

• 论 著 •

荧光原位杂交技术与染色体核型分析在产前诊断中的应用

曾海燕, 吴 杰

(广东省梅州市人民医院检验科 514031)

摘 要:目的 探索荧光原位杂交技术(FISH)在产前诊断中的临床应用价值及相对于羊水细胞染色体核型分析的优缺点。方法 对 2012 年 4 月至 2013 年 11 月在梅州市人民医院进行唐氏综合征筛查并诊断为高危的 183 例孕妇进行羊水细胞核型分析及 FISH 诊断,并对结果进行分析。结果 核型分析结果显示,183 例孕妇中有核型异常者 9 例,其中 3 例 18-三体,3 例 21-三体,1 例 XXY 和 2 例 XO;FISH 诊断结果显示 8 例异常,其中 2 例 18-三体,3 例 21-三体,1 例 XXY 和 2 例 XO。结论 FISH 技术用于产前诊断效率和成功率高,但单纯 FISH 诊断会出现小概率的漏诊,可与核型分析互补缺陷,使产前诊断效能最大化。

关键词:荧光原位杂交; 产前诊断; 核型分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.04.029

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)04-0501-03

Application of fluorescence in situ hybridization and chromosome karyotype analysis in prenatal diagnosis

Zeng Haiyan, Wu Jie

(Department of Clinical Laboratory, Meizhou People's Hospital, Guangdong 514031, China)

Abstract: **Objective** To investigate the application value of fluorescence in situ hybridization (FISH) in prenatal diagnosis and compared with karyotype analysis of cells from amniotic fluid. **Methods** A total of 183 high-risk pregnant women received for a FISH and karyotype analysis who taken prenatal diagnosis in Meizhou people's hospital between April 2012 and November 2013. **Results** According to the test results of karyotype analysis. There were 9 cases of chromosomal abnormality in 183 pregnant women. Among 9 cases, 3 cases were trisomy 21, 3 cases were trisomy 18, 2 cases were XO and one case of XXY. One case of trisomy 18 was showed normal using the FISH. Other cases were consistent with karyotype analysis result. **Conclusion** FISH is a rapid, reliable and prompt prenatal diagnosis method, combined with karyotype analysis will maximize the detection efficacy in prenatal diagnosis of chromosome abnormalities.

Key words: fluorescence in situ hybridization; prenatal diagnosis; karyotype analysis

单个或多个基因突变、非整倍染色体突变和环境等因素引起的新生儿出生缺陷已经成为公共卫生关注的焦点,由此导致的死胎、流产及新生儿出生后发育迟缓、智力低下等综合征给家庭和社会带来了负担。通过对培养的羊水细胞进行细胞遗传学分析是目前已经成熟的产前诊断方法,但其耗时长且需要专业的人员进行分析制约着该项技术的临床应用^[1]。对未经培养的羊水细胞进行荧光原位杂交(FISH)分析使快速产前诊断成为可能。FISH 技术通过荧光素标记的寡聚核苷酸为探针,按照碱基互补原理与靶基因配对,在荧光显微镜下检测相应的信号从而对细胞内的异常染色体作出判断,具有快速、简便、准确可靠及高度的灵敏性和特异性等优点^[2]。本研究通过对 183 例高危孕妇进行羊水细胞染色体核型分析及 FISH 检测,对比两种诊断技术在产前诊断中的应用效果,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 4 月至 2013 年 11 月在梅州市人民医院进行产前诊断的唐氏综合征高危孕妇 183 例为研究对象,孕周 18~26 周,筛选标准为:血清学检查(人绒毛膜促性腺激素 β 亚单位、甲胎蛋白和游离雌三醇)风险高,高龄(>35 周岁),有不良孕产史和超声检查胎儿异常。其中唐氏血清学筛查高风险 76 例、有不良孕产史 81 例、高龄产妇 27 例、胎儿超声检查畸形 18 例。孕妇全部签署产前诊断羊水穿刺知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 羊水采集 对皮肤进行消毒后,利用多普勒彩超进行定位和引导,经腹壁进针,抽取 35 mL 羊水,分装 30 mL 和 5 mL 于无菌离心管中保存,其中 30 mL 用于羊水细胞培养染色体核型分析,5 mL 用于 FISH 检测。

1.2.2 染色体核型分析 将采集的羊水 800 r/min 离心 8 min 弃上清,沉淀转入含有羊水培养基的培养瓶中,于 5% CO₂、37 °C 培养箱进行贴壁培养;更换培养基后羊水细胞生长良好即可加入秋水仙素收获细胞,使羊水细胞停止生长于分裂中期,经低渗固定后常规制片,显 G 带,每例标本镜下核型计数 30 个分裂相,分析 5 个核型,如发现数目或结构异常核型计数增至 60 个。本研究羊水接种、培养和核型分析均平行进行 2 次。

1.2.3 羊水间期细胞 FISH 检测

1.2.3.1 探针的选择 选择北京金菩嘉公司医疗科技有限公司生产的 FISH 诊断试剂盒,两组探针分别为 CSP 18/CSP X/CSP Y(天蓝/绿/红)和 GLP 13/GLP 21(绿/红)。

1.2.3.2 羊水玻片的制备 取羊水标本 2 mL,2 000 r/min 离心 10 min,去上清,离心管中加入 5 mL 预温的 0.075 mol/L KCl,在 37 °C 水浴中低渗 30 min。加入新配制的固定液(甲醇:冰醋酸=3:1),预固定 10 min,2 000 r/min 离心 10 min,去上清,重复固定 2 次,每次 10 min。滴片,自然干燥后置 -20 °C 冰箱冻存。

1.2.3.3 探针杂交 将制备好的羊水细胞玻片自冰柜中取

出,依次放入 70%、85%、100%乙醇中脱水,室温干燥;预处理好的玻片置 73℃、70%甲酰胺 2×SSC 中静置 5 min。探针(橘红色) 10 μL 加在玻片的靶区域,盖上盖玻片,避免产生气泡(暗室中操作),以橡胶泥封固盖玻片,置暗湿盒中 37℃杂交过夜。

1.2.3.4 FISH 诊断结果的观察与判断 用图像分析系统在镜下观察杂交效果。细胞杂交率在 80%以上为有效标本。每组探针计数 30 个细胞,如 90%的细胞显示正常信号诊断为正常,如 60%以上细胞显示异常信号诊断为异常。无法判断时计数 60 个或更多个细胞。判断依据:正常二倍体细胞核,对于 CSP 18/CSP X/CSP Y 探针,男性可检测到 1 个绿色、1 个红色和 2 个天蓝色信号,女性可检测到 2 个绿色和 2 个天蓝色信号;对于 GLP 13/GLP 21 探针,可检测到 2 个红色和 2 个绿色信号。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件对实验数据进行统计学分析,统计处理采用四格表资料卡方检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 羊水细胞染色体核型分析结果 羊水细胞核型分析结果显示,183 例羊水标本全部培养成功,培养成功率 100%,平均出报告时间为 2 周。在 183 例标本中,核型正常 174 例,核型异常 9 例。见表 1。

表 1 羊水细胞染色体核型分析结果

异常类型	<i>n</i>	阳性率(%)	占异常核型比例(%)
18-三体	3	1.09	33.33
21-三体	3	1.64	33.33
XXY	1	0.55	11.11
XO	2	1.64	22.22

2.2 间期羊水细胞 FISH 诊断结果 本研究采集的 183 例羊水标本 FISH 杂交成功率 100%,完成检测需 24~48 h。FISH 检测诊断为正常 175 例,诊断为异常 8 例,其中 2 例 XO,1 例异常 XXY,2 例 18-三体,3 例 21-三体。见表 2。

表 2 羊水细胞 FISH 杂交染色体异常结果分析

类型	<i>n</i>	FISH 诊断结果
XXY	1	47,XXY
18-三体	2	47XX/XY,+18
21-三体	3	47XX/XY,+21
XO	2	45,XO

表 3 两种产前诊断方法比较结果(*n*)

诊断方法	异常	正常	合计
FISH	8	175	183
核型分析	9	174	183
合计	17	349	366

2.3 羊水细胞 FISH 诊断结果与核型分析结果比较 183 例羊水标本同时做羊水细胞核型分析和 FISH 诊断分析,结果显示,8 例 FISH 诊断异常的羊水标本与染色体核型分析结果一致;1 例 FISH 诊断未见异常的样本,核型诊断分析发现异常

(47XX/XY,+18)。其余标本检测结果一致,皆为正常核型。两种产前诊断方法结果差异无统计学意义($\chi^2=0.06,P>0.05$),见表 3。

3 讨 论

产前诊断是一种提高人口素质的手段,细胞遗传学分析对于非整倍染色体和染色体重排的检出效率达到了 99.5%,但需要花费很长时间去获得孕妇的间期羊水细胞,且需要羊水量大,失败率高,给患者带来了一定的心理压力^[3]。FISH 技术可以采用未经培养的羊水细胞、绒毛细胞、胎儿有核红细胞等标本对常见异常染色体进行快速诊断。FISH 技术采用荧光标记的寡聚核苷酸探针与靶细胞中的同源序列根据碱基互补配对原理进行杂交,并对靶 DNA 片段进行定位和定量分析。与常规的核型分析技术相比,FISH 技术采用染色体涂片技术,即使在分散质量差、分裂相少的情况下,异常染色体也能够清晰显示。

FISH 技术所必需的荧光标记的寡聚核苷酸探针目前包括以下几类。(1)染色体特异重复序列探针:这类探针不含散在重复序列,杂交位点大于 106 bp,与细胞内靶基因结合紧密,杂交信号强。适合于细胞非整倍染色体和微小标记染色体的检测。临床研究结果显示该种探针针对 X,Y,13,18 和 21 号染色体 FISH 诊断结果与核型分析一致性达到 99.8%^[4]。(2)全染色体或染色体区域特异性探针:由 1 条染色体上几个核酸片段组成,适用于细胞核结构和染色体重组分析,能够在分子水平观察到细胞染色体结构畸变和数目变化,对特定衍生染色体和标记染色体的来源进行检测有助于初步了解患病的危险性。天使症候群是 15 号染色体 q11~q13 缺失所致的遗传性疾病,罹患此症的患者,脸上常有笑容,缺乏语言能力,过动,且智能低下。产前亦可通过该种染色体区域特异性探针 FISH 技术进行诊断^[5]。(3)特异性位置探针:由 1 个或多个克隆序列组成,用于对靶基因进行定位,对靶序列的拷贝数及结构变化进行检测,能够精确定位出与表型异常有关的标记染色体,在产前诊断和遗传咨询中意义显著。应用 RP11-916H19 特异性探针对表型正常但核型异常的胎儿进行分析,从而把该重复序列定位于 9p11.2~p13.1。(4)端粒或亚端粒探针:与端粒或亚端粒特异性结合,用于检测端粒异常引起的遗传性疾病。Cotter 等^[6]利用该型探针通过双色 FISH 技术对未经培养的羊水细胞核绒毛进行检测,能够对亲代核型为罗伯逊易位或交互易位的胎儿的核型作出快速诊断。

本研究对 183 例唐氏综合征筛查高危孕妇通过 FISH 技术进行 13、18、21、X 和 Y 染色体的数目进行检测,结果显示,FISH 技术用于产前诊断平均报告时间明显短于细胞核型分析,所需要的羊水量也较少,但其中 1 例 FISH 诊断正常的患者采用核型分析诊断为 47XX/XY,+18。大量临床研究显示 FISH 的假阳性率为 0.1%~0.2%,与传统核型分析结果相符率达到了 99.8%^[7],故对于有过染色体异常孕产史或者夫妻双方染色体异常的患者,为了避免漏诊仍需进行羊水细胞核型分析。FISH 技术虽然快捷、方便,但目前还仅局限于对特异染色体异常(13、18、21、X 和 Y 染色体)的诊断。随着荧光探针技术的发展,FISH 技术在产前诊断方面会有更广阔的应用空间。

参考文献

[1] Fauzdar A,Chowdhry M,Makroo RN,et al. Rapid-(下转第 505 页)

95%可信区间上限均低于各自的允许偏倚,见表 2,说明自主研发试剂与东洋纺试剂的偏倚可接受,两种试剂间的检测结果具有良好的可比性。

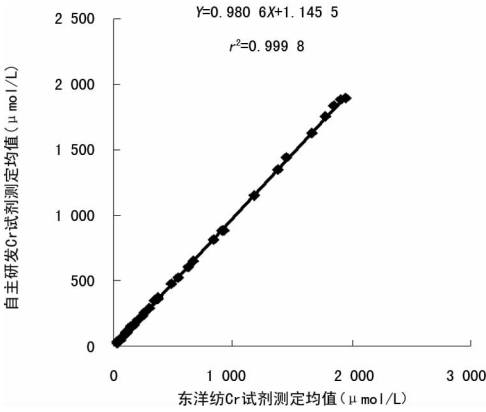


图 2 Cr 重复测定均值的散点图

表 2 预期偏倚及可信区间的比较

医学决定水平 ($\mu\text{mol/L}$)	预期偏差 95% 可信区间($\mu\text{mol/L}$)		允许偏倚 ($\mu\text{mol/L}$)	偏倚评估
	下限	上限		
40	-2.0	2.7	3.0	可接受
141	-3.7	0.6	10.6	可接受
530	-10.9	-7.3	40.0	可接受

2.5.6 干扰实验 以相对偏差不小于 10%作为有明显干扰的评判指标,结果显示 35 mmol/L 肌酸、3.42 mmol/L 胆红素、0.03 g/L 维生素 C、5 g/L 血红蛋白、1 450 浊度乳糜对高、低值浓度标本检测结果均无干扰。

3 讨 论

酶法 Cr 测定试剂不管是一步酶法或两步酶法,测定过程中 Cr 水解后产生的肌酸和内源性肌酸同时转化为酞亚胺,其测定结果包括了 Cr 和肌酸之和。正常男性血肌酸参考区间为 15~45 $\mu\text{mol/L}$,女性为 30~80 $\mu\text{mol/L}$ 。当发生急性肌损伤、饥饿、糖尿病、营养不良、甲亢、发热时肌酸显著升高,对 Cr 检测结果造成的偏差更显著。为解决内源性肌酸干扰,有学者采用仅以肌酐酶为第二试剂的两步酶测定方法,由于第 1 步反应体系中有 4-AAP 和色原,肌酸酶、肌氨酸氧化酶、POD 催化作用产生酞亚胺,肌酸被转化而被耗尽,当加入肌酐酶后启动 Cr 水解反应生成肌酸,再经肌酸酶、肌氨酸氧化酶、POD 催化作

用产生酞亚胺,内源性肌酸和 Cr 水解产生的肌酸先后呈色,仪器以第 1 步反应产生的酞亚胺为空白,仅以第 2 步产生的酞亚胺计算出肌酸的浓度,以此去除内源性肌酸的影响^[8]。由于正常情况下内源性肌酸产生的吸收信号较低且不稳定,从而影响测定结果。

本研究采用过氧化氢酶消除肌酸产生的过氧化氢,产生的水和氧气不会造成本底升高,试剂中的过氧化氢酶在检测反应时被抑制剂叠氮钠完全抑制,不会对反应造成影响,因此可规避以 POD 氧化过氧化氢造成的本底升高的问题。此外,本研究采用了新型色原 HTIB,提高了酶法检测试剂的分析灵敏度,性能评价结果表明自主研发试剂空白吸光度为 0.009,分析灵敏度为 0.13,均优于东洋纺试剂。本研究进一步参照相关 EP 文件对自主研发试剂的相关性能的研究显示,高、低值血清测定变异系数分别为 1.5%和 1.1%,线性范围为 0~2 850 $\mu\text{mol/L}$,与东洋纺试剂的相关性较高,检测结果具有良好的可比性,说明自主研发试剂(改良酶法)操作简便、灵敏,与进口试剂间具有良好的相关性,符合临床应用基本要求。

参考文献

[1] 王敏,王琦,顾洁,等. 实验室肾功能相关检测项目在诊断慢性肾病中的特性分析[J]. 检验医学,2012,27(5):340-344.
[2] 周碧燕,李友邕,覃政,等. 血清肌酐常规测定方法和临床应用的研究进展[J]. 化学试剂,2011,33(8):718-722.
[3] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP5-A2 Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices [S]. Wayne,PA,USA:NCCLS,1999.
[4] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods:A statistical approach[S]. Wayne,PA,USA:NCCLS,2003.
[5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples [S]. Wayne,PA,USA:NCCLS,2002.
[6] 郑松柏,张秀明. 正确度性能评价[A]. //杨有业. 临床检验方法学评价[M]. 北京:人民卫生出版社,2008,118-139.
[7] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP7-A2 Interference testing in clinical chemistry[S]. Wayne,PA,USA: NCCLS,2002.
[8] 梁芳,冯志军,李立和,等. 血清肌酐二步酶法检测新技术研究[J]. 检验医学,2012,27(10):809-812.

(收稿日期:2014-11-10)

(上接第 502 页)

prenatal diagnosis through fluorescence in situ hybridization for preventing aneuploidy related birth defects[J]. Indian J Hum Genet,2013,19(1):32-42.
[2] Stumm M,Wegner RD,Bloechle M,et al. Interphase M-FISH applications using commercial probes in prenatal and PGD diagnostics[J]. Cytogenet Genome Res,2006,114(3/4):296-301.
[3] Evers-Kiebooms G,Swerts A,van den Berghe H. Psychological aspects of amniocentesis; anxiety feelings in three different risk groups[J]. Clin Genet,1988,33(3):196-206.
[4] Tepperberg J,Pettenati MJ,Rao PN,et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH):2-year multi-center retrospective study and review of the literature[J].

Prenat Diagn,2001,21(4):293-301.
[5] Tekin M,Jackson-Cook C,Buller A,et al. Fluorescence in situ hybridization detectable mosaicism for Angelman syndrome with biparental methylation[J]. Am J Med Genet,2000,95(2):145-149.
[6] Cotter PD,Musci TJ,Norton ME. Rapid prenatal diagnosis in translocation carriers by interphase FISH with chromosome-specific subtelomere probes[J]. Am J Med Genet A,2003,122(1):1-5.
[7] 赵欣荣,吴怡,韩旭,等. 荧光原位杂交产前诊断染色体异常的临床应用[J]. 中国优生与遗传杂志,2012,20(5):46-47.

(收稿日期:2014-12-10)