

文章编号: 1005-8982(2015)08-0034-05

·临床论著·

应用aCGH 技术对胎儿染色体大片段重复进行产前诊断

贺选 龚警 王超颖 汤欣祎 夏炎枝

(华中科技大学 生命科学与技术学院 湖北 武汉 430074)

摘要:目的 对产前 B 超检测出现异常的胎儿应用基于芯片的微阵列比较基因组杂交(aCGH)技术检测其遗传物质的变异,该研究中检测的是染色体较大片段的重复。方法 通过超声波对胎儿进行健康状况的检测与分析,对检测出的 1 例异常胎儿进行羊膜腔穿刺获取胎儿脱落细胞样本,进一步利用 aCGH 技术对提取的样本 DNA 进行全基因组高分辨率扫描,检测并判断导致胎儿异常的遗传物质变异,并进行相关疾病的预测。结果 aCGH 扫描检测出在该胎儿染色体 13q22.2q34 区带存在大小为 38.51M 的重复 [(76,432,267 ~ 114,946,264) × 3]。通过数据库及文献的检索发现该重复可能与 13 号染色体三体征前脑无裂畸形、膈疝等疾病相关。结论 利用 aCGH 技术可以方便快速地鉴定和分析染色体重复的变异,也能高效地对染色体重复片段进行定位,该技术的广泛使用有助于对染色体遗传物质变异引起的疾病进行快速产前诊断以及一些复杂疾病的早发现。

关键词: 微阵列比较基因组杂交(aCGH); 产前诊断; 染色体片段重复; 13 号染色体三体征

中图分类号: R714.5

文献标识码: A

Application of array comparative genome hybridization technology to prenatal diagnosis of chromosome fragment repetition*

HE Xuan, GONG Jing, WANG Chao-ying, TANG Xin-yi, XIA Yan-zhi

(School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, P.R. China)

Abstract: **[Objective]** To apply the array comparative genomic hybridization (aCGH) technology to the diagnosis of large chromosome fragment repetition of fetus with prenatal ultrasonic abnormality. **[Methods]** The fetus health condition was checked and analyzed by ultrasonic testing, and fetal exfoliated cell samples were obtained by amniocentesis. Subsequently, genome-wide high resolution scanning results of the samples were obtained through aCGH, and further diagnosis and prediction of related diseases were made. **[Results]** aCGH revealed that there was 38.51 M chromosome fragment repetition on 13q22.2q34 in the fetus. [(from 76, 432, 267 to 114, 946, 264) × 3]. Database and literature retrieval revealed this chromosome fragment repetition may be related to trisomy of chromosome 13. **[Conclusion]** The technology of aCGH can be used for convenient and rapid identification and analysis of chromosome fragment repetition, and also for defining the loci of the chromosome fragment repetition. The widespread use of this technology is helpful to rapid prenatal diagnosis of diseases caused by chromosome mutation and early detection of complex diseases.

Key words: array comparative genomic hybridization (aCGH); prenatal diagnosis; chromosome fragment repetition; trisomy of chromosome 13

收稿日期 2014-08-20

* 基金项目: 华中科技大学 2014 年大学生创新基金(No. 13YB16) 国家自然科学基金委员会国家基础科学人才培养基金(No. J1103514)

[通信作者] 夏炎枝 E-mail: bioxia@163.com; Tel: 13647208631

拷贝数目变异(copy number variants, CNVs)即染色体片段的重复或缺失,指与参考基因组相比,拷贝数存在差异且增加或减少的碱基数目>1 kb的DNA片段^[1],是一种十分普遍的染色体数目变异,并且很多染色体数目的变异都与疾病直接相关。最近研究表明,CNVs在人类疾病的病因学中具有重要作用,尤其是罕见的变异^[2]。很多发育异常的疾病如唐氏综合征、Prader-Willi综合征、安琪儿综合征以及猫叫综合征等,均是由染色体或染色体片段的重复或者缺失导致^[3]。整个人类基因组的5%为DNA的重复片段^[4],片段重复使基因的效应计量发生改变,会引起人类多种疾病,如血友病、多发性神经纤维瘤等^[5]。因此,该类染色体变异的检测以及相关疾病的诊断十分重要。

对于染色体重复变异,利用传统的G显带、荧光标记的原位杂交(FISH)等技术已经可以进行比较准确的检测和判断,但这些传统的技术效率无法保证,分辨率较低,无法进行全基因组的筛查^[6],并且需要花费较多的人工劳动,因此,传统的检测技术已经无法满足快速的数据产出和分析的需要,发展新的高效的检测技术十分必要,近年来兴起的微阵列比较基因组杂交(array comparative genome hybridization, aCGH)技术就是应用于这方面的一项新技术。

aCGH技术是将芯片技术和传统的CGH技术相结合的产物,弥补传统的CGH技术在分辨率以及通量等方面的不足,可以对染色体变异进行更为详细的检测,并使变异直接定位到基因组上成为可能^[7]。利用aCGH技术可以检测<1 kb的DNA序列片段的重复,在诊断方面具有其他技术无法比拟的应用优势。传统的细胞遗传检测技术只能检测到染色体数目或结构变异的存在,但并不能确定变异的来源,而aCGH技术却能准确地检测出变异的来源,可以在全基因组水平1次检测出所有的CNVs,是一种高通量、高分辨率、全方位的检测方法,对样品的要求不高,很大程度缩短检测周期^[8]。因此,将aCGH应用于产前诊断,对一些遗传疾病的早发现和治疗方案的确定十分有利,可应用于CNVs的检测。目前,aCGH技术已经广泛应用于疾病基因组中片段重复异常的检测和筛查^[9]。

本研究主要是利用aCGH技术,对1例在产前超声检查发现胎儿双侧脑室异常回声、持续性左位上腔静脉、左心室强光斑等异常声像的患者进行细胞

遗传变异的检测与分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料

患者,女,21岁,孕35周,无业,孕期末按医生要求定期产前检查,未做唐氏筛查。孕35周行B超检查发现胎儿出现双侧脑室异常回声、持续性左位上腔静脉、左心室强光斑等异常声像,经医生解释病情,同意进行产前诊断。考虑到大孕周脐带血检查易引起早产,羊水细胞培养成功率不高,遂利用aCGH技术检测其羊水中胎儿脱落细胞DNA。

1.2 基因组DNA的提取

抽取孕妇羊水,根据羊水基因组DNA提取试剂盒(武汉奥特有限公司)说明书抽提基因组DNA并测定DNA浓度^[10]。

1.3 FISH检测

采用北京金菩嘉公司的18号、X、Y染色体着丝粒探针以及13q14和21q22特异性探针,其中13q14和21q22两种探针为1组,对应的荧光信号分别为绿色和红色,18号、X、Y染色体着丝粒探针为1组,对应的荧光信号分别为蓝色、绿色和红色。

1.4 aCGH检测

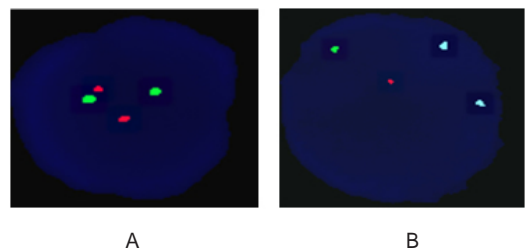
采用北京博尔诚(Bio Chain)公司基于安捷伦(Agilent)aCGH微阵列芯片的分析检测平台,对样本进行分析,该芯片分辨率为50 K,利用安捷伦Gnomic Workbench软件进行分析结果。

2 结果

2.1 FISH检测结果

FISH实验检测结果显示,13q14区带的遗传物质无异常(见图1)。

由于FISH的分辨率以及探针有限,并不包括第13号染色体的长臂13q22.2~q34的位点,因此该结



A 2个绿点为13q14的信号,2个红点为21q22的信号;B 1个绿点为X染色体着丝粒的信号,1个红点为Y染色体着丝粒的信号,2个蓝点为18号染色体着丝粒的信号

图1 FISH检测结果

果与后面 aCGH 检测的结果并不矛盾。

2.2 aCGH 检测结果

胎儿羊水细胞 aCGH 检测结果提示,存在 14 个变异的位点(见附表),13 号染色体长臂存在 38.51 M 的重复[13q22.2~q34(76,432,267~114,946,264)×3](见图 2),在图 2 中可以明显看到,第 13 号染色体的长臂 13q22.2~q34 存在明显的重复(红色),单独分析 13 号染色体(见图 3),证实该区域确实存在重复(蓝色阴影部分)。根据 CNVs 数据库分

析发现 1,3~14 号位点变异均为无害变异,并不致病,而 2 号位点变异即 13 号染色体长臂 38.51 M 的重复,之前的研究发现是致病的(与 13q31.3q34 Syndrom 疾病密切相关)^[11],会导致高风险的 13 染色体三体征、前脑无裂畸形、膈疝、腭裂等^[12]。

由于检测结果显示胎儿的遗传变异是致病性的,因此,判定该胎儿出生后患相关疾病的风险较大,预后较差,并向家属解释交代相关病情。

胎儿家属要求引产,引产出 1 例男性死婴,体重

附表 aCGH 检测出的变异区段

组别	染色体	区段	位置	探针数	增减值	PValue	说明
1	chr4	q27	122791428 ~ 123283775	12	0.424 23	2.714E-10	正常
2	chr13	q22.2~q34	76432267 ~ 114946264	656	0.356 762	0.0	致病
3	chr15	q11.1~q11.2	20481702 ~ 22509254	14	0.556 481	1.116E-22	正常
4	chr16	q21	57505162 ~ 57671289	5	0.635 273	9.973E-12	正常
5	chr22	q13.2	43308067 ~ 43454452	5	0.777 01	6.244E-16	正常
6	chrX	p22.33~p11.21	2709027 ~ 58051765	935	-0.456 508	0.0	性对照
7	chrX	q11.1~q28	62063537 ~ 154754171	1485	-0.420 569	0.0	性对照
8	chrY	p11.31~p11.2	2757193 ~ 9072145	17	2.728 566	0.0	性对照
9	chrY	q11.21	14200000 ~ 14611143	4	3.910 224	0.0	性对照
10	chrY	q11.21	14200000 ~ 14500648	4	3.870 164	4.713E-19	性对照
11	chrY	q11.21~q11.23	14611203 ~ 28478618	52	2.440 998	0.0	性对照
12	chrY	q11.221	16017052 ~ 17078406	10	1.048 175	9.221E-32	性对照
13	chrY	q11.221	17493425 ~ 18225843	5	3.269 996	3.366E-14	性对照
14	chrY	q11.221~q11.23	19419098 ~ 28478618	20	2.644 542	2.611E-18	性对照



绿色表示缺失,红色表示重复

图 2 aCGH 分析的全基因组图谱

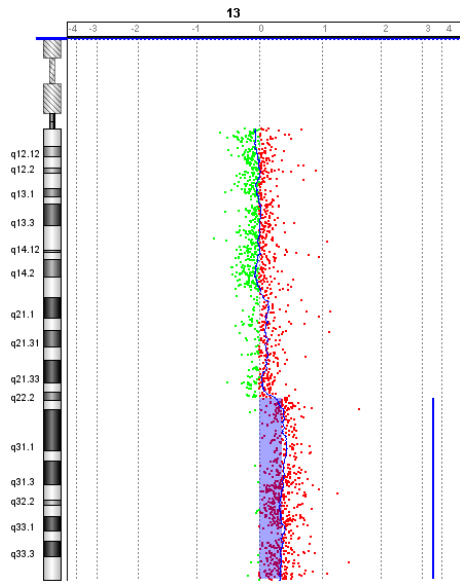


图 3 aCGH 杂交的 13 号染色体结果图

2 400 g,右手六指,尸体病检显示,前脑无裂畸形,与本研究预测的病情相吻合。

13 号染色体 aCGH 检测结果图中每个点表示芯片上每种探针对应的点,绿色和红色分别表示对照样本和实验样本。在同一位置处,如果所有点的均值 = 0,则说明该位置正常,不存在变异;如果均值 > 0,则说明该处存在重复;如果均值 < 0,则说明该处存在缺失。13 号染色体 aCGH 检测结果图在 q22.2 ~ q34 各位置的均值均 > 0,因此,该段区域存在重复变异。

3 讨论

一般产前诊断过程中,先使用定性的体外探测技术(如超声波、磁共振等)探测胎儿的健康状况。这类初步的检测如发现异常,则需要进一步进行细胞和分子层面的更为准确精细的检测,一般直接检测胎儿的细胞遗传物质判断其是否存在变异,从而确定体外探测出的异常是否与遗传疾病有关。细胞遗传核型分析技术经常会用到染色体 G 显带、FISH、CGH 等较为传统的技术,这些技术对染色体大片的缺失或重复等变异,检测效果较为明显,但对微缺失、微重复以及变异来源的确定,传统的检测技术由于分辨率不高等原因,检测的效果相对较差。aCGH 技术对于微缺失、微重复以及鉴定变异来源的效果十分显著,并且对大片的检测比传统技术更为简便快速。

利用芯片的方法结合 CGH 技术,除可检测出传

统方法无法检测到的变异,还具有速度快、周期短、自动化程度高、节约人力、准确率高等优点。将 aCGH 技术应用于产前诊断,可增加父母对胎儿畸变的病因学理解,提供更为有益的再生育风险管理遗传咨询^[13]。对于前期体表 B 超检测发现异常的病例,应用 aCGH 技术深入地检测细胞遗传物质的致病性,使疾病检出率较大幅度地提高^[14],因此, aCGH 技术在临床上的推广应用变得尤为迫切。目前,芯片技术还不够普及,使得芯片的耗费很大,一定程度上阻碍 aCGH 技术的推广。但是,随着科技日新月异的发展,芯片技术也越来越成熟,越来越普及化,从而 aCGH 技术也会很快普及应用到临床。本研究中,将 aCGH 技术应用于临床,主要是利用 aCGH 技术检测全基因组范围的变异,确定 1 个与疾病相关的较大片段的重复变异及其来源,并进一步分析相关疾病。进一步与 FISH 传统的研究方法进行对比,从上述结果可以清晰地看到 aCGH 技术在分辨率和准确性上要比 FISH 更为优越,虽然 FISH 的速度比较快,可以 24 h 出结果,但限于探针数量,检测结果不够全面。

综上所述,笔者肯定 aCGH 技术作为一种新兴的染色体核型分析技术,能够满足生物学及医学对细胞遗传学技术手段的要求,在产前诊断上具有重要的应用价值,其不仅可以诊断出传统技术由于分辨率、灵敏度不够而无法检测的变异,还能更加方便、快速、准确地检测出染色体较大片段重复或缺失的变异,并能快速地鉴定出变异的来源。

参 考 文 献:

- [1] REDON R, ISHIKAWA S, FITCH KR, et al. Global variation in copy number in the human genome[J]. *Nature*, 2006, 444(7118): 444-454.
- [2] MEFFORD HC, EICHLER EE. Duplication hotspots, rare genomic disorders, and common disease[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2009, 19(3): 196-204.
- [3] PINKEL D, SEGRAVES R, SUDAR D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays[J]. *Nat Genet*, 1998, 20(2): 207-211.
- [4] LOPEZ-FLORES I, GARRIDO-RAMOS MA. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes[J]. *Genome Dyn*, 2012, 7: 1-28.
- [5] EMANUEL BS, SHAIKH TH. Segmental duplications: an expanding role in genomic instability and disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(10): 791-800.
- [6] 马聪, 占杰, 马梦亚, 等. 应用 ACGH 技术检测额外小标记染色[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 8: 14-19.

- [7] OOSTLANDER AE, MEIJER GA, YLSTRA B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics[J]. Clin Genet, 2004, 66(6): 488-495.
- [8] VARMA G, VARMA R, HUANG H, et al. Array comparative genomic hybridisation (aCGH) analysis of premenopausal breast cancers from a nuclear fallout area and matched cases from Western New York[J]. British Journal of Cancer, 2005, 93(6): 699-708.
- [9] MILLER DT, ADAM MP, ARADHYA S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies[J]. Am J Hum Genet, 2010, 86(5): 749-764.
- [10] 孟金来, 王玉, 王谢桐, 等. 比较基因组杂交技术的改进及其在产前诊断中的应用[J]. 山东大学学报(医学版), 2009, 47(7): 89-92.
- [11] XIANG B, ZHU H, SHEN Y, et al. Genome-wide oligonucleotide array comparative genomic hybridization for etiological diagnosis of mental retardation: a multicenter experience of 1499 clinical cases[J]. J Mol Diagn, 2010, 12(2): 204-212.
- [12] AHN JW, BINT S, IRVING MD, et al. A new direction for prenatal chromosome microarray testing: software-targeting for detection of clinically significant chromosome imbalance without equivocal findings[J]. Peer J, 2014, 2: 354.
- [13] SHAFFER LG, ROSENFELD JA, DABELL MP, et al. Detection rates of clinically significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound[J]. Prenat Diagn, 2012, 32(10): 986-995.
- [14] SHAFFER LG, DABELL MP, FISHER AJ, et al. Experience with microarray based comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis in over 5 000 pregnancies[J]. Prenat Diagn, 2012, 32(10): 976-985.

(童颖丹 编辑)