

论著·基础研究

# QF-PCR 技术在胎儿常见染色体非整倍体快速诊断中的临床应用<sup>\*</sup>

刘沃满<sup>1</sup>, 唐玉芬<sup>1△</sup>, 黎洛冰<sup>2</sup>, 聂俊玮<sup>1</sup>, 谭满胜<sup>1</sup>

(茂名市妇幼保健院:1. 遗传优生优育中心;2. 产前诊断中心, 广东茂名 525000)

**摘要:**目的 分析 3 398 例胎儿常见染色体非整倍体快速诊断的结果,探讨荧光定量聚合酶链反应(QF-PCR)在胎儿常见染色体非整倍体中的临床应用价值。方法 应用 QF-PCR 技术快速检测产前诊断标本中的 13、18、21、X 及 Y 染色体,并与传统的 G 显带染色体核型分析结果对比。结果 在 3 398 例样本中,QF-PCR 共检出非嵌合型染色体数目异常 152 例,其中 21 三体综合征 93 例,18 三体综合征 30 例,13 三体综合征 6 例,X 单体 6 例,XXX 1 例,XXY 11 例,XYY 5 例,XXX 合并 18 三体综合征 1 例,上述检测结果与核型分析结果一致。嵌合型染色体数目异常 7 例,QF-PCR 检出 3 例,分别是 1 例 18 三体综合征嵌合体,1 例 21 三体综合征嵌合体,1 例 XXX 与 XX 嵌合体,还有 4 例嵌合体 QF-PCR 未能检出。另外有 2 例 QF-PCR 结果与核型分析结果不符。1 例 QF-PCR 结果为 XYY,染色体核型结果为 46,X,? der(Y),另 1 例 QF-PCR 结果为 XY,染色体核型结果为 45,X。结论 QF-PCR 技术能快速、准确诊断 13、18、21、X 及 Y 非嵌合型染色体非整倍体异常,可缓解核型分析结果时间过长给孕妇带来的焦虑,产前珠蛋白生成障碍性贫血基因诊断同时进行 13、18、21、X 及 Y 染色体非整倍体快速检测,能有效避免漏诊染色体异常胎儿。

**关键词:** 荧光定量聚合酶链反应; 产前诊断; 染色体非整倍体; 核型分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.19.002

中图法分类号:R714.5

文章编号:1673-4130(2019)19-2309-04

文献标识码:A

## Clinical application on rapid diagnosis of common chromosome aneuploidy in fetus by QF-PCR<sup>\*</sup>

LIU Woman<sup>1</sup>, TANG Yufen<sup>1△</sup>, LI Luobing<sup>2</sup>, NIE Junwei<sup>1</sup>, TAN Mansheng<sup>1</sup>

(1. Center for Genetic Excellence; 2. Prenatal Diagnosis Center, Maoming Maternal and Child Health Hospital, Maoming, Guangdong 525000, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the clinical value of quantitative fluorescence-polymerase chain reaction(QF-PCR) in the diagnosis of 3 398 cases of common chromosome aneuploidy in fetuses. **Methods** The QF-PCR technique was applied to detect the chromosomes 13, 18, 21, X and Y in prenatal diagnosis specimens, and the results were compared with the traditional G-banding karyotype analysis results. **Results** In 3 398 samples, QF-PCR detected 152 cases of non-chimeric chromosome abnormalities, including 93 cases of trisomy 21, 30 cases of trisomy 18, 6 cases of trisomy 13, 6 cases of X monomer, 1 case of XXX, 11 cases of XXY, 5 cases of XYY, 1 case of XXX combined with trisomy 18. The above detection results are consistent with the karyotype analysis results. There were 7 cases of abnormal number of chimeric chromosomes, 3 cases were detected by QF-PCR, 1 case of 18-trisomy chimera, 1 case of 21-trisomy chimera, 1 case of XXX and XX chimera, and 4 cases of chimera QF-PCR could not be detected. In addition, 2 cases of QF-PCR results were inconsistent with karyotype analysis results. The results of QF-PCR in one case were XYY and chromosome karyotype were 46,X,? der(Y), another QF-PCR result was XY, and the karyotype result was 45,X. **Conclusion** QF-PCR technology can rapidly and accurately diagnose 13, 18, 21, X and Y non-chimeric chromosome aneuploidy abnormalities, which can relieve the anxiety of pregnant women caused by long time of karyotype analysis results. Prenatal genetic diagnosis of thalassemia can simultaneously carry out rapid detection of 13, 18, 21, X and Y chromosome aneuploidy, which can effectively avoid missed diagnosis of fetus with chromosome abnormalities.

<sup>\*</sup> 基金项目:茂名市医学科学技术计划项目(2018007)。

作者简介:刘沃满,女,主管技师,主要从事分子遗传研究。△ 通信作者,E-mail:xinfu148501@163.com。

本文引用格式:刘沃满,唐玉芬,黎洛冰,等. QF-PCR 技术在胎儿常见染色体非整倍体快速诊断中的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(19): 2309-2312.

**Key words:** quantitative fluorescence-polymerase chain reaction; prenatal diagnosis; chromosome aneuploidy; karyotype analysis

染色体非整倍体异常是一种常见的染色体数目异常,其中以三体型和单体型最为常见。最常见的染色体数目异常包括 21 三体综合征、18 三体综合征、13 三体综合征、三倍体和性染色体数目异常,如 Klinefelter 综合征(47,XXY)、Jacobs 综合征(47,XXX)、XYY 综合征(47,XYY)和 Turner 综合征(45,X),约占产前诊断中有临床意义染色体异常的 80%<sup>[1]</sup>。这些疾病在胎儿期常表现为宫内死胎、流产等。出生后临床可表现为不同程度的智力低下、生长发育迟缓、性发育不良和其他组织器官畸形等,患者多数生活上不能自理,这给家庭和社会带来沉重的经济和精神负担。染色体异常目前还没有有效的治疗方法,仅能通过产前筛查和产前诊断干预患儿的出生,提高新生儿的质量。染色体核型分析是目前诊断染色体数目和结构异常的金标准,但因为是对活细胞进行培养,对环境条件和人员的要求比较高,而且以手工操作为主,耗时长,造成孕妇及其家属等待核型分析结果的焦虑。荧光定量聚合酶链反应(QF-PCR)技术是近年发展的一种快速诊断染色体非整倍体的分子生物学方法,目前已广泛应用于国内外多家产前诊断机构<sup>[2-7]</sup>。本研究是应用 QF-PCR 技术和核型分析两种方法对 3 398 例胎儿样本进行检测,并对结果进行比较分析,现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 87 例绒毛、219 例脐带血和 3 092 例羊水标本来自于 2016 年 3 月至 2018 年 12 月本院产前诊断中心就诊的 3 398 例高危孕妇,风险指标主要包括孕妇高龄、唐筛高风险、无创产前基因检测高风险、胎儿超声异常、夫妇双方患有珠蛋白生成障碍性贫血(简称地贫)、不良生育史和染色体异常家族史,孕周为 7~25 周。

**1.2 标本采集** 孕妇在本院产前诊断中心咨询并签署知情同意书,根据孕周的不同,在 B 超引导下进行绒毛或羊水或脐血穿刺取样后,同时进行染色体核型分析及 QF-PCR 检测。

**1.3 染色体核型分析** 按照常规细胞培养、收获、制片 G 显带,参照人类细胞遗传学命名的国际体制(2013 年)标准进行核型分析。

### 1.4 QF-PCR 检测方法

**1.4.1 STR 位点** 采用北京阅微基因技术有限公司的非整倍体检测试剂盒对常见 21、18、13 及性染色体非整倍体进行检测。共检测 27 个位点,包括 21 号染色体的 8 个 STR 位点,分别为 D21S2052、D21S1411、

D21S1446、LFG21、D21S1435、D21S11、D21S1246、Penta D;18 号染色体的 6 个 STR 位点,分别为 D18S51、D18S535、D18S1002、D18S877、D18S851、D18S391;13 号染色体的 6 个 STR 位点,分别为 D13S256、D13S797、D13S317、D13S305、D13S800、D13S325;性染色体的 7 个 STR 位点,分别为 DXS6809、DXS9895、AMEL、TAF9L(3 号染色体和 X 染色体)、ZFX、SRY、XHPRT。

**1.4.2 标本 DNA 的提取** 按 Chelex-100 法<sup>[8]</sup>提取脐血、羊水、绒毛等标本的 DNA。

**1.4.3 PCR 扩增** 在 Bio-Rad T100 型 PCR 扩增仪上扩增,反应条件:95 ℃ 5 min 预变性,然后 94 ℃ 30 s、60 ℃ 1 min、70 ℃ 1 min,循环 27 次,再 60 ℃ 延伸 60 min,最后扩增产物于 4 ℃ 避光保存备用。

**1.4.4 毛细管电泳** 取甲酰胺 8.5 μL,分子质量标记物 0.5 μL,PCR 扩增产物 1.0 μL,于 95 ℃ 变性 3 min,放置冰上迅速冰冷 3 min,用 ABI 3500 Dx 型遗传分析仪进行毛细管电泳。

**1.4.5 结果分析及判断标准** 采用 GeneMapper® ID-X 软件对电泳原始数据进行分析。参照英国临床分子遗传协会(CMGS)2012 年新颁布的指南进行分析。(1)双峰比值为 0.8~1.4 视为正常;当峰标记长度大于或等于 24 bp 时,峰高度或面积比值达 1.5 时也可视为正常。(2)三峰比值为 1:1:1 及双峰比值为 2:1(1.8~2.4)或 1:2(0.45~0.65)视为异常;(3)当双峰比值在 1.4~1.8 或 0.65~0.80 时,需要对该样本进行重测。(4)单峰一般为纯合,不能提供诊断信息。45,X 诊断的标准必须具备以下两个条件:(1)所有 X 染色体 STR 位点呈单峰;(2)TAF9L 基因座上的两个峰高比为 2:1(1.8~2.4)。

## 2 结果

**2.1 两种方法的检测结果比较** 应用 QF-PCR 方法成功检测 3 398 例样本,共检出非嵌合型染色体数目异常 152 例,见表 1。其中 21 三体综合征 92 例,18 三体综合征 30 例,13 三体综合征 6 例,X 单体 6 例,XXX 1 例,XXY 11 例,XYY 5 例,XXX 合并 18 三体综合征 1 例,上述检测结果与核型分析结果一致。嵌合型染色体数目异常 7 例,QF-PCR 检出 3 例,分别是 1 例 18 三体综合征嵌合体,1 例 21 三体综合征嵌合体,1 例 XXX 与 XX 嵌合体,还有 4 例嵌合体 QF-PCR 未能检出。另外,有 2 例 QF-PCR 结果与核型分析结果不符。1 例 QF-PCR 结果为 XYY,染色体核型结果为 46,X,? der(Y),另 1 例 QF-PCR 结果为 XY,染色体核型结果为 45,X。

表 1 QF-PCR 检测的 5 种染色体非整倍体结果与核型分析结果

QF-PCR 结果	QF-PCR 检测例数(n)	核型分析结果	核型分析检测例数(n)	QF-PCR 结果	QF-PCR 检测例数(n)	核型分析结果	核型分析检测例数(n)
13 三体综合征	6	47,XX,+13	4	XXX	2	47,XXX	1
		46,XX,der(13-14)(q10;q10),+13	1			mos47,XXX[92]/46,XX[8]	1
		47,XX,t(2;13)(q24;q12),+13	1	XY	5	47,XY	5
18 三体综合征	31	47,XN,+18	29	XXX,+18	1	XXX,+18	1
		mos47,XX,+18[79]/46,XX[21]	1	XY	1	45,X0	1
		47,XY,inv(9)(p11q13),+18	1	XY	1	46,X,? der(Y)	1
21 三体综合征	93	47,XN,+21	83	XX	1	mos47,XX,21[10]/46,XX,[90]	1
		47,XN,1qh+,+21	8	XX	2	mos45,X[11]/46,XX[89]	2
		47,XY,21pstk+,+21	1	XX	1	mos45,X[14]/46,XX[86]	1
		mos47,XY,+21[50]/46,XY,[50]	1	XY	1	mos45,X[21]/46,XY,[29]	1
X 单体	6	45,X0	6	XY	1	mos45,X[15]/46,XY[35]	1
XXY	11	47,XXY	11				

2.2 其他染色体核型分析异常结果 共检出其他染色体核型分析异常 100 例,包括染色体易位 65 例、倒位 14 例、缺失 7 例的结构异常和其他染色体数目异常 14 例,因不在 QF-PCR 检测范围内,未能检测到。

2.3 检出 1 例双三体 在 3 398 例胎儿样本中,发现 1 例 XXX 合并 18 三体综合征的双三体,核型结果为 48,XXX,+18 见图 1、2。

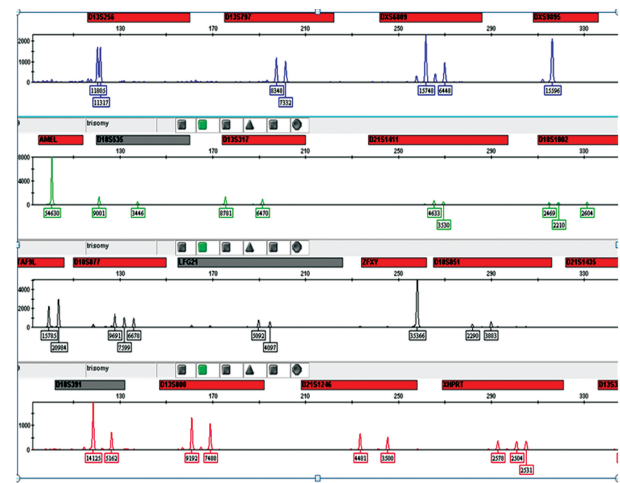


图 1 XXX,+18 QF-PCR 检测结果图

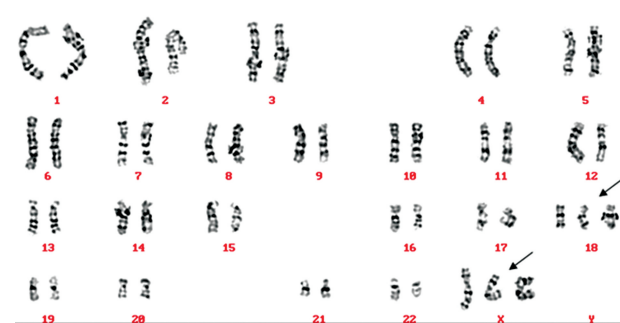


图 2 48,XXX,+18 的核型分析结果

2.4 产前地贫基因诊断同时进行 QF-PCR 检测的结

果 患有地贫的夫妇双方进行产前地贫基因诊断的 1 041 个家庭,同时进行了 QF-PCR 检测,地贫基因产前诊断结果为轻型或正常,而 QF-PCR 则检出 2 例 21 三体综合征,1 例 XXY 染色体非整倍体异常胎儿。

3 讨 论

QF-PCR 检测是利用 STR 遗传标记在人群中的多态性,采用多重 PCR 扩增及毛细管电泳技术,通过分析各 STR 点荧光峰的个量或面积的比值从而达到判断染色体数目[9]。QF-PCR 技术与 G 显带的核型分析方法相比,具有以下优点:(1)快速。核型分析方法因需要对胎儿活细胞进行培养,至少要 2~3 周才能出结果,而 QF-PCR 可在 24~48 h 内得出结果,大大缩短了报告时间,减轻了孕妇在等待报告过程中产生的心理负担和焦虑;(2)所需的样本量少,可以同时进行单基因病的诊断;(3)操作简便、自动化程度高、通量大;(4)可以根据 STR 等位基因的个性化信息判别多余染色体的来源,鉴别母体组织污染。但是 QF-PCR 技术仍存在以下不足:(1)目前 QF-PCR 只能检测 13、18、21、X 及 Y 这 5 条染色体的数目异常,对其他染色体数目异常无法检出;(2)对比例低的嵌合体异常无法检出;(3)不能诊断染色体结构异常。

本报道中的 3 398 例产前标本采用 QF-PCR 技术检测,均在 24~48 h 内成功得出结果。共检出非嵌合型 13、18、21、X 及 Y 5 种染色体数目异常 152 例,与核型分析结果一致,说明 QF-PCR 技术检测常见 5 种染色体非整倍体有较高的特异度和灵敏度,与文献报道相符[10]。用 QF-PCR 方法是检测不到的嵌合比例低于 15%~20% 的嵌合体[11],本研究中的 7 例嵌合体检出 3 例,嵌合比例都大于 30%。1 例 QF-PCR 结果为 XYY,而染色体核型结果为 46,X,? der(Y)。

疑是 2 个 Y 染色体在着丝粒连接成一个衍生的 Y 染色体。1 例 QF-PCR 结果为 XY, 染色体核型结果为 45,X, 未检出 Y 染色体。可能是含有 Y 基因的 Y 片段易位至 X 染色体或其他常染色体上, 其社会性别将表现为男性, 但未能有生育能力<sup>[12]</sup>。检出 1 例 X 三体加 18 三体综合征的双三体。双三体是少见的染色体数目异常。非整倍体的发生机制是由于生殖细胞分裂过程中同源染色体不分离所造成, 且多发生于第一次减数分裂时, 其结果形成三体性或单体性异常。双三体则由于双原发不分离所造成<sup>[13]</sup>。在 18 三体综合征中双三体病例占 5%~10%<sup>[13]</sup>。

广东省为地贫高发区, 在某些地区地贫基因携带率可高达 16.83%<sup>[14]</sup>。中重度地贫患儿的出生会给家庭和社会造成巨大疾病和经济负担。目前通过采取婚前、孕前检查, 以及产前筛查和诊断等防控措施, 可减少重型地贫儿的出生。在进行产前地贫基因诊断的同时进行 QF-PCR 检测常见染色体数目异常, 不增加所取的样本量, 就可以避免缺陷儿的出生。在本报道中的患有地贫的夫妇双方进行产前地贫基因诊断的 1 041 个家庭, 检出 2 例 21 三体综合征, 1 例 XXY, 及时终止妊娠, 避免了染色体异常胎儿的出生。

4 结 论

QF-PCR 技术用于诊断产前染色体非嵌合型非整倍体如 13、18、21、X 及 Y 异常, 具有快速、准确、通量大和操作简单等优点, 避免了孕妇及家属长时间等待核型分析结果的焦虑, 也避免了延至妊娠后期流产对孕妇身体造成较大的创伤。但 QF-PCR 技术目前只能检出 5 种常见染色体的数目异常, 不能检出染色体结构异常和其他染色体数目异常。因此, QF-PCR 技术同其他快速产前诊断技术一样, 不能代替传统的 G 显带核型分析, 仅可作为核型分析的一种有力补充。

参考文献

[1] JAIN S, PANIGRAHI I, SHETH J, et al. STR markers for detecting heterogeneity in Indian population[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(1): 461-465.

[2] BROWN L, ABIGANIA M, WARBURTON D, et al. Validation of QF-PCR for prenatal aneuploidy screening in the United States[J]. Prenat Diagn, 2006, 26(11): 1068-

1074.

[3] CIRIGLIANO V, VOGLINO G, ORDONEZ E, et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience[J]. Prenat Diagn, 2009, 29(1): 40-49.

[4] DRISCOLL D, GROSS S. Clinical practice. Prenatal screening for aneuploidy[J]. N Engl J Med, 2009, 360(24): 2556-2562.

[5] 孙雷, 樊祖茜, 龙驹, 等. 重复片段的荧光定量 PCR 技术在快速检测胎儿染色体非整倍体异常中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(3): 32-33.

[6] 张敏, 徐两蒲, 黄海龙, 等. 应用 QF-PCR 技术对胎儿常见非整倍染色体的快速诊断[J]. 海峡预防医学杂志, 2017, 23(3): 4-6.

[7] 纪妍, 朱津, 卢燕. QF-PCR 快速产前诊断常见非整倍体病的价值[J]. 海南医学, 2016, 27(1): 56-59.

[8] WALSH P S, METZGER D A, HIGUCHI R. CHELEX-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material[J]. Biotechniques, 1991, 10(4): 506-513.

[9] 李发涛, 廖灿, 李焱, 等. 应用 QF-PCR 技术快速检测 2 275 例胎儿常见染色体非整倍体结果分析[J]. 中国优生与遗传学杂志, 2014, 22(3): 39-41.

[10] 卢建, 杜丽, 李海霞, 等. 应用 QF-PCR 技术对 3 075 例常见染色体非整倍体快速产前诊断结果分析[J]. 热带医学杂志, 2012, 12(9): 1083-1085.

[11] DONAGHUE C, MANN K, DOCHERTY Z, et al. Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal samples by QF-PCR and karyotype analysis[J]. Prenat Diagn, 2005, 25(1): 65-72.

[12] 谢建红, 肖奇志, 邱显荣, 等. 定量荧光 PCR 快速检测 2322 例胎儿常见染色体非整倍体结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2018, 26(5): 45-48.

[13] 洪文澜, 孙眉月, 朱冰, 等. 双三体及嵌合型双三体 2 例报告-X 三体加 18 三体; X 三体加 18 三体/18 三体/正常核型嵌合[J]. 浙江医学, 1982, 20(4): 24-26.

[14] YIN A, LI B, LUO M, et al. The prevalence and molecular spectrum of  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin gene mutations in 14,332 families of Guangdong Province, China[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89855.

(收稿日期: 2019-03-10 修回日期: 2019-06-12)