

• 论 著 •

单核苷酸多态性微阵列芯片与荧光原位杂交在 流产绒毛组织遗传学分析中的比较研究^{*}

黄 艳, 王晓华[△], 侯东霞, 白瑞芳, 侯丽青, 冀小平
内蒙古自治区妇幼保健院遗传优生科, 内蒙古呼和浩特 010020

摘 要: **目的** 比较单核苷酸多态性微阵列(SNP-array)技术与荧光原位杂交(FISH)技术在流产组织遗传学分析中的优势与局限性。 **方法** 选择 2016 年 11 月至 2019 年 8 月该院确诊为稽留流产的 632 例患者为研究对象, 选取其中 181 例为试验组, 采用 SNP-array 技术检测流产绒毛组织的全基因组 DNA 拷贝数变异(CNVs)。另外 451 例为对照组, 采用 FISH 技术检测绒毛染色体。 **结果** 试验组 SNP-array 技术检测均成功, 检出染色体异常 104 例, 检出率为 57.46%, 包括染色体非整倍体 83 例, 整倍体 10 例, CNVs 11 例。对照组共 451 例, FISH 技术检测出染色体异常 197 例, 检出率为 43.68%, 16-三体 105 例, 45,X 染色体 30 例, 22-三体 18 例, 21-三体 11 例, 13-三体 6 例, 18-三体 3 例, 嵌合体及其他染色体异常 4 例。SNP-array 技术检出率高于 FISH 技术, 差异有统计学意义($\chi^2=9.8297, P<0.05$)。 **结论** SNP-array 技术在胚胎停育遗传学病因诊断中有重要价值, 与 FISH 技术比较, SNP-array 技术检测范围更广, 检出率更高。

关键词: 单核苷酸多态性; 微阵列分析; 荧光原位杂交; 流产绒毛组织; 拷贝数变异

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.01.020

中图法分类号:R440;R714.21

文章编号:1673-4130(2021)01-0087-04

文献标志码:A

Comparative study of single nucleotide polymorphism microarray and fluorescence in situ hybridization in histogenetic analysis of abortion villi^{*}

HUANG Yan, WANG Xiaohua[△], HOU Dongxia, BAI Ruifang, HOU Liqing, JI Xiaoping
Department of Genetic Eugenics, Inner Mongolia Maternal and Child Care Hospital,
Hohhot, Inner Mongolia 010020, China

Abstract: **Objective** To compare the advantages and limitations of single nucleotide polymorphism microarray (SNP-array) and fluorescence in situ hybridization (FISH) in the analysis of abortion tissue genetics. **Methods** From November 2016 to August 2019, 632 patients with missed abortion were selected and 181 cases were selected as the experimental group. The whole genome DNA copy number variation (CNVs) of abortion villi was detected by SNP-array technology. In addition, 451 cases served as control group, and FISH was used to detect villus chromosome. **Results** SNP-array technique detection was successful in the experimental group, 104 cases of chromosomal abnormalities were detected, the detection rate was 57.46%, including 83 cases of chromosomal aneuploidy, 10 cases of aneuploidy and 11 cases of CNVs. In the control group, there were 197 cases with chromosome abnormalities detected by FISH, the detection rate was 43.68%, 105 cases were trisomy 16, 30 cases were 45,X chromosome, 18 cases were trisomy 22, 11 cases were trisomy 21, 6 cases were 13 trisomy, 3 cases were 18 trisomy, 4 cases were chimerism and other chromosome abnormalities. The detection rate of SNP-array was higher than that of FISH ($\chi^2=9.8297, P<0.05$). **Conclusion** SNP-array technique has a great value in the genetic diagnosis of embryo termination. Compared with FISH, SNP-array has a wider detection range and higher detection rate.

Key words: single nucleotide polymorphism; microarray analysis; fluorescence in situ hybridization; abortion villi; copy number variation

^{*} 基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2017MS0820、2018BS08008)。

作者简介: 黄艳, 女, 副主任医师, 主要从事产前诊断及遗传咨询相关研究。 [△] 通信作者, E-mail: wangxiaohua2222@163.com。

本文引用格式: 黄艳, 王晓华, 侯东霞, 等. 单核苷酸多态性微阵列芯片与荧光原位杂交在流产绒毛组织遗传学分析中的比较研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(1): 87-90.

临床上常用细胞染色体核型分析来诊断染色体疾病,虽然可以检出所有染色体非整倍体的数目异常及>5 Mb 的染色体结构异常^[1],但是传统的细胞培养、染色体核型分析需要的工作周期较长(15 个工作日)。荧光原位杂交(FISH)的最大优势在于不仅可用于中期染色体的检测,而且可以用于间期核染色体的检测^[2],同时也弥补了检测周期的缺陷,约 3~5 个工作日可出结果。然而,FISH 技术的高成功率仅表现于对染色体数目异常的检测,不能检测染色体的结构异常^[3]。染色体微阵列分析(CMA)技术,包括微阵列比较基因组杂交技术和单核苷酸多态性微阵列(SNP-array)技术,是新近发展起来的一种快速、高效的分子核型分析技术,不仅能检出拷贝数变异(CNVs),还能检测出杂合性缺失、单亲二倍体和低水平的嵌合体^[3-4]。本院自 2016 年开始开展 SNP-array 技术,临床应用效果较好,本研究采用 SNP-array 技术和 FISH 技术对稽留流产绒毛组织进行检测、比较,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2016 年 11 月至 2019 年 8 月内 蒙古自治区妇幼保健院稽留流产的 632 例患者为研究对象。纳入标准:(1)符合稽留流产相关诊断标准^[5];(2)23~40 岁;(3)流产孕周 6~13 周。排除标准:(1)有子宫内膜异位症、子宫肌瘤等影响胚胎着床、发育的因素;(2)男方精子不成熟^[5-7]。本研究经本院伦理委员会批准,所有患者均知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法 随机选取 632 例研究对象中 181 例患者作为试验组,采用 SNP-array 技术检测胚胎染色体;另选取 451 例患者作为对照组,采用 FISH 技术检测胚胎染色体。

试验组:无菌操作下取流产绒毛组织,离心,按总 RNA 试剂盒(德国 Promega 公司)要求抽提 DNA,测定浓度和纯度。按 Affymetrix Cytoscan 750K 芯片的要求对提取的 DNA 进行操作,通过酶切、连接、扩增、纯化、片段化、标记,与 Affymetrix Cytoscan 750K 芯片进行杂交、孵育、洗涤、染色。采用 Affymetrix Genechip Scanner 3000Dx 扫描系统对数据进行采集,CHAS 软件进行分析。

对照组:去除蜕膜、血块等杂质后,挑选绒毛组织 5 mg 剪碎成绒毛枝,进行消化、预固定、固定,将固定后的细胞悬液滴片,在 73 ℃烤箱中烤片 30 min。将制备好的玻片进行漂洗、消化、脱水后,加探针,76 ℃变性 7 min 后迅速置于 37 ℃的水浴箱中,杂交前取出。选用特异性探针进行杂交过夜(条件 42 ℃)。荧光显微镜下细胞计数>100 个,当检测到染色体异常>60%时为阳性,提示异常标本;<10%为阴性,提示正常标本;在 10%~60%为嵌合体。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理分析。计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组检出染色体异常的种类 采用 SNP-array 技术成功检测试验组 181 例患者的绒毛组织,其中检出染色体异常 104 例(57.46%),包括非整倍体 83 例,整倍体 10 例,微缺失微重复 CNVs 11 例(2 例 CNVs 致病性不明确的病例,夫妇拒绝芯片验证,故无法获得遗传学来源)。对照组检测 451 例,绒毛组织标本的间期 FISH 均获得杂交信号,其中检出染色体异常 197 例(43.68%),包括非整倍体 177 例,整倍体 20 例。与对照组比较,试验组对染色体异常的检出率更高,差异有统计学意义($\chi^2=9.829\ 7, P<0.05$)。

2.2 两组染色体非整倍体异常的检出情况 试验组非整倍体异常标本中,最常见的为 16-三体,共 16 例,另有 22-三体 10 例(含 1 例嵌合),21-三体 6 例(含 1 例嵌合),13-三体 5 例(含 1 例嵌合);单体主要发生在 X 染色体(共 10 例)。对照组非整倍体异常标本中,以 16-三体最多,共 105 例,另有 45,X 染色体 30 例,22-三体 18 例,21-三体 11 例,13-三体 6 例,18-三体 3 例,嵌合体及其他染色体异常 4 例。见表 1。

2.3 试验组染色体微缺失微重复的检出情况 试验组中 4 例单一位点缺失或重复标本中,缺失 2 例,其中 8 号染色体缺失 1 例,17 号染色体缺失 1 例;单一位点重复 2 例,其中 X 染色体重复 1 例,13 号染色体重复 1 例;7 例标本同时具有 2 个或 2 个以上的位点缺失或重复。另有结果显示,试验组 SNP-array 技术检测出 13q13.3q34 二体、三体嵌合;对照组 FISH 检测出 16-三体和 45,X 染色体。见表 2,图 1、2。

表 1 两组染色体非整倍体异常的检出情况[<i>n</i> (%)]								
组别	<i>n</i>	16-三体	45,X 染色体	22-三体	21-三体	13-三体	18-三体	嵌合体及其他染色体异常
试验组	104	16(15.38)	10(9.62)	10(9.62)	6(5.77)	5(4.81)	0(0.00)	36(34.62)
对照组	197	105(53.30)	30(15.22)	18(9.14)	11(5.58)	6(3.05)	3(1.52)	4(2.03)

注:其他表示染色体异常分布于 3、7、8、9、11、14、20 号染色体上。

表 2 试验组染色体微缺失微重复的异常情况

编号	微缺失微重复	致病性
5	8p23.3p22 缺失 15.5 Mb	致病
37	Xp22.31 重复 1.5 Mb	意义未明—可能良性
40	17p12 缺失 1.3 Mb	致病
92	13q13.3q34 二体、三体嵌合	致病
101	10q21.2q26.3 重复 73 Mb、13q32.1q31 缺失 16.93 Mb	致病
104	22q13.2q13.3 缺失 7.3 Mb、6q14.1 重复 1.2 Mb	疑似致病/意义未明
111	15q25.2q26 缺失 18.35 Mb、15q25.1q25.2 重复 3.66 Mb	可能致病/意义未明—良性
123	7q31.2q36.3 缺失 43.3 Mb、11q21q25 重复 41.5 Mb	致病
154	8q24.13q24.3 缺失 20.8 Mb、11q23.3q25 缺失 18.2 Mb	致病
167	11q24.3q25 重复 5.3 Mb、14q32.12q32.33 缺失 13.2 Mb	意义未明/致病
175	5p 缺失、8q 重复	致病

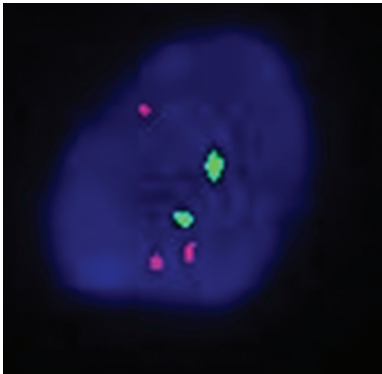


图 1 FISH 检测 16-三体

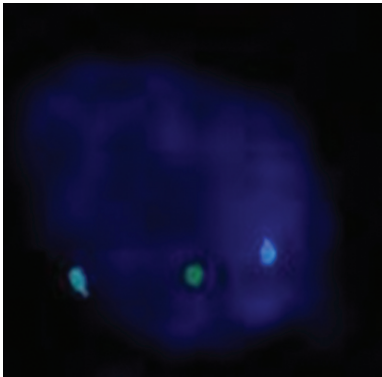


图 2 FISH 检测 45,X 染色体

3 讨 论

SNP-array 技术可发现所有的染色体数目异常，可以识别并检测染色体的重排，包括基因组序列的获得与丢失，并且其可有效检测出基因组所存在的平衡问题^[8-9]。SNP-array 技术是通过检测 DNA CNVs 实现的，结论可分为良性、可能良性、不明确、可能致病和致病 5 种类型^[10]。结合基因组变异数据库(<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>)、人类染色体失衡和表型数据库(<https://decipher.sanger.ac.uk/>)，以及专门收录于基因组中(包括 CNVs 里可遗传的或遗

传性基因疾病)的在线孟德尔遗传性疾病数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)，可获取具体的基因序列、位点、疾病及相关研究^[11-12]，可以在线查询相关 CNVs 的信息。SNP-array 芯片检测不能识别如下染色体异常：(1)平衡易位、倒位携带者；(2)低比例嵌合体者(嵌合率低于 30%)。FISH 技术是利用荧光标记的 DNA 探针与待测标本 DNA 序列进行杂交，针对常见的染色体非整倍体(13、16、18、21、22-三体及性染色体数目异常)，根据杂交信号的有无及类型达到诊断目的^[13-15]。本研究通过 SNP-array 技术与 FISH 技术检测流产绒毛组织，得出如下结论。

SNP-array 技术的检测范围及检出率高于 FISH 技术。孕妇发生自然流产的病因很复杂，胚胎或胎儿染色体异常是早期流产最常见的原因，约占 50%~60%^[16]。染色体数目异常是引起自发流产的最主要遗传因素^[17]，本研究表明，试验组染色体数目异常(非整倍体和整倍体异常)共 93 例，占有染色体异常的 89.42%。FISH 技术作为一种靶向检测技术，不能对整个染色体组进行检测。由于方法学的限制，FISH 技术只能检测 13、16、18、21、22 及性染色体的数目异常，其他染色体异常则无法检测，也无法检测这 6 条染色体探针区域以外的片段是否发生了缺失、重复、易位或倒位^[18]。本研究中 FISH 技术对染色体异常的检出率只有 43.68%(197/451)；而 SNP-array 技术可发现所有的染色体数目异常，染色体异常的检出率为 57.46%。试验组中除染色体数目异常还检出 CNVs 11 例，其中 5 例为常规染色体核型分析无法发现的<10 Mb 的 CNVs。2 例 CNVs 意义未明，需要夫妻双方进行 SNP-array 技术验证，只有检测其来源，才能为下次妊娠提供指导，但夫妇拒绝验证，因此无法进一步明确结果。试验组对染色体异常的检出

率高于对照组,差异有统计学意义($\chi^2=9.8297, P<0.05$)。

流产胚胎染色体以 16-三体、22-三体和 45,X 染色体最常见。本研究中,试验组用 SNP-array 技术检出的染色体异常包括非整倍体、整倍体及染色体微缺失和微重复,其中染色体非整倍体发生率最高。试验组染色体非整倍体异常的发生率为 79.81%(83/104),染色体非整倍体异常又以 16-三体最为常见,22-三体和 45,X 染色体的发生率并列排第 2 位。对照组中染色体非整倍体异常的发生率为 89.85%(177/197),FISH 技术检测到的染色体异常以 16-三体为最常见,其次是 45,X 染色体和 22-三体,发生率排第 2 位和 3 位。

综上所述,在检查自然流产妊娠物染色体异常的效果上,SNP-array 技术明显优于以往的 FISH 技术,值得临床应用推广。该技术在自然流产分子遗传学分析中有显著优越性,因此,有必要对稽留流产患者进行 SNP-array 技术检测,不但可以明确病因,更能为患者提供遗传咨询和再生育指导^[19]。

参考文献

- [1] 谢晓蕊.单核苷酸多态性微阵列技术(SNP-array)在自然流产遗传学诊断中的应用[D].福建:福建医科大学,2018.
- [2] 卢建,黄伟伟,王继成,等.染色体微阵列技术在自然流产胚胎组织染色体检测中的应用[J].中国优生与遗传杂志,2017,25(7):38-40.
- [3] 刘祥举.自然流产的遗传学检测研究进展[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(4):338-342.
- [4] 尹婷,王志伟,王永安,等.基于染色体微阵列分析技术对胚胎停育患者流产绒毛组织遗传因素的研究[J].中国妇幼保健,2019,34(16):3733-3735.
- [5] 郑峥,顾向应,刘欣燕,等.早期妊娠稽留流产治疗专家共识[J].中国实用妇科与产科杂志,2020,36(1):70-71.
- [6] 孙义锡,罗玉琴,钱叶青,等.单核苷酸多态性微阵列芯片在早期自然流产绒毛组织遗传学分析中的应用[J].浙江大学学报(医学版),2017,46(3):262-267.
- [7] 鄢磊,张雪瑞,曹东华.荧光原位杂交技术在检测自然流

产组织染色体数目异常中的价值和意义[J].中国医药指南,2019,17(19):125-126.

- [8] 曾海燕,吴杰.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[J].国际检验医学杂志,2015,36(4):501-505.
- [9] 韩峰,胡志坚,廖伟芳,等.SNP 微阵列检测染色体异常与稽留流产的关系研究[J].当代医学,2019,25(28):14-16.
- [10] RIGGS E R, ANDERSEN E F, CHERRY A M, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American college of medical genetics and genomics (ACMG) and the clinical genome resource (ClinGen) [J]. Genet Med, 2020, 22(2): 245-257.
- [11] REDON R, ISHICAWA S, FITCH K R, et al. Global variation in copy number in the human genome[J]. Nature, 2006, 444(7118): 444-454.
- [12] 赵和永.全基因组拷贝数变异检测在产前高通量测序异常信号分析中的应用研究[D].济南:山东大学,2015.
- [13] 胡婷,朱红梅,张竹,等.染色体微阵列分析在检测自然流产胚胎染色体异常中的应用[J].四川大学学报(医学版),2017,48(5):732-735.
- [14] 施建有,童郁,蔡晓晓,等.应用 FISH 技术快速诊断 512 例稽留流产者绒毛组织染色体数目异常[J].中国优生与遗传杂志,2018,26(7):22-24.
- [15] 刘丹,丁翔,唐国栋,等.200 例稽留流产绒毛染色体的间期 FISH 分析[J].生殖医学杂志,2019,28(5):548-552.
- [16] 谢幸,孔北华,段涛.妇产科学[M].9 版.北京:人民卫生出版社,2018:70.
- [17] 朱正错.早期自然流产胚胎染色体数目异常的临床分析[J].中国优生与遗传杂志,2017,25(5):47-49.
- [18] 阳鑫妙,李雯雯.荧光原位杂交和 SNP array 分析用于流产组织查因的对比研究[J].中国优生与遗传杂志,2018,26(9):6-8.
- [19] 怀磊,冷建杭,郭钦贤,等.单核苷酸多态性微阵列技术在自然流产遗传学分析中的应用[J].中国优生与遗传杂志,2017,25(8):13-15.

(收稿日期:2020-05-11 修回日期:2020-08-30)

(上接第 86 页)

- [15] DE-CARVALHO J A, TATSCH E, HAUSEN B S, et al. Urinary kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as indicators of tubular damage in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes [J]. Clin Biochem, 2016, 49(3): 232-236.
- [16] SATIRAPOJ B, POOLUEA P, NATA N, et al. Urinary biomarkers of tubular injury to predict renal progression and end stage renal disease in type 2 diabetes mellitus with advanced nephropathy: a prospective cohort study

[J]. J Diabetes Complications, 2019, 33(9): 675-681.

- [17] GARG V, KUMAR M, MAHAPATRA H S, et al. Novel urinary biomarkers in pre-diabetic nephropathy [J]. Clin Exp Nephrol, 2015, 19(5): 895-900.
- [18] LIM S C, LIYING D Q, TOY W C, et al. Adipocytokine zinc alpha2 glycoprotein (ZAG) as a novel urinary biomarker for normo-albuminuric diabetic nephropathy [J]. Diabet Med, 2012, 29(7): 945-949.

(收稿日期:2020-05-02 修回日期:2020-09-16)