

• 临床检验研究论著 •

变性高效液相色谱法产前诊断 18 三体综合征

黄肖利,梅端容,伍严安,陈 豪,黄 毅,陈紫瑄
(福建省立医院检验科,福建福州 350001)

摘 要:**目的** 用变性高效液相色谱法(DHPLC)分析 1 例 18 三体综合征胎儿的双链 DNA,快速产前诊断 18 三体综合征。**方法** 根据所设计的引物对 18 号染色体 D18S1002、D18S51 和 D18S499 共 3 个短串联重复序列(STR)位点进行 PCR 扩增,然后在 50 ℃柱温条件下用 DHPLC 对 PCR 扩增产物进行检测和分析。**结果** 健康人 D18S51 的 DHPLC 峰形呈现两个高低相同的波峰,18 三体综合征胎儿 D18S51 的 DHPLC 峰形呈现两个高低不同的波峰,其中一个波峰高度接近为另一个波峰的 2 倍。健康人 D18S1002 的 DHPLC 峰形呈现一个波峰,18 三体综合征胎儿 D18S1002 呈现两个高低不同的波峰,其中一个波峰高度接近为另一个波峰的 2 倍。健康人 D18S499 的 DHPLC 峰形呈现一个波峰,18 三体综合征胎儿 D18S499 呈现两个高低不同的波峰,其中一个波峰高度接近为另一个波峰的 2 倍。**结论** 健康人染色体核型有两条 18 号染色体,而 18 三体综合征患者染色体核型则有 3 条 18 号染色体,结合 3 个 STR 位点的 DHPLC 波峰数量及波峰高度,即可对患者做出确切的诊断。该方法灵敏度高、特异性强、简便、快捷等,适合广泛应用于 18 三体综合征的临床诊断。

关键词:唐氏综合征; 重复序列,核酸; 色谱法,高压液相; 产前诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.17.026

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)17-2267-02

Prenatal diagnosis of trisomy 18 by denaturing high-performance liquid chromatography

Huang Xiaoli, Mei Duanrong, Wu Yan'an, Chen Hao, Huang Yi, Chen Zixuan

(Department of Clinical Laboratory, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou, Fujian 350001, China)

Abstract:**Objective** Double DNA of trisomy 18 in the fetus were detected by denaturing high-performance liquid chromatography(DHPLC) for quick prenatal diagnosis of trisomy 18. **Methods** To amplify different DNA fragments of short tandem repeat of D18S1002, D18S51 and D18S499 using corresponding primers, DHPLC was introduced to analyze DNA fragments in the temperature of 50. **Results** DHPLC elution profile of D18S51 of normal control show one peak. However DHPLC elution profile of D18S51 of 18 trisomy showed two peaks of different altitude which one's altitude was twice than another. DHPLC elution profile of D18S1002 of normal control show two peaks of same altitude. However DHPLC elution profile of D18S1002 of 18 trisomy show two peaks of different altitude which one's altitude was twice than another. DHPLC elution profile of D18S499 of normal control show one peak. However DHPLC elution profile of D18S499 of 18 trisomy show two peaks of different altitude which one's altitude was twice than another. **Conclusion** Karyotype of normal control has two chromosome 18, however karyotype of trisomy 18 has three chromosome 18. According to magnitude and altitude of DHPLC elution profile, we can diagnose trisomy 18. DHPLC is a sensitive, convenient, automatic and highly-efficient method for diagnosis of trisomy 18 and can be widely used in clinic.

Key words:down syndrome; repetitive sequences, nucleic acid; chromatography, high pressure liquid; prenatal diagnosis

18-三体综合征又称 Edward 综合征,Edward 等于 1960 年首先发现此症患者核型 E 组染色体多一条。1961 年 Patau 和 1964 年 Yunis 先后证实这多出的染色体为 18 号染色体,始定名为 18-三体综合征^[1]。18-三体综合征在活婴中的发病率约为 1/4 000~1/5 000,仅次于 21 三体综合征,是第二大常见的常染色体超二倍体^[2],30% 患儿死于生后 1 个月内。对于 18 三体综合征目前没有有效的治疗手段,因此快速、准确地产前诊断出 18 三体综合征显得尤为重要。本研究用 DHPLC 对 18 号染色体 D18S1002、D18S51 和 D18S499 的 3 个短串联重复序列(STR)位点的 PCR 扩增产物进行检测和分析,根据 DHPLC 的峰形以期达到诊断 18 三体综合征的目的。

1 资料与方法

1.1 一般资料 18 三体综合征患者的母亲来自 2006 年上半年的妇产科就诊患者。该孕妇孕龄 30 周,产科 B 超检查胎儿有唇裂,在 B 超引导下抽其脐血并做染色体核型检查证实胎儿为 18 三体综合征。正常对照为门诊就诊染色体核型正常者。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取 18 三体综合征胎儿的脐血 5

mL(肝素抗凝),全血 DNA 抽提试剂盒(泰京生物技术有限公司)抽提基因组 DNA。

1.2.2 PCR 反应 D18S51、D18S1002 和 D18S499 的 PCR 扩增引物由博亚生物工程有限公司合成,引物设计在 STR 位点两侧(见表 1)。PCR 反应体系:1×缓冲液,每种 dNTP 浓度 0.2 mmol/L, MgCl₂ 浓度 1.5 mmol/L,基因组 DNA 模板 200 ng,1.25 U Ex-Taq 酶(大连宝生物有限公司),引物浓度 0.4 μmol/L,加去离子水至终体积 50 μL。PCR 反应条件为:95 ℃预变性 10 min;95 ℃变性 30 s,55~59 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 40 s,共 35 个循环;72 ℃最后延伸 10 min^[3]。

1.2.3 DHPLC 分析 在 50 ℃柱温条件下,将 8 μL PCR 产物上样于 Transgenomic 公司的 DNA sep 分离柱,然后观察 DHPLC 峰形^[4]。

2 结 果

2.1 PCR 扩增 D18S51、D18S1002 和 D18S499 共 3 个 STR 位点的 PCR 扩增产物与 DNA Marker 一起在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳 20 min,然后用凝胶成像系统拍照,扩增片段大小分别为 306 bp、288 bp 和 166 bp。

2.2 DHPLC 图谱分析 健康人 D18S51 的 DHPLC 峰形呈

现一个波峰,18 三体综合征胎儿 D18S51 的 DHPLC 峰形呈现两个高低不同的波峰,其中一个波峰高度接近为另一个波峰的 2 倍。健康人 D18S1002 的 DHPLC 峰形呈现两个相等的波峰,18 三体综合征胎儿 D18S1002 呈现两个高低不同的波峰,其中一个波峰高度接近为另一个波峰的 2 倍。健康人 D18S499 的 DHPLC 峰形呈现一个波峰,18 三体综合征胎儿 D18S499 呈现两个高低不同的波峰,其中一个波峰高度接近为另一个波峰的 2 倍,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

表 1 3 个 STR 位点的 PCR 扩增引物	
STR 位点	引物序列(上游引物下游引物)
D18S1002	D18S1002-F:CAA AGA GTG AAT GCT GTA CAA ACA GC
	D18S1002-R:CAA GAT GTG AGT GTG CTT TTC AGG AG
D18S51	D18S51-F:CAA ACC CGA CTA CCA GCA AC
	D18S51-R:GAG CCA TGT TCA TGC CAC TG
D18S499	D18S499-F:CCC AGA AAT GAG ATC AGC AAG CC
	D18S499-R:CTG CAC AAC ATA GTG AGA CCC TG

3 讨 论

三体型是人类最常见的染色体畸变类型,其中 21 三体最常见,18 三体次之。三体型的产生原因多数是细胞分裂时染色体不分离引起的。在细胞分裂进入中、后期时,如果某一对源染色体或两姐妹染色单体未分别向两极移动,却同时进入一个子细胞中,结果细胞所形成的二个子细胞中的一个将因染色体数目多出一条染色体而形成三体型。染色体不分离可发生于配子形成时的减数分裂过程中,也可发生于受精卵的卵裂早期或在体细胞的有丝分裂过程中^[5]。

18 三体综合征的临床表现为智力低下、先天性心脏病、骨骼畸形及其他畸形,也被称为多发畸形综合征^[2]。由于缺乏有效的治疗措施,因此对高危孕妇进行产前诊断,避免患儿出生,成为人们关注的焦点。18 三体综合征的产前诊断程序如下:(1)通过检测妊娠中期孕妇血清甲胎蛋白(AFP)、游离 β-HCG 进行无创性产前筛查^[6]。(2)产前筛查阳性者通过产前超声检查出胎儿解剖结构有无异常^[7]。(3)在 B 超介导下取羊水或脐血进行染色体核型分析确定。虽然染色体核型分析准确性高,但耗时长、操作繁琐。

STR 是由 2~6 个碱基对作为核心单位串联重复排列而成的一类 DNA 序列,核心序列拷贝数的不同构成了 STR 位点高度的遗传多态性,并且呈现孟德尔共显性遗传。因此,STR 位点分析可成为检测染色体数目有用的遗传标记^[8]。而 DH-PLC 是近年来才发展起来的一项新的基因技术。在柱温 50℃时,双链保持完整状态,长片段有更多的负电荷,与 DNASEp 柱结合也更牢固。随着固相中乙腈(离子对/洗脱液的比值)浓度的增加,固相和桥分子烷基之间的疏水作用力减弱,短片段因结合的 TEAA 分子数目少,先洗脱下来,从而达到长短片段的分离的目的。DHPLC 对 DNA 双链片段大小的分离效率为 1%,即 100 bp 的 DNA 双链相差 1 bp 即可分离开^[4]。因此应

用 DHPLC 检测 18 号染色体上的 STR 位点,通过观测 STR 的 DHPLC 波峰数量及波峰高度可达到诊断 18 三体综合征的目的。

健康人染色体核型有两条 18 号染色体,而 18 三体综合征患者染色体核型则有 3 条 18 号染色体。研究者选用 D18S1002、D18S51 和 D18S499 3 个 STR 的均为 4bp 的重复序列,杂交率分别为 81.2%、80.2%和 71%^[3]。健康人 18 号染色体 STR 的 DHPLC 峰形应为单峰(纯合)或双峰(杂合),而 18 三体综合征 STR 的 DHPLC 峰形应为单峰(完全纯合)、双峰且其中一峰为另一峰的 2 倍(部分杂合)或三个峰(完全杂合)。本研究的结果中健康人 D18S51 的 DHPLC 峰形呈现一个波峰,说明两条 18 号染色体完全纯合;18 三体综合征胎儿 D18S51 的 DHPLC 峰形呈现两个高低不同的波峰,则说明 18 三体综合征的三条 18 号染色体中有两条纯合,另一条与其他两条杂合。健康人 D18S1002 的 DHPLC 呈现两个波峰,两条 18 号染色体为杂合状态;18 三体综合征胎儿 D18S1002 呈现两个高低不同的波峰,则说明 18 三体综合征的三条 18 号染色体中有两条纯合,另一条与其他两条杂合。健康人 D18S499 的 DHPLC 峰形呈现一个波峰,两条 18 号染色体完全纯合;18 三体综合征胎儿 D18S499 呈现两个高低不同的波峰,则说明 18 三体综合征的三条 18 号染色体中有两条纯合,另一条与其他两条杂合。结合 3 个 STR 位点的 DHPLC 波峰数量及波峰高度,即可诊断该患者为 18 三体综合征。

综上所述,DHPLC 具有灵敏度高、特异性强、简便、快捷、不需荧光标记、成本低廉等优点,可应用于 18 三体综合征的临床诊断,实现早诊断、早预防,达到优生优育的目的。

参考文献

[1] 钟红菱,郁凯明,张爱丽. 18 三体综合征 7 例临床分析及产前诊断文献复习[J]. 中国优生与遗传杂志,2000,8(1):39-40.

[2] Goc B, Walencka Z, Wloch A, et al. Trisomy 18 in neonates: prenatal diagnosis, clinical features, therapeutic dilemmas and outcome[J]. J Appl Genet, 2006, 47(2):165-170.

[3] Schmidt W, Jenderny J, Hecher K, et al. Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk[J]. Mol Hum Reprod, 2000, 6(9):855-860.

[4] Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: a review[J]. Hum Mutat, 2001, 17(6):439-474.

[5] 李璞. 医学遗传学[M]. 中国协和医科大学出版社, 2000.

[6] 俞信忠, 许平, 曾艳, 等. 孕中期 21 三体综合征、18 三体综合征的产筛查与产前诊断结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14(4):50-54.

[7] 孙路明, 凌梅立, 王德芬. 21 及 18 三体综合征的产前超声筛查[J]. 中国医学影像技术, 2004, 20(6):827-829.

[8] Adinolfi M, Sherlock J, Pertl B. Rapid detection of selected aneuploidies by quantitative fluorescent PCR [J]. Bioessays, 1995, 17(7):661-664.

(收稿日期:2013-05-17)

(上接第 2266 页)

[13] 徐玲娟,盛秀胜. 核苷(酸)类药治疗慢性乙肝患者 HBV 逆转录酶区基因耐药的变异分析[J]. 温州医学院学报, 2011, 41(5):435-438.

[14] 焦士蓉,谢贞建,李倩,等. 苏麻籽油及其粕的组成分析[J]. 中国油脂, 2008, 33(3):72-73.

[15] 孙建民,朱增红,胡庆军. 阿德福韦酯单用或联合拉米夫定治疗 YMDD 变异的慢性乙型肝炎的疗效比较[J]. 临床肝胆病杂志, 2008, 24(4):293-295.

(收稿日期:2013-04-08)