·临床检验研究论著·

联合运用 G 显带核型分析技术和 MLPA 对 100 例流产胚胎进行检测

刘思平[1]，刘　妮[2]，熊　丽[1]，邓　康[1]，吴瑞枫[1]，宋兰林[1△]
（1. 南方医科大学南方医院产前诊断与遗传病诊断技术中心，广东广州 510515；
2. 中山大学附属第一医院病理科，广东广州 510080）

摘　要：目的　探索一种适用于临床对流产胚胎进行检测的方法。**方法**　对 100 例流产胚胎绒毛组织联合应用多重连接扩增技术（MLPA）和 G 显带核型分析技术进行检测。**结果**　100 例自然流产胚胎中，1 例培养失败，培养成功率为 99%，核型分析异常检出率为 52%。MLPA 对 100 例流产胚胎样本都获得检测结果，异常核型检出率为 51%。联合应用 G 显带核型分析技术与 MLPA 后，异常核型的检出率为 56%，检测灵敏度从 G 显带核型分析的 0.893、MLPA 的 0.911 提升到 0.990。**结论**　联合运用 G 显带核型分析技术与 MLPA 能有效地提高异常核型的检出率与检测的灵敏度，表明该方法是适合临床对流产胚胎进行检测的一种综合性方法。

关键词：G 显带核型分析技术；　多重连接扩增技术；　流产胚胎
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2013.22.018　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2013)22-2984-02

Joint detection of G banding karyotype analysis technology and MLPA in 100 cases of abortion embryo

Liu Siping[1], *Liu Ni*[2], *Xiong Li*[1], *Deng Kang*[1], *Wu Ruifeng*[1], *Song Lanlin*[1△]
(1. *Technology Center of Prenatal Diagnosis and Genetic DIsorders Diagnosis, Department of Obstetrics and Gynecology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong* 510515, *China*; 2. *Pathology Department, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong* 510080, *China*)

Abstract: Objective　To explore a comprehensive detection method of abortion embryo for clinical application. **Methods**　100 cases of abortion embryo chorionic villus were selected. Each case was divided into two parts, one for G banding karyotype, the other one for multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). **Results**　Of the 100 cases, chorionic villus was successfully cultured in 99 cases (99%), and abnormal embryo karyotypes were identified in 52 cases (52%). Chorionic villus was successfully detected in 100 cases (100%) with MLPA, and abnormal embryo karyotypes were identified in 51 cases (51%). Abnormal embryo karyotypes were identified in 56 cases (56%) with the combined use of G banding karyotype analysis technology and MLPA at the same time. The sensitivity of joint detection was up to 0.990, while the sensitivity of G banding karyotype analysis technology was 0.893, and the sensitivity of MLPA was 0.911. **Conclusion**　Joint detection of G banding karyotype analysis technology and MLPA can effectively improve the abnormal karyotype detection rate and sensitivity, and it is a suitable and comprehensive method for clinical detection of aborted embryos.

Key words: G banding karyotype analysis technology;　multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA);　abnormal embryo

目前 G 显带核型分析技术是检测自然流产胚胎的主要方法，但细胞培养容易受到母源性污染，标本陈旧，取材容易受到细菌污染，培养周期长，细胞形态差等多方面因素的影响，造成细胞培养失败，导致核型分析漏诊、误诊[1]。荧光原位杂交技术（FISH）价格昂贵，覆盖面窄，不适合临床的大面积推广。因此，临床检测迫切需要一种针对自然流产胚胎检测的综合性方法。本研究采用多重连接扩增技术（MLPA）作为核型分析的必要补充，拟建立一种价格合适，覆盖面广、灵敏度高的自然流产胚胎染色体检测的综合方法。

1　资料与方法

1.1　一般资料　选择 2011 年 2～10 月因自然流产到南方医院妇科门诊就诊的 100 例妇女的流产胚胎，所选取对象的孕周均为 7～12 周，超声提示胚胎停止发育，无胎心搏动，未见胎芽的胚胎。所检测胚胎样本一分为二，一份用以细胞培养行染色体核型分析，另一份用于 MLPA 技术行检测。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养与 G 显带核型分析　挑取自然流产胚胎绒毛组织 15 mg，用生理盐水进行反复漂洗，去掉组织中的血块和碎片组织，煎碎后加入 1.5 mL 的 1.0% EDTA-胰酶消化液，37 ℃消化 15 min 后加入新鲜的培养基终止消化，2 000 r/min 离心 5 min 后分别加入培养基接种于两个培养瓶中，分开放置在 2 个 CO_2 培养箱里培养。5～6 d 后镜下观察贴壁情况，换液，8～9 d 镜下观察克隆数和细胞生长情况，收获制片。按常规 G 显带方法进行制片、显带、染色与镜下分析。

1.2.2　MLPA 检测　采用荷兰 MRC-Holland 公司生产的 SALSA MLPA P181/P182 Kit 染色体非整倍体检测试剂盒，试剂盒各包含 22 对常染色体检测探针，1 对性染色体检测探针。(1)DNA 的变性和探针杂交：提取绒毛 DNA，取总量为 50～200 ng DNA 95 ℃变性 8 min，在体系降温到 25 ℃后加入 3.0 μL 杂交体系，置于 PCR 仪上 95 ℃变性 3 min，60 ℃杂交 16 h。(2)连接反应：待杂交体系降温到 54 ℃时，加入 32 μL 已经配制好的 Ligase-65 连接体系，54 ℃孵育 15 min，98 ℃加热 5 min 后降温到 15 ℃。(3)PCR 扩增：取出连接产物，加入 5 μL 已经配置好的反应体系，95 ℃ 30 s；60 ℃ 30 s，72 ℃

作者简介：刘思平，男，检验医学技师，在职研究生，主要从事细胞遗传及细胞分子遗传研究。　△　通讯作者，E-mail：nfsll@fimmu.com。

1 min,35 个循环;72 ℃再孵育 20 min。(4)产物分析:取 9 μL 高纯度甲酰胺、0.2 μL 内标(GS500-LIZ)和 1 μL PCR 反应产物于 200 μL PCR 反应管中,取 10 μL 加入 ABI 公司 3130XL 毛细电泳仪 96 控板上进行电泳分离,原始数据经过 Genemarker1.90 软件进行分析,得到峰高、峰宽、峰面积、片段长度等一系列参数。

1.3　统计学处理　采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,统计方法采用 ROC 曲线进行分析,$P<0.05$ 时认为有统计学意义。

2　结　　果

2.1　100 例流产胚胎样本检测结果　染色体数目、结构异常统称为异常核型,本实验认为是检测阳性事件。结果为 46,XX 与 46,XY 为正常核型,本实验认为是检测阴性事件。G 显带核型分析检出异常样本 52 例,异常率 52%,MLPA 检出异常样本 51 例,异常率 51%,见表 1(见《国际检验医学杂志》网站"论文附件")。G 显带核型分析中,100 自然流产胚胎绒毛组织培养中有 1 例细胞培养失败,培养成功率为 99%,检出的异常核型中,三体为 32 例,占异常比率最大,三倍体 3 例与四倍体 2 例,结构异常为 5 例,嵌合体为 4 例,X 单体为 6 例。三倍体的核型图见图 1(见《国际检验医学杂志》网站"论文附件")。MLPA 对 100 例流产胚胎样本都获得了检测结果,异常核型中,三体 42 例,45,X 6 例,47,XXY 3 例。MLPA 检测为 16 三体的峰图见图 2(见《国际检验医学杂志》网站"论文附件")。

2.2　两种方法检测结果比较　两种方法检测结果不一致的有 20 例,G 显带核型分析检测为 46,XX,而 MLPA 检测结果为三体的有 3 例,46,XY 为 1 例;G 显带核型分析检测为三倍体的核型 3 例,MLPA 检测结果显示为 47,XXY;2 例核型分析为四倍体的 MLPA 检测结果为正常;5 例 G 显带核型分析检测为结构异常的 MLPA 显示为正常结果 3 例,三体 2 例;G 显带核型分析为嵌合体的病例 4 例,MLPA 却不能检出嵌合体,而以结果为三体形式显示;细胞培养有 1 例失败,应用 MLPA 获得结果,结果为 7 三体;综合 G 显带核型分析与 MLPA 检测结果,异常核型的检出率为 56%。

2.3　统计学结果　对两种方法检测结果应用 ROC 曲线进行分析,$P=0.000$,G 显带核型分析与 MLPA 用于流产胚胎阳性事件的检出差异具有统计学意义,选用 0.50 为移动诊断界点,G 显带核型分析的灵敏度为 0.893,MLPA 灵敏度为 0.911,两种方法联合检测灵敏度为 0.990。

3　讨　　论

自然流产的发生率占临床妊娠的 10%～20%,且多发生于孕早期,诱发自然流产的原因众多,涉及到遗传、解剖、免疫、内分泌、感染、血栓形成倾向甚至环境等因素[2]。Sullivan 等[3]报道染色体异常是自然流产的主要原因,所占自然流产发病原因的比例为 50%～60%,染色体异常以数目异常居多,且以非整倍体数目异常最为常见。

传统细胞遗传学方法体外培养的过程时间长,易污染,失败率高。另外,异常细胞生长不良,容易发生母细胞选择性生长[4-5]。如今,国内、外近几年发展起来的多种快速分子诊断技术,如 FISH、短串联重复序列分析和荧光定量 PCR 等,都各有优势和局限[6]。FISH 作为目前核型分析的主要补充方法,具有快速,无需细胞培养,样本要求量少等优点而在临床上得到一定的应用,但其只能针对 13,16,18,21,22 与 XY 这几对染色体进行检测,加之检测成本较贵,仍然不适合大规模应用。

2002 年 Schouten 等[7]设计了 MLPA 技术,其原理是对可与样本 DNA 正确杂交并被连接酶连接的探针进行扩增和半定量分析。MLPA 最大的特点在于探针的设计,其能在一个反应体系中,仅用 1 对引物即可扩增 45 个不同的核苷酸序列。MLPA 技术融合了 DNA 探针杂交和 PCR 技术的特点,凸显了连接依赖的特色,所需检测样本小、分析方便快速[8-10]。本实验选用的 SALSA MLPA P181/P182 Kit 染色体非整倍体检测试剂盒能够在一个反应里同时扩增 22 对常染色体和 1 对性染色体,检测从连接到产物分析在两天之内可以完成,极大的提高了检测效率。相对于其他检测方法,MLPA 另一大优点是价格低廉,比较适合于临床检测。

本实验中,G 显带核型分析存在培养失败与母性优势生长等情况,导致结果漏诊与误诊,降低了异常的检出率与检测的灵敏度。在本次实验中,联合运用 MLPA 后,有效地弥补了 1 例细胞培养失败的病例,3 例因母性优势生长而检测核型为母性核型的病例。MLPA 对这 4 例病例检测结果为三体 3 例,核型为 46,XY 的 1 例。G 显带核型分析与 MLPA 对 100 例流产胚胎的异常检出率分别为 52%与 51%,联合运用后检出率为 56%,检测灵敏度从 G 显带核型分析的 0.893,MLPA 的 0.911提升到 0.990,有效地提升了异常核型的检出率与检测的灵敏度。

总的来说,联合应用 G 显带核型分析与 MLPA 是适合临床对流产胚胎进行检测的综合性方法,因其能提高异常核型的检出率与检测的灵敏度而得到更广泛的应用。

参考文献

[1]　宋兰林,熊丽,刘思平,等.FISH 技术在快速诊断自然流产胚胎染色体数目异常中的应用[J].南方医科大学学报,2011,31(9):1605-1607.

[2]　Macklon NS,Geraedts JPM,Fauser BCJM.Conception to ongoing pregnancy:the 'black box' of early pregnancy loss[J].Hum Reprod Update,2002,8(4):333-343.

[3]　Sullivan AE,Silver RM,LaCoursiere DY,et al.Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage[J].Obstet Gynecol,2004,104(4):784-788.

[4]　BellKA,VanDeerlin PG,Haddad BR,et al.Cytogenetic diagnosis of 'normal46,XX' karyotypes in spontaneous abortions frequently maybe misleading[J].Fertil Steril,1999,71(2):334-341.

[5]　邹仲之.组织学与胚胎学[M].5 版.北京:人民卫生出版社,2001:221-245.

[6]　邓璐,孙筱放,张慧敏,等.MLPA 快速诊断胎儿染色体非整倍体疾病方法的研究与应用[J].分子诊断与治疗杂志,2011,3(5):312-317.

[7]　Schouten JP,McElgunn CJ,Waaijer R,et al.Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification[J].Nucleic Acids Res,2002,30(12):e57.

[8]　胡晓,李汶,卢光琇.多重连接依赖性探针扩增技术及其应用进展[J].现代生物医学进展,2010,10(2):362-365.

[9]　魏惠平,伍治平,谢建生,等.多重连接依赖式探针扩增技术及其在医学上的应用[J].中国实用医药,2009,4(12):1-3.

[10]　黄际卫,商璇.多重连接依赖式探针扩增技术在遗传病分子诊断中的应用[J].分子诊断与治疗杂志,2012,4(4):274-278.

(收稿日期:2013-05-08)