

• 论 著 •

MLPA 技术联合染色体核型分析检测儿童发育异常的临床研究

杨 帆 林 琳¹, 张 燊¹, 赵克温^{2△}

1. 上海市交通大学医学院附属瑞金医院检验科, 上海 200025;

2. 上海交通大学医学院病理生理教研室, 上海 200025)

摘要:目的 探讨多重链接依赖性探针扩增(MLPA)技术联合染色体核型分析在检测儿童发育异常中的临床应用价值。**方法** 收集 87 例生长发育异常的儿童, 抽取外周血进行传统 G 显带核型分析, 并运用 MLPA 技术进行染色体微缺失等检测, 分析发育异常儿童的染色体情况。**结果** 87 例患儿中检出异常核型 22 例, 异常率为 25.3%, 包括 46,XY, 小 Y 染色体核型 10 例、45,X 核型 2 例、45,X/46,XY 核型 1 例、46,XY/45,XX 核型 1 例、47,XXY 核型 1 例等。在 65 例正常核型中 MLPA 仍检测出 8 例存在微缺失或微重复。**结论** MLPA 技术联合染色体核型分析为临床诊断儿童发育异常提供了一条有效、准确的检测流程, 有利于提高染色体异常的检出率和准确率。

关键词:核型分析; 多重连接依赖性探针扩增技术; 发育异常

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.22.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)22-3104-03

Clinical study of MLPA technology combined with chromosomes

karyotype analysis in detecting child development disorders

YANG Fan¹, LIN Lin¹, ZHANG Rong¹, ZHAO Kewen^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Ruijin Hospital; 2. Teaching and Researching Section of Pathophysiology, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

Abstract: Objective To study the clinical application value of the multiple link dependency probe amplification(MLPA) technology combined with chromosomes karyotype analysis in detecting child development abnormalities. **Methods** 87 children of growth and development abnormality were collected. Peripheral blood samples were extracted for conducting traditional G -banded karyotype analysis. Moreover the MLPA technique was applied to conduct the chromosome microdeletion detection. The chromosome situation in children of development abnormality was analyzed. **Results** Among 87 children patients, 22 cases of abnormal karyotype were detected out, the abnormality rate was 25.3%, including 10 cases of small Y chromosome karyotype(46 XY), 2 cases of Turner syndrome, 2 case of 45,X karyotype, 1 case of 45,X/46,XY karyotype, 1 case of 46,XY/45,XX karyotype, 1 case of 47,XXY karyotype, etc. Among 65 cases of normal karyotype, microdeletion/microduplication was still found in 8 cases by MLPA. **Conclusion** The MLPA technology combined with karyotype analysis provide an effective and accurate detection flow process for clinically diagnosing child development abnormality and is conducive to increase the detection rate and accuracy of chromosomal abnormality.

Key words: karyotype analysis; multiplex link-dependent probe amplification; disorder of development

细胞遗传学染色体核型分析是最常用和最经典的染色体异常检测方法, 但其受到分辨率的限制不能分辨染色体中的微缺失和微小重排。多重链接依赖性探针扩增(MLPA)技术是一种针对待测核酸中靶序列进行定性和半定量分析的高通量技术, 可检测多个核苷酸序列的拷贝数变化、小至 1 bp 的 DNA 序列变异和染色体的微缺失及微小重排^[1-2]。本研究探讨 MLPA 联合染色体核型分析在发育异常患儿诊断中的检出率和准确率, 旨在为临床提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1 月至 2016 年 12 月上海交通大学医学院附属瑞金医院儿科确诊的生长发育异常或性发育异常患儿 87 例作为研究对象, 年龄 4 月龄至 18 岁, 平均 9 岁。

1.2 仪器与试剂 QIAamp Blood DNA Mini 基因组 DNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司。SALSA MLPA P360-B1、P245-B1、P185-C2 微缺失检测试剂盒购自荷兰 MRC-Holland 公司, 其中 P360-B1 为 Y 染色体微缺失检测试剂, 包括针对 AZFa 区域(RPS24P1, ARSEP, USP9Y, DDX3Y, UTY, BPY1, VCY1B, NLGN4Y)的 16 个探针, 针对 AZFb 区域(RBMY1J,

DY2, KDM5D, EIF1AY, MY1J)的 15 个探针, 针对 AZFc 区域(DAZ, BPY, CDY 等)的 12 个探针; P245-B1 可用于某些已知缺失位点疾病的检测, 包括 DiGeorge 综合征(22q11)、Prader-Willi, NF1 缺失综合征、Wolf-Hirschhorn(4p16.3)等; P185-C2 主要用于两性畸形的检测, 探针包括 NR0B1(DAX1)、CXorf21(Xp21.2)、SRY(Yp11.3)、ZFY(Yp11.3)、SOX9(17q24.3)、NR5A1(9q33) 及 WNT4(1p36.12)等。QIAamp 核酸自动抽提仪购自德国 Qiagen 公司, 3500xL Dx 基因测序仪、ProFlex PCR 扩增仪购自美国 Applied Biosystem 公司。

1.3 方法

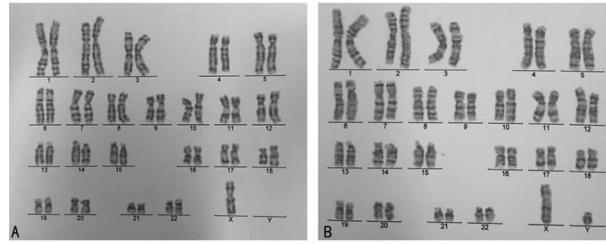
1.3.1 G 显带核型分析 抽取外周血, 肝素抗凝, 淋巴细胞培养 72 h, 经秋水仙素作用 4 h 阻断有丝分裂后常规制片。G 显带方法在显微镜下计数 20 个中期分裂相, 分析 5 个细胞核型。对于异常染色体核型, G 显带方法则计数 100 个中期分裂象, 分析 20 个细胞核型, 并按照人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN, 2009)描述染色体异常核型。

1.3.2 MLPA 检测 根据试剂盒说明书进行 MLPA 检测, 主要步骤包括:(1)DNA 变性, 98 °C 变性 5 min, 25 °C 冷却;

子杂交,95 ℃ 孵育 1 min,60 ℃ 孵育 16~20 h;(3)连接反应,54 ℃ 15 min,98 ℃ 5 min,20 ℃ 冷却;(4)特异性 PCR 扩增,95 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 60 s,共扩增 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 20 min,15 ℃ 冷却;(5)扩增产物序列分析。运用 Coffalyser. Net 软件对 MLPA 结果进行分析,比较标本检测结果与正常男性对照、正常女性对照的发育商(DQ)值,以 $0.8 < DQ < 1.2$ 为正常。

2 结 果

2.1 G 显带核型分析结果 87 例患儿中检出染色体异常 22 例,异常率为 25.3%,包括性腺发育不全 9 例、身材矮小 5 例、特纳综合征 2 例、两性畸形 3 例、女性伴 46,XY 核型 2 例、男性 47,XXY 核型 1 例。见图 1。



注:A 为 45,X 核型;B 为 46,XY,小 Y 染色体核型。

图 1 异常染色体核型

2.2 正常染色体核型 MLPA 检测结果 65 例正常核型患儿

表 1 正常染色体核型 MLPA 检测结果

染色体核型	性别	n	MLPA-P360	MLPA-P245	MLPA-P185
46,XX	女	26	1 例 SHOX 调控区	有重复序列	—
46,XY	男	39	6 例 Y 染色体	存在缺失/重复	1 例 NF1 微缺失

注:—表示无数据。

表 2 异常染色体核型 MLPA 检测结果

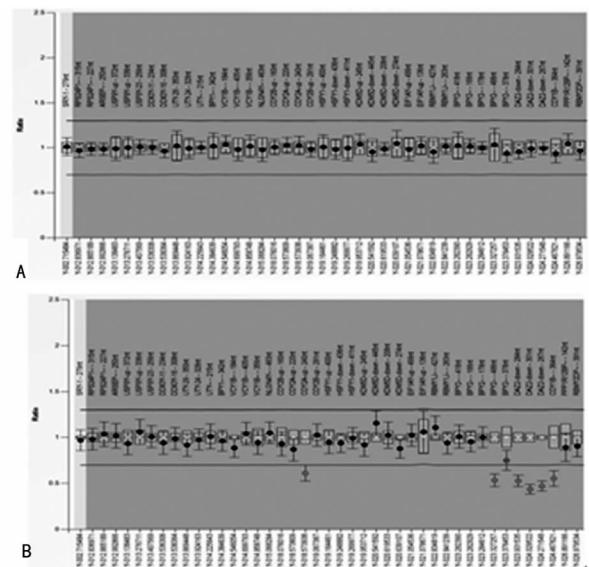
异常染色体核型	临床表现	n	MLPA-P360	MLPA-P245	MLPA-P185
46,XY,小 Y 染色体	性腺发育不全身材矮小	6	仅 1 例 Yq11.223 部分区域有重 复,其余拷贝数均无异常	—	—
45,X	特纳综合征	2	—	2 例 X 染色体拷贝数 均低于正常女性	—
46,XY	女性伴 46,XY 核型	2	—	—	—
46,XY,1qh+	两性畸形	1	—	—	—
46,XY,13p+	身材矮小	1	有重复序列	—	—
46,XY,大 Y 染色体	性腺发育不全	1	—	—	—
46,X,i(Xq)	性腺发育不全	1	12q14 DPY19L2 基因拷贝数减少	—	—
46,XY,1qh+,15ps+	性腺发育不全	1	—	—	—
45,X[50]/46,XY[10]	两性畸形	1	拷贝数低于正常男性	拷贝数低于正常女性	拷贝数低于正常男性
46,XY[50]/45,XX,der (13;14)(q10;q10)[10]	两性畸形	1	拷贝数低于正常男性	拷贝数低于正常女性	拷贝数低于正常男性
47,XXY	Klinefelter 综合征	1	拷贝数与正常男性相同	拷贝数与正常女性相同	—

注:—表示无数据。

3 讨 论

性发育疾病和儿童发育迟缓都是 X、Y 染色体或常染色体遗传信息异常导致的遗传性疾病。常规的 G 显带染色体核型分析检测周期较长,且分辨率较低;原位荧光杂交通过观察荧光信号在染色体上的位置和数目反映相应染色体片段的状况,

中,正常女性(46,XX)26 例,正常男性(46,XY)39 例,无异常拷贝数。见图 2、表 1。



注:A 为正常;B 为缺失。

图 2 Y 染色体 MLPA-P360 检测结果

2.3 异常染色体核型 MLPA 检测结果 见表 2。

是最早用于微缺失检测的技术;MLPA 技术的发展使其实现了对拷贝数改变和多位点检测的常规设置,但却不能检测未知的点突变;新一代测序反应涵盖了整个基因序列或整个外显子序列,可以检测单个核苷酸的改变^[3~7]。除此之外,还有染色体微阵列芯片技术及细菌人工染色体微珠技术等^[8~9]。这些新兴

技术方法提高了临床检测的有效性,但高昂的费用限制了它们的推广和普及。

本研究联合应用 G 显带技术和 MLPA 技术检测发育异常患儿,结果显示:87 例患者中有 22 例存在染色体核型异常,异常率为 25.3%;39 例正常男性(46,XY)中有 6 例存在 Y 染色体微缺失或微重复(SRY 基因均为阳性),异常率为 15.4%,与相关文献 14% 的检出率相近^[6];异常区域主要包括 DAZ、BPY、CDY,临床表现多为小阴茎或性腺发育不全;1 例正常男性(46,XY)发现 SHOX 调控区异常,1 例正常女性(46,XX)发现 NF1 基因异常。有研究表明 SHOX 基因与矮小症、骨骼畸形有关^[10],患儿的临床表征即为身材矮小,与本检测结果相符。NF1 为肿瘤抑制基因,自发突变率很高,且未发现明确的突变热点。该基因可能与神经纤维瘤、多发咖啡斑等疾病有关^[11],其是否可作为诊断标准或预后评估仍需要进一步的研究证实。

本研究中有 9 例性腺发育不全患者存在染色体核型异常,其中 6 例为 46,XY,小 Y 染色体。有研究认为小 Y 染色体是 Y 异染色质部分或完全丢失,导致常染色质排列松散,造成其基因功能丧失;也有研究认为小 Y 染色体是 Y 染色质排列过度紧密影响其基因功能发挥^[12]。本研究发现,6 例患儿 Y 染色体拷贝数与正常男性无差异(SRY 基因均为阳性),其可能是 Y 染色质结构过度紧密造成,需应用其他检测技术进一步确定其致病原因和致病机理。

本研究结果显示 MLPA 检测结果与 G 显带核型分析具有很好的一致性,如:2 例 45,X 核型,其 MLPA 检测结果为无 Y 染色体拷贝,X 染色体拷贝数均低于正常女性;1 例 45,X/46,XY 嵌合型,其 MLPA 检测结果为 X、Y 染色体拷贝数均小于正常男、女性;2 例女性伴 46,XY 核型,其 MLPA 检测结果与正常男性一致;1 例男性 47,XXY 核型,其 MLPA 检测结果 Y 染色体拷贝数与正常男性一致,X 染色体与正常女性一致。对于嵌合型,应用 MLPA 技术检测能够更好地确定正常核型与异常核型所占的比例,判断临床症状的轻重程度,尽早诊断确定单一性别,有助于患儿通过手术或药物进行治疗,对于避免日后出现心理障碍、保证生活质量具有重要意义。

综上所述,染色体核型分析是性发育异常最基本的检测内容,MLPA 技术弥补了染色体核型分析低分辨率的不足。MLPA 技术联合染色体核型分析为临床诊断儿童发育异常提供了一条有效、准确的检测流程,有利于提高染色体异常的检出率和准确率。

参考文献

- [1] Schoum 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.
- [2] Pohovski LM, Dumic KK, Odak L, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification workflow for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities in patients with developmental delay/intellectual disability [J]. Mol Cytogenet, 2013, 6(1):7-13.
- [3] Bartnik M, Nowakowska B, Derwinnnska K, et al. Application of array comparative genomic hybridization in 256 patients with developmental delay or intellectual disability [J]. J Appl Genet, 2014, 55(1):125-144.
- [4] Manolakos E, Vetro A, Kefalas K, et al. The use of array- CGH in a cohort of Greek children with developmental delay[J]. Mol Cytogenet, 2010, 3(1):22-30.
- [5] 王松涛,潘虹,裴珮等. MLPA 技术检测发育迟缓和智力障碍患儿的染色体微小重排的应用价值[J]. 中华医学杂志,2014,94(32):2514-2518.
- [6] Leona MP, Katja KD, Ljubica O, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification workflow for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities in patients with developmental delay/intellectual disability [J]. Mol Cytogenet, 2013, 6(1):7.
- [7] Bier De, White SJ. Genotyping multiallelic copy number variation with multiplex ligation-dependent probe amplification(MLPA)[J]. Method Mol Biol, 2017, 1492(1):147-153.
- [8] 唐新华,杨必成,朱宝生,等. 染色体核型分析与 BoBs 技术联合检测染色体异常和染色体微缺失综合征的产前诊断新模式的建立及应用[J]. 中华妇产科杂志,2016,51(5):325-330.
- [9] 王增阁,郭奇伟,周裕林. 染色体微缺失微重复综合征遗传检测的现状及展望[J]. 中华检验医学杂志,2016,39(6):407-409.
- [10] 谢理玲. 人矮小同源盒基因在身材矮小中的研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(20):1526-1527.
- [11] 张佳,李明,姚志荣. 二例散发性 I 型神经纤维瘤病患儿的 NF1 基因突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2016,33(2):200-202.
- [12] 黄海燕,张香改,高羽,等. 117 例大小 Y 染色体临床意义分析[J]. 中国计划生育学杂志,2007,15(2):105-107.

(收稿日期:2017-03-19 修回日期:2017-07-08)

(上接第 3103 页)

- [8] Leffler DA, Lamont JJ. Clostridium difficile infection[J]. N Engl J Med, 2015, 373(3):287-288.
- [9] 林倩云,费稼希,陈烨. 艰难梭菌毒素致病基因调控机制和抗毒素治疗[J]. 胃肠病学,2017,22(1):47-50.
- [10] 谢玲林. 艰难梭菌感染的机制与防治进展[J]. 基层医学论坛,2017,21(1):110-111.
- [11] Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host bacterial mutualism in the intestine[J]. Science, 2005, 307(5717):

1915-1920.

- [12] Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine[J]. Cell, 2006, 124(4):837-848.
- [13] 廖亚龙,侯铁英,邵裕燊,等. 艰难梭菌感染临床特征与危险因素分析[J]. 中华医院感染学杂志,2016,26(21):4837-4840.

(收稿日期:2017-03-28 修回日期:2017-07-17)