属; 斑疹伤寒,流行性虱传; 胞内寄生菌; 斑点热群; 基因分型; 分型特异性序列
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.04.020 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)04-0474-03

立克次体(Rickettsia)是一类复杂的细胞内寄生菌,大多为人兽共患病原体,其引起的立克次体病在世界范围内呈散发性和季节性流行。此外,立克次体作为潜在的生物恐怖病原体,也日益受到重视。为防控立克次体疾病,并对立克次体流行株进行溯源,国内外学者对菌株进行了分型鉴定。立克次体的分型方法主要为血清分型和基因分型。最先用于立克次体分型的方法是血清分型。但是,由于不同菌株的抗体间存在交叉反应,结果重复性差,容易出现模棱两可的结果等原因,使血清分型存在一定的缺陷。而基因分型方法具有高分辨力、高重复性、结果评价客观性以及能对数据进行统计学分析等特点^[2]。因此,随着分子生物学技术的不断进步,基因分型方法得到了迅速发展。基因分型是以 DNA 序列信息为基础的分型技术,例如:针对全基因组分析的 PFGE(pulsed field gel electrophoresis)分型;针对单个或多个基因分析的 PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism)、MLST (multilocus sequence typing) 和 PCR-Sequencing (polymerase chain reaction-sequencing) 分型^[3];针对非编码序列的 MST(multiple spacer typing)分型^[4],这些技术在立克次体分型中得到迅速应用。但是这些分型方法各有优缺点,目前还没有一种方法被公认为立克次体基因分型的金标准。本文对立克次体基因分型的研究进展作一综述。

1 立克次体基因分型研究情况

立克次体是一类严格胞内寄生菌,其基因组大小约为 1 兆~2 兆个碱基对。由于与其宿主(节肢动物)长期的共存和共同进化,受到的选择压力较小,立克次体具有遗传保守性特点^[1]。目前,立克次体主要包括斑点热群和斑疹伤寒群,此外,还有很多立克次体至今仍未得到充分的认识和命名^[5-7]。因此,为了研究立克次体的流行病学特点,需要对它们进行分类和分型。下面将斑点热群和斑疹伤寒群立克次体的基因分型情况作一简要综述。

1.1 斑点热群 斑点热群立克次体是较为复杂的一个生态

群,从上世纪 80 年代至今,对斑点热群立克次体菌种的分类,不断发生变动^[5-7]。而对斑点热群立克次体的基因型分析,也在不断发展中。1992 年 Mnor 等^[8]报道,以色列流行的 R. conorii 菌株引起的立克次体病临床特点不同(从轻微症状到患者死亡)。为研究其原因,他们应用 PCR-RFLP 基因分型方法,用 7 种限制性内切酶对这些菌株的 190 KDa 和 120 KDa 抗原蛋白编码基因进行了酶切分析,发现:所有以色列菌株都属于一个基因型。因此,他们认为,在以色列患者出现的不同临床症状,可能是由于患者本身的体质差异所导致。2004 年 Fournier 等^[9]报道,他们首先将 MST 分型方法应用于立克次体的基因分型。通过比对 R. conorii 和 R. prowazekii 的全基因组,选取了 3 类序列对 R. conorii 分离株进行分型:(1)5 个编码基因。(2)28 个在 R. conorii 中退化,但在 Rickettsia prowazeki 完整的基因。(3)27 个保守和 23 变异的基因间区。经过比对分析后发现:ompA 的差异可将 R. conorii 分成 3 个基因型,而 25 个变异的基因间区中的 4 个含有高度的序列多态性,可将 39 株 R. conorii 分成 27 个基因型。经综合分析,他们认为:MST 分型具有高分辨力、可重复性、结果易于分析以及各实验室间可通过互联网进行数据共享的优点,可用于追踪菌株来源,甚至可被直接用于对临床标本的分型。2006 年 Zhang 等^[10]应用 ompA 部分片段测序和 MST 分析,对 1974 年至 2000 年来自中国各地的 15 株 R. sibirica 菌株进行了基因分型。通过对 3 个基因间区的序列分析,发现所有 15 株菌的这 3 个基因间区序列都相同,且与 R. sibirica 的 sibirica 亚种相同。而根据 ompA 片段的序列,15 株菌分成 2 个型:4 个北京菌株分为一个型,其他 11 株菌为一个型。最后,他们认为:R. sibirica 的 sibirica 亚种在中国的东、西、南、北部地区都有分布,而且有 4 株菌分离自患者。因此,中国这些地区有 R. sibirica subsp. sibirica 流行的可能性。2007 年, Fournier 和 Raoult^[10]在菌种和菌株水平对来自世界各地的 23 种立克次体(包括所有斑点热群和斑疹伤寒群立克次体)分离菌株或节肢

△ 通讯作者,电话:(023)68752315。