

• 论 著 •

应用 MLPA 技术分析非平衡性染色体结构异常*

谢润桂, 娄季武, 刘彦慧[△], 林洋洋
(东莞市妇幼保健院产前诊断中心, 广东东莞 523107)

摘 要:目的 探讨多重连接依赖探针扩增(MLPA)技术在非平衡性染色体结构异常诊断中的应用价值。方法 采用染色体非整倍体及亚端粒区 MLPA 技术,检测 6 例核型分析诊断为非平衡性染色体结构异常的标本。结果 6 例病例经 MLPA 分析,均检出染色体相应区域探针信号异常,非平衡性染色体结构异常均涉及亚端粒区。结论 MLPA 技术,特别是亚端粒 MLPA 技术在非平衡性染色体结构异常诊断中具有重要价值,可以为细胞遗传学诊断提供补充。

关键词:多重连接依赖探针扩增; 非平衡性染色体结构异常; 染色体; 核型
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.10.007 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2015)10-1336-03

Application of MLPA for analysis of chromosomal unbalances^{*}
Xie Rungui, Lou Jiwu, Liu Yanhui, Lin Yangyang

(Center of Prenatal Diagnosis, Dongguan Maternal and Child Health Hospital, Dongguan, Guangdong 523107, China)

Abstract: Objective To valuate the applicability of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for detection of chromosomal unbalance. **Methods** Aneuploid and subtelomeric MLPA technology were used to analyze 6 samples with chromosomal unbalances, confirmed by karyotype analysis. **Results** All samples were identified to have abnormal signal of corresponding probes. The extent of unbalances contained subtelomeric region. **Conclusion** MLPA technology could have important role in diagnosis of chromosomal unbalance, which could complement conventional karyotype analysis.

Key words: multiplex ligation-dependent probe amplification; chromosomal unbalance; chromosome; karyotype

多重连接依赖探针扩增(MLPA)是一种结合分子杂交、连接和聚合酶链反应(PCR)的半定量检测技术,于同一反应管内可同时检出 40 个不同核苷酸序列拷贝数的变化^[1]。和临床常规应用的染色体核型分析技术相比,MLPA 具有快速、特异、灵敏、高效的特点。MLPA 在染色体病诊断方面主要用于快速检测胎儿染色体非整倍体数目异常^[2-4],而在非平衡性染色体结构异常诊断中的应用比较少。本研究联合利用染色体非整倍体检测试剂盒及染色体亚端粒检测试剂盒分析 6 例非平衡性染色体结构异常,旨在探讨 MLPA 在非平衡性染色体结构异常诊断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 6 例研究对象均为于本院接受产前诊断的孕妇,孕妇及其家属均知情同意。病例 1,孕 18 周,胎儿生长发育受限,母亲血清学筛查示唐氏综合征(简称唐氏)高风险;羊水核型检查示:45,XX,der(13;18)(q10;q10);父母核型均正常。病例 2,孕 27 周,母亲血清学筛查示唐氏高风险,B 超提示胎儿单脐动脉;脐血核型检查示:45,XX,del(18)(q22);父母核型均正常。病例 3,孕 18 周,母亲血清学筛查示唐氏高风险;羊水核型检查示:46,X,i(Xq)(q10);父母核型均正常。病例 4,孕 18 周,母亲血清学筛查示唐氏高风险,B 超提示胎儿单脐动脉;羊水核型检查示:45,XY,dic(15;18)(p11.2;p11.2),18 号染色体短臂末端疑似存在缺失;父母核型均正常。病例 5,孕 26 周,B 超提示胎儿双侧脑室扩张,长骨短;羊水核型检查

示:47,XY,+Mar,Mar 似 9 号染色体短臂;父母核型均正常。病例 6,孕 26 周,B 超提示胎儿多发畸形,胎头呈草莓状,小脑下蚓部及左眼球发育不良,室间隔缺损,胃十二指肠梗阻性病变,右足趾发育不良,左趾姿态异常;脐血核型检查示:45,XY,-13,+Mar;父母核型均正常。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采集羊水或脐血及夫妇外周血标本,采用酚氯仿法提取基因组 DNA,测定 DNA 浓度及纯度。

1.2.2 MLPA 检测 采用荷兰 MRC-Holland 公司 P095 染色体非整倍体检测试剂盒及 P036、P070 亚端粒区检测试剂盒。DNA 变性,探针杂交、连接及扩增均参照试剂盒说明书。采用美国 ABI 公司 3500XL 遗传分析仪对扩增产物进行毛细管电泳分析,生成的数据采用 GeneMapper 软件(美国 ABI 公司)及 Coffaylser9.4 软件(荷兰 MRC-Holland 公司)进行分析。

2 结 果

6 例病例胎儿 MLPA 检测结果均存在异常,并且均涉及亚端粒区异常,见表 1。各病例父母 MLPA 检测均未见异常。病例 1、2、3 胎儿 MLPA 检测发现 18p11.3、18p11.2、18q23 探针信号减弱,与核型分析所发现的 18 号染色体存在或可疑存在部分缺失相符合。病例 4 胎儿 X 染色体长臂等臂[核型 46,X,i(Xq)]MLPA 检测表现为 X 染色体短臂探针信号减弱,长臂信号增强。MLPA 分析结果提示病例 5、6 胎儿的标记染色体分别来自于 9 号和 13 号染色体短臂片段。

* 基金项目:广东省东莞市卫生局重点课题(2012105102003)。 作者简介:谢润桂,男,主管检验师,主要从事遗传学研究。 [△] 通讯作者,E-mail:350753856@qq.com。

表 1 染色体异常标本核型及 MLPA 检测结果

病例	核型	MLPA 检测异常信号探针的染色体位置	
		P095	P036/P070
病例 1	45,XX,der(13;18)(q10;q10)	18p11.3;18p11.2 del	18p11.3 del
病例 2	45,XX,del(18)(q22)	18q23 del	18q23 del
病例 3	46,X,i(Xq)	Xp11.4-Xp22.2 del;Xq11.2-Xq28 dup	Xpter del;Xq28 dup
病例 4	45,XY,dic(15;18)(p11.2;p11.2)	18p11.3 del	18p11.3 del
病例 5	47,XY,+Mar	未检出异常	9q34.3 dup
病例 6	46,XY,-13,+Mar	(13q12.3-13q14.3) dup;(13q21.3-q34) del	13q12.11 dup;13q34 del

del:缺失;dup:重复。

3 讨 论

本研究联合采用染色体非整倍体检测试剂盒及染色体亚端粒检测试剂盒分析了 6 例非平衡性染色体结构异常,均发现相应探针信号异常。病例 1、2、3 胎儿核型分析已经明确了缺失或重复的染色体片段来源,MLPA P095、P036/070 试剂盒均检出相应探针信号减弱或增强,可以验证核型分析的结果。病例 1、病例 2 胎儿核型分析均显示 18 号染色体短臂 18p11.3 存在部分缺失,MLPA 检测结果也提示 18p11.3 探针信号减弱。病例 3 胎儿核型为 46,X,i(Xq)(q10),MLPA 检测结果也表现出很典型的特点:X 染色体短臂探针信号全部减弱,长臂探针信号全部增强;提示 X 染色体短臂存在部分单体,而长臂存在部分三体。

MPLA 检测也可帮助确定核型分析中可疑的染色体缺失或重复。如病例 4 所示,孕妇羊水染色体核型为 45,XY,dic(15;18)(p11.2;p11.2),双着丝粒染色体中 18 号染色体疑似存在短臂小片段缺失。MLPA 检测结果显示 18 号染色体短臂(18p11.21)上 1 个探针信号减弱,提示 18 号染色体短臂末端 18p11.21 存在缺失。同样,对于核型分析中出现的 Mar 片段,经 MLPA 检测后也反映出染色体拷贝数变化的信息。这些信息对确定 Mar 片段的染色体来源具有指导意义。如病例 5、6 所示,病例 5 胎儿染色体核型为 47,XY,+Mar,Mar 疑似为 9 号染色体短臂,MLPA P036/070 检测显示 9 号染色体短臂亚端粒区探针信号增强,而父母 9 号染色体短臂亚端粒区信号正常,因此可以证实该 Mar 片段来源于 9 号染色体短臂。病例 6 胎儿染色体核型为 45,XY,-13,+Mar,B 超提示胎儿多发畸形,畸形表现符合帕陶氏综合征的表现,但核型不能确认 Mar 片段是否来自 13 号染色体。MLPA 检测提示 13 号染色体 13q21.3-q34 存在缺失,与核型分析结果一致,而 13q12.3-q14.3 探针信号增强,说明 Mar 片段来源于 13 号染色体 13q12.3-q14.3 片段。

本研究中的 6 例非平衡性染色体结构异常病例均经亚端粒 MLPA 检出染色体末端缺失或重复。涉及染色体末端的非平衡性染色体结构异常很常见^[5-7]。亚端粒 MLPA 含有针对 23 对染色体长臂和短臂末端的探针,能够准确检测染色体末端的微小缺失或重复^[5]。MLPA P095 染色体非整倍体检测试剂盒含有 21、18、13、X 染色体 8 对探针,Y 染色体 4 对探针,通常用于检测 21、18、13、X、Y 染色体的非整倍体数目异常。本研究中 5 例涉及常见发生异常的 13、18、X 染色体,MLPA P095 试剂盒也检出相应位置探针信号的增强或重复,说明采

用 MLPA 检测染色体非整倍体改变时,如果发现个别探针,特别是染色体尾端的探针信号异常,需要加以注意。其他研究也报道了由于染色体结构异常而导致 MLPA 个别探针信号变化的情况^[8]。

另一种常用于染色体平衡易位与非平衡易位检测的技术是荧光原位杂交(FISH)^[9]。与 MLPA 相比,FISH 检测信号直观、准确,并且能够发现异常染色体在整套染色体中的定位。但 FISH 需要针对不同的平衡或非平衡易位设计(或购买)不同的探针,增加了实验的复杂性。此外,受限于荧光标记种类,FISH 很难一次检测全部染色体。而 MLPA 一次实验可同时检测多个标本,并且亚端粒 MLPA 可以对每个标本的 23 对染色体长、短臂末端进行扫描,不需要针对不同染色体的不平衡易位设计不同探针,大大提高了检测的方便性和经济性。但是,由于受探针密度的限制,MLPA 很难确定染色体缺失或重复的范围,且 MLPA 分析的是探针信号的强弱,只能判断有无缺失或重复,而不能发现异常染色体在整套染色体中的定位。因此,两者具有相互性^[10]。

综上所述,MLPA 技术,特别是亚端粒 MLPA 技术在非平衡性染色体结构异常诊断中具有重要价值,可以做为细胞遗传学诊断的辅助方法。

参考文献

[1] 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): 57-62.

[2] van Opstal D, Boter M, de Jong D, et al. Rapid aneuploidy detection with multiplex ligation-dependent probe amplification: a prospective study of 4000 amniotic fluid samples[J]. Eur J Hum Genet, 2009, 17(1): 112-121.

[3] 刘敏娟, 段程颖, 王伟, 等. 多重连接依赖的探针扩增(MLPA)技术在自然流产样本检测中的应用[J]. 复旦学报:医学版, 2013, 26(1): 83-87.

[4] 江雨, 王文博, 吴琦嫦, 等. MLPA 技术在快速检测胎儿染色体非整倍体异常中的应用[J]. 中国妇幼保健, 2009, 18(19): 2720-2724.

[5] Bruno DL, Burgess T, Ren H, et al. High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy[J]. Am J Med Genet A, 2006, 140(24): 2786-2793.

[6] Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, et al. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of(下转第 1340 页)

刺激后,人肺泡巨噬细胞 ROS 的分泌变化并不明显,见图 4。而作为阳性对照的 LPS 却诱导了明显的 ROS 产生。

2.5 NOD2 信号对人肺泡巨噬细胞 DEF4B 表达的影响
MDP 刺激后,人肺泡巨噬细胞中抗菌肽 DEF4B 基因的表达明显上调,见图 5。

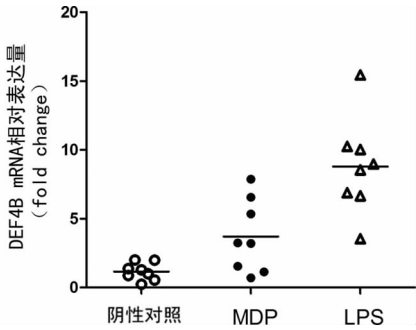


图 5 NOD2 信号对人肺泡巨噬细胞 DEF4B 表达的影响

3 讨论

NOD2 是一种胞内模式识别受体,其与配体结合后,可以诱发一系列炎症因子的产生^[5-7],从而在抗感染免疫中发挥重要作用。近年来,关于 NOD2 对抗胞内菌感染的贡献日益受到人们的关注,这其中就包括了结核分枝杆菌的感染^[8]。有研究表明,NOD2 缺陷的小鼠控制结核分枝杆菌的能力明显减弱^[3],说明 NOD2 在天然抗结核免疫中具有重要作用。

巨噬细胞既是结核分枝杆菌寄生的场所,同时又是抗结核免疫的主要效应细胞。最近,人们发现 NOD2 可以在人肺泡巨噬细胞中表达^[9],但其在结核天然免疫中的作用及机制并不清楚。笔者利用流式细胞术和 PCR 的方法分别在蛋白和基因水平证实了 NOD2 在人肺泡细胞中的表达。在天然抗结核免疫中,巨噬细胞主要通过 NO 和 ROS 的分泌、自噬作用及抗菌肽的释放来杀灭胞内结核分枝杆菌^[10-11]。有研究证实,NOD2 信号刺激能诱导自噬酶 IRGM 的高表达和抗菌肽 LL37 的分泌,从而增强巨噬细胞杀灭结核分枝杆菌的效应^[12]。本研究结果也表明,NOD2 信号刺激能增强人肺泡巨噬细胞对胞内结核分枝杆菌的控制。为了进一步阐明这种效应的作用机制,笔者评价了 NOD2 信号刺激对人肺泡巨噬细胞 NO、ROS 及另外一种重要的抗菌肽——DEF4B 的分泌或表达的影响。研究结果显示,MDP 刺激后,人肺泡巨噬细胞中 NO 的分泌和 DEF4B 的表达水平明显增加,这提示 NOD2 可能通过这两者在抗结核天然免疫中发挥作用。令人意外的是,MDP 刺激后,ROS 水平变化并不明显,这可能与 NOD2 信号激发的基因表达谱有关。

总而言之,本研究结果提示 NOD2 可能参与了早期的抗结核感染免疫,从而阻止疾病的进展。这种效应与其诱导的

NO 和抗菌肽 DEF4B 的产生有关,而与 ROS 关系并不明显,其具体机制仍待进一步研究证实。

参考文献

[1] Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, et al. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia—molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction[J]. *Respir Res*, 2006, 7(1):97.

[2] Kanneganti TD, Lamkanfi M, Núez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease[J]. *Immunity*, 2007, 27(4): 549-559.

[3] Divangahi M, Mostowy S, Coulombe F, et al. NOD2-deficient mice have impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection through defective innate and adaptive immunity[J]. *J Immunol*, 2008, 181(10):7157-7165.

[4] Juárez E, Nuez C, Sada E, et al. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes[M]. *Respir Res*, 2010, 11(1):2.

[5] Park JH, Kim YG, Núez G. RICK promotes inflammation and lethality after gram-negative bacterial infection in mice stimulated with lipopolysaccharide[J]. *Infect Immun*, 2009, 77(4): 1569-1578.

[6] Werts C, le Bourhis L, Liu J, et al. Nod1 and nod2 induce CCL5/RANTES through the NF-kappaB pathway[J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37(9):2499-2508.

[7] Ekman AK, Cardell LO. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils[J]. *Immunology*, 2010, 130(1):55-63.

[8] Jo EK. Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2008, 21(3):279-286.

[9] Brooks MN, Rajaram MV, Azad AK, et al. NOD2 controls the nature of the inflammatory response and subsequent fate of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* BCG in human macrophages[J]. *Cell Microbiol*, 2011, 13(3):402-418.

[10] Amer AO, Swanson MS. Autophagy is an immediate macrophage response to *Legionella pneumophila*[J]. *Cell Microbiol*, 2005, 7(6):765-778.

[11] Amer AO, Byrne BG, Swanson MS. Macrophages rapidly transfer pathogens from lipid raft vacuoles to autophagosomes[J]. *Autophagy*, 2005, 1(1):53-58.

[12] Juárez E, Carranza C, Hernández-Sánchez F, et al. NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* in humans[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(4): 880-889.

(收稿日期:2015-02-28)

(上接第 1337 页)

the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities[J]. *J Med Genet*, 2006, 43(6):478-489.

[7] Linardopoulou EV, Williams EM, Fan Y, et al. Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication[J]. *Nature*, 2005, 437(7055):94-100.

[8] 张菁菁, 胡平, 罗春玉, 等. 应用多重连接依赖探针扩增技术快速检测胎儿染色体非整倍体与结构异常[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2014, 31(1):11-15.

[9] Gignac J, Danis K, Tihy F, et al. Prenatal detection of subtelomeric rearrangements by multi-subtelomere FISH in a cohort of fetuses with major malformations[J]. *Am J Med Genet A*, 2006, 140(24):2768-2775.

[10] Bruno DL, Burgess T, Ren H, et al. High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy[J]. *Am J Med Genet A*, 2006, 140(24):2786-2793.

(收稿日期:2015-03-10)