

快速非整倍体胎儿产前诊断技术

禹 虹, 边旭明

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院妇产科, 北京 100730

通信作者: 边旭明 电话: 010-65296230, E-mail: rainyu772002@yahoo.com.cn

【关键词】 产前诊断; 快速非整倍体检测技术; 荧光原位杂交技术; 荧光定量聚合酶链反应

【中图分类号】 R715.5 【文献标志码】 A 【文章编号】 1674-9081(2010)01-0098-05

染色体病是因染色体数目、结构畸变造成遗传物质得失所引起的遗传性疾病, 目前的医疗水平难以治疗或无法治疗, 因此产前诊断尤为重要。我国大规模开展的产前诊断手段主要是细胞遗传学染色体核型分析, 所培养的羊水细胞和绒毛细胞核型分析的精确度分别为 99.4% ~ 99.8% 和 97.5% ~ 99.6%^[1], 被认定是产前诊断的金标准。近年来随着高龄产妇的增加、唐氏血清筛查的普及、超声技术的发展, 需要进行产前诊断的孕妇日益增多, 核型分析的局限性越来越明显, 已不能满足临床的需要: (1) 操作繁琐、培养与制片有一定难度, 存在分裂相少、染色体分散不佳、染色体容易丢失、染色体畸变 < 5 Mb 时不易检测等问题。 (2) 报告时间长, 一般为 14 ~ 22 d。 (3) 不同细胞培养受孕周限制。 (4) 需要有经验的细胞遗传学医师对结果作出判断, 在工作量上无法做到突破。因此, 产前诊断实验室急需快速、准确的新技术以丰富检测手段, 缓解医患压力。13、18、21 和性染色体非整倍体异常占有所有染色体异常的 65% ~ 80%, 占出生后染色体病儿的 85% ~ 95%。近十几年来分子细胞遗传学技术有了很大进展, 已创建了可在 1 ~ 4 d 内快速检测非整倍体异常的快速非整倍体检测技术 (rapid aneuploidy detection, RAD)。纵观各种 RAD 技术大多根源于荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 技术和以体外聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 为基础的分子生物技术, 现就某些产前诊断中心已经开展的 RAD 技术的优点、局限性以及在临床应用中的热点问题进行综述。

以荧光原位杂交为基础的技术

20 世纪 80 年代后期, 起源于放射性杂交的荧光原位杂交技术被用于染色体重排、标记染色体、微小缺失和常见非整倍体的产前诊断。以 FISH 为基础已生成多种分子细胞遗传学技术, 一方面是采用不同探针而衍生的新技术, 如引物原位标记技术 (primed in situ labeling, PRINS)、比较基因组杂交 (comparative genomic hybridization, CGH)、光谱染色体核型分析、芯片 CGH 等; 另一方面是根据 FISH 分辨率的提高, 将靶目标从中期染色体发展到 DNA 纤维荧光原位杂交 (DNA fiber-FISH)。现介绍几种常见的 FISH 相关技术在快速产前诊断中的应用。

间期荧光原位杂交

1992 年 Kinger 等^[2]首次前瞻性研究了使用间期 FISH 对未培养的羊水间期细胞进行非整倍体检测 (即间期 FISH), 结果报告时间缩短至 24 ~ 48 h。20 世纪 90 年代后期 DNA 探针和 FISH 操作步骤商业化, 如 Aneu Vysion 多色 DNA 探针试剂盒, 利用 5 种不同颜色的荧光探针同时检测 13、18、21、X 和 Y 染色体的异常, 一次检测仅需要 16 h。Shaffer 等^[1]对 1998 年至 2006 年美国、德国等 8 个国家应用间期 FISH 技术进行大样本 RAD 检测的研究报道进行分析, 结果显示该技术对非整倍体检测灵敏度为 96.4% ~ 100%, 特异度 99.8% ~ 100%, 仅 5% 左右的样本未能提供信息。我国 1994 年至 2009 年发表的应用该技术进行产前诊断的论文近 20 篇, 检测样本在数十至百余例间, 结果其敏感性、特异性及与核

型分析的符合率可达 100%，成功率 96.4% ~ 100%，均认为该技术符合产前诊断要求，可用于大规模产前诊断^[3]。间期 FISH 的局限主要有^[4-5]：（1）只能提供所用特异性探针序列位点的信息，只能计数位点的拷贝数而不能检测到重排。（2）母体细胞污染（maternal cell contamination, MCC）。未培养羊水细胞 MCC 可使间期 FISH 检测三体时假阳性率高达 7.5%。因此当样本同时有 XX 和 XY 信号、同一玻片上的细胞形态不一时应怀疑有染色体嵌合现象。（3）FISH 检测未提供信息，其常见的原因有羊水或绒毛细胞量不够、发现肉眼可见的血性羊水或细胞团块。目前有学者提出引物原位标记技术（primed in situ labeling, PRINS）能得到和 FISH 相同的结果，敏感性与 FISH 一致^[6]，而且所需时间更短，一般仅需 1 ~ 2 h，标记特异性更高，可取代核型分析及 FISH 技术应用于 RAD 检测。但 PRINS 技术对标本质量要求更高；而且有关 PRINS 用于中期及间期染色体分析的临床应用报道多为回顾性分析，缺乏大样本前瞻性研究，其临床效果应仍有待评估；很少有市售的理想探针以及不能同时检测多个单拷贝目标等限制了 PRINS 的临床应用。

比较基因组杂交

1992 年 Kallioniemi 等^[7]在 FISH 基础上创建的 CGH 技术，可快速检测全基因组 DNA 的获得、丢失和扩增，并将这些遗传变异定位在正常的中期染色体上，也称为中期 CGH。CGH 可快速提供三体、单体或染色体较大亚区拷贝数变化的信息，近年来对于各种胎儿样本使用 CGH 技术进行非整倍体快速筛查已经取得了较一致的结论。其主要优势：（1）待测 DNA 来源多样化，所需 DNA 量极少（< 1 μg）。（2）检测周期短，仅 4 ~ 5 d，能避免因培养失败而导致的诊断失败。（3）检测效率高，1 次检测可获知整个基因组情况。主要缺点是：（1）只能检测待测基因组相对于正常基因组平均拷贝数的变化，不能检测平衡性改变及其他拷贝数没有变化的染色体畸变、基因重排和点突变等；因此出现平衡结果时，应增加另外一种方法以检测多倍体，如流式细胞术、FISH、微卫星分析等。（2）对缺失的分辨率在 2 Mb 左右，而对扩增的分辨率在 10 ~ 20 Mb 左右，无法精确定位有意义的序列。（3）图像分析系统昂贵。（4）对染色体获得的 CGH 图像进行分析只是半自动

化，要求经验丰富的细胞遗传学家鉴定每条染色体，确认失衡区域。

微阵列-CGH 技术

微阵列-CGH（micro-array CGH, aCGH）技术在原理上与中期 CGH 相似，其使用固相表面上的阵列 DNA 序列为杂交靶，可提供所检测染色体异常与人类基因组的物理图谱和遗传图谱之间的直接关联^[8]。aCGH 技术检测染色体不平衡的能力依赖于芯片的分辨率，芯片上的探针可以是基因克隆（如 BAC）、cDNAs、PCR 产物及寡核苷酸，其中 BAC 和寡核苷酸芯片应用最广泛。其主要优点是：（1）解析度更高，可检测到不能为传统方法检测到的微重复和缺失。（2）报告时间短，24 h 内可获得结果。（3）可发现嵌合有 20% ~ 30% 正常细胞样本的拷贝数变化^[9]。aCGH 可在全基因组水平扫描遗传变异，理论上无假阳性或假阴性，但也存在局限：（1）不能检测拷贝数未发生变化的变异形式，不能准确描述基因重排发生的断裂点和精细结构重排，不能检测到多倍体等。（2）解析度很高的芯片，可检测到一些与临床表现无关的基因拷贝数变异（copy number variation, CNV），评价结果时需慎重考虑基因型与表型的关系^[10]。（3）费用昂贵，一次 aCGH 检测费用一般为数千元。（4）所需样本量大，杂交的起始 DNA 模板量为 250 ng 至 2 μg。近期发展的全基因组扩增单细胞 aCGH 相关技术可以弥补样本量不足，如多重置换扩增技术（multiple displacement amplification, MDA）。

以 PCR 为基础的相关技术

荧光定量 PCR

荧光定量 PCR（quantitative fluorescence polymerase chain reaction, QF-PCR）是目前报道最多的 RAD 技术，其原理是将被检测的标本 DNA 采用荧光引物 PCR 方法，扩增特异 STR 序列，其产物通过荧光检测，随后应用测序仪和基因扫描软件检测各重复序列长度得到峰面积值而实现定量。Shaffer 等^[1]对 1998 年至 2006 年 16 篇大样本的 QF-PCR 文章进行综合分析，共计 41 946 例（包括羊水 36 826 例、绒毛 3074 例、脐血 133 例），显示该技术检测常见非整倍体的敏感性为 99.3%。国内 QF-PCR 在快速产

前诊断的研究尚处于初期摸索阶段,2000年至2009年应用该项技术小样本快速检测非整倍体研究报告约10余篇,均认为该技术有效可靠^[11]。其主要优点:(1)报告时间短,一般为24~36 h。(2)若有DNA测序仪,QF-PCR所需费用较少,试剂每份约10欧元。(3)技术水平要求低,自动化程度高,96孔的DNA测序仪每天约可完成1000例。(4)能检测异常细胞超过15%的嵌合现象,可对母血污染的标本做出正确诊断等^[12]。然而QF-PCR对三体嵌合型、性染色体的检测敏感性较低,如果胎儿是女性,三倍体和母体细胞污染就检测不到,且在有些研究报道中,没有涉及到对性染色体数目的检测。

多重连接依赖式探针扩增

多重连接依赖式探针扩增(multiplex ligation dependent probe amplification, MLPA)技术利用杂合、连接及PCR扩增,PCR产物变性后进行毛细管电泳,通过软件分析电泳分离后的峰高、峰面积、片段长度等定量检测样本DNA拷贝数变化,它的特点是将不同染色体间数目的比例转化为不同杂交探针数目的比例,并通过PCR扩增将这种比例的变化进行放大。Van等^[13]前瞻性研究应用该技术对4000例羊水样本进行非整倍体检测,其结果与间期FISH、细胞核型分析进行比较,显示MLPA对非整倍体检测的灵敏度与特异度均为100%,而且还能发现一些嵌合体和染色体结构异常,如mosXXY/XY、mosX/XY等。其主要优点:(1)所需样本量少,每次反应只需大约20 ng DNA或10 ng RNA,为微阵列反应所需的1/100~1/1000。(2)灵敏度高,特异性高,可检测序列中单一核苷酸的改变。(3)精准度高,可检测搭配有数十个控制组探针(位于不同染色体上),避免单一探针反应的误差而导致定量错误。(4)重复性强,每一个探针的变异系数仅3%~8%。(5)操作简便,已经成熟的商品化试剂盒保证了结果的稳定性和可靠性,降低了应用的技术难度。(6)快速、高通量,3 h内可同时处理96个检测样品;检测从DNA提取、反应至结果分析仅需2 d。其局限性:(1)不能用于单个细胞标本的检测,进行三体性检查时污染的羊水样本不能用于检测。(2)不能用于检测短串联重复序列多态性(STR)及染色体的平衡易位等。但随着技术的发展,MLPA技术将逐渐趋于完善,如MLPA联合微阵列技术可用于

检测基因组内拷贝数变异所引发的疾病等^[14]。

数字PCR

1999年Vogelstein等^[15]提出数字PCR(digital PCR)技术,其原理是将DNA模板平均浓度稀释至 ≤ 1 拷贝/反应体系,将野生型与突变型模板分开扩增与检测,再计算目的片段的绝对或相对数量。随后发展出的BEAMing技术和微液数字PCR技术,使成百上千的PCR反应集中在一个反应管中或一张芯片上进行,推进了该技术的临床应用。Christima等^[16]应用微液数字PCR技术对24例羊水、16例绒毛细胞进行快速非整倍体检测,结果与核型对比,显示该技术可在6 h内检测出样本中所有的非整倍体异常,仅需1~2 ml羊水、1~2 mg绒毛,具有快速、准确、灵敏、特异等优点。然而该技术和FISH、QF-PCR一样不能检测染色体结构异常,如平衡易位、插入等,其次成本高,一份微液数字PCR的费用约为400美元,但是随着社会需求的不断扩大以及技术领域的不断竞争与突破,微液数字PCR成为常规RAD技术并非遥不可及。

快速非整倍体检测技术的应用前景

以间期FISH和QF-PCR为主的RAD技术因其高准确性、费用较低、报告时间短等优点被广泛应用。2004年英国国立检测委员会(UK National Screening Committee, UKNSC)推荐因高龄、血清筛查阳性并且B超测量胎儿颈项透明层厚度(nuchal translucency, NT)正常的孕妇行唐氏综合征(Down's syndrome, DS)产前诊断时不采用常规核型分析,可使用针对常见非整倍体异常的FISH或PCR提供诊断,但性染色体异常诊断除外。这一方案的公布至今还引起学术界有关RAD临床应用的广泛争议,主要集中在RAD能否取代核型分析、如何选择RAD技术以及RAD检测结果的评价。在实际执行UKNSC方案时,虽然所有产前诊断中心的医师和前来就诊的孕妇均接受了RAD,但并没有仅采用RAD作为诊断工具^[17]。近年来有关独立RAD的临床效应缺乏大样本的前瞻性研究,多为回顾性分析及配对分析,大多认为独立使用RAD作为产前诊断,漏诊的染色体异常比例较高,甚至可达50%^[18],可能遗漏与精神异常等有关的微小缺失,使一些本可以防止出生的

精神或体格障碍儿童出生^[19]；0.14%的染色体易位仍具临床表现，而且 FISH 和 QF-PCR 有一定的假阳性、假阴性，嵌合体及母体细胞污染等问题也无有效的解决方法，因此核型分析仍为金标准，理想的产前诊断方案是 RAD 联合核型分析。但实际应用中两种方法同时检测成本昂贵，如何选择产前诊断方案已成为热点议题。目前产前诊断指征的比例由高到低依次为高龄、DS 筛查高风险、B 超异常、夫妇之一为平衡易位携带者；异常核型检出情况由高到低依次为夫妇之一为平衡易位携带者（约 50%）、B 超异常（约 20%）、高龄、DS 高风险^[20]。如果产前诊断指征仅为高龄，QF-PCR 漏诊的概率极小，约 0.1%~0.2%，且漏诊的有临床意义的异常染色体通常 70% 左右有 B 超异常改变。Speevak 等^[21]对所有样本进行 QF-PCR 而仅选择对某些样本进行核型分析，有染色体平衡易位携带家族史的患者不在此研究范围内，将此方案与单一核型分析方案比较，结果异常检出率分别为 97.6% 和 87.6%。Sparkes 等^[22]回顾性分析所有核型结果，认为如将 B 超胎儿异常、NT 超过 3.5 mm 为高危或双亲之一为染色体异常因素排除在外，那么 QF-PCR 可完全取代核型分析，其漏诊的异常染色体有临床意义及明显风险的例数极少，1000 名羊水检查中漏诊 1 例或许更少。为此，应根据不同产前指征对非整倍体进行个性化产前诊断，这同时也能提高非整倍体筛查效率^[23]。

然而至今 RAD 产前诊断方案尚未达成共识，有学者认为其重要的因素是未能对孕妇和医师进行有关 RAD 与细胞核型技术的意向调查。Brinie 等^[24]对荷兰 113 名接受羊水产前诊断的孕妇（产前诊断指征主要为高龄和唐氏血清筛查阳性）和 77 名医师（产科医师、遗传医师、检验师）就 RAD（以 MPLA 为主）和核型的检测方案进行问卷调查，其中包括 3 种检测方案：方案 A 只能高准确检测 DS，报告时间为 4 d；方案 B 可高效检测常见的 5 种非整倍体异常，报告时间为 4 d；方案 C 只提供核型分析，能检测多种染色体异常，报告时间为 21 d。孕妇填表时间为羊水穿刺后的第 2 天，问卷结果显示，孕妇的问题集中在等待结果时感到焦虑，尤其是高龄孕妇，但她们对 RAD 和核型的选择无明显差别，43% 的孕妇选择方案 B、50% 的孕妇选择方案 C，而 78% 的医师选择方案 B，提示孕妇和医师的选择具有明显

的差异，可能与该项调查未涉及检测费用、人数少、没有向孕妇客观提供两种方法的优点与缺点、咨询医师提供的间接建议很大程度上影响孕妇的最终选择等因素有关，因此建议咨询医师应充分对孕妇个人风险评估及向孕妇提供产前诊断技术信息，尊重孕妇的个人选择。由于 RAD 技术本身的局限，在分析检测结果时，应根据不同 RAD 技术的特点分析，并加强实验室质量控制及完善对检测孕妇的后期随访以积累经验。

目前产前诊断技术正处于转变发展期，RAD 临床应用尚处于起步阶段，尽管存在一些不足，但其高效、高准确度明显优于核型分析。通过不断改进 RAD 技术，每个产前诊断中心严格建立室间和室内质评，将传统的细胞遗传技术与 RAD 技术结合起来、优化产前诊断方案，进行大样本前瞻性研究及完善随访积累经验等，相信 RAD 技术在产前诊断中将能发挥出更大的作用。

参 考 文 献

- [1] Shaffer LG, Bui TH. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis [J]. *Am J Med Genet*, 2007, 145C:87-98.
- [2] Klinger K, Landes G, Shook D, et al. Rapid detection of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization (FISH) [J]. *Am J Hum Genet*, 1992, 51: 55-65.
- [3] 王晨虹, 周璐, 李胜利. 荧光原位杂交与核型分析技术产前诊断非整倍体的对比研究 [J]. *现代妇产科进展*, 2009, 18:201-204.
- [4] 徐爱群, 边旭明. 荧光原位杂交技术用于快速产前诊断临床评价 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2009, 36:172-177.
- [5] Witters I, Devriendt K, Legius E, et al. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 in 5049 consecutive uncultured amniotic fluid samples by fluorescence in situ hybridisation (FISH) [J]. *Prenat Diagn*, 2002, 22:29-33.
- [6] Pellestor F. Development and adaptation of the PRINS technology: an overview [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 334: 211-220.
- [7] Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Suder D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors [J]. *Science*, 1992, 258:818-821.
- [8] Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, et al. Genome-wide

- analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays [J]. *Nat Genet*, 1999, 23:41-46.
- [9] Ballif BC, Rorem E, Sundin K, et al. Detecting of low level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens [J]. *Am J Med Genet Part A*, 2006, 140A:2757-2767.
- [10] Vermeesch JB, Fiegler H, Leeuw N, et al. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis [J]. *Eur J Hum Genet*, 2007, 15:1105-1114.
- [11] 鲍如蓉, 朱宝生, 苏洁, 等. 唐氏综合征快速产前诊断方法的研究 [J]. *黔南民族医学学报*, 2009, 22:18-22
- [12] Schrijver I, Cherny SC, Zehnder JL. Testing for maternal cell contamination in prenatal samples a comprehensive survey of current diagnostic practices in 35 molecular diagnostic laboratories [J]. *J Mol Diagn*, 2007, 9:394-400.
- [13] Van D, Boter OM, de Jongl 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, 17:112-121.
- [14] 周大文, 许淼, 颜景斌, 等. 应用 MLPA 微阵列技术分析基因组内拷贝数变异的初步探讨 [J]. *现代诊断与治疗*, 2008, 19:98-104.
- [15] Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:9236-9241.
- [16] Fan HC, Blumenfeld YJ, El-Sayed YY, et al. Microfluidic digital PCR enables rapid prenatal diagnosis of fetal aneuploidy [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2009, 5:543-549.
- [17] UK National Screening Committee. Antenatal screening--working standards for Down's syndrome screening. 2007 [S/OL] [2009-06-08]. www.screening.nhs.uk/downs/home.htm.
- [18] Leung WC, Lau ET, Lau WL, et al. Rapid aneuploidy testing (knowing less) versus traditional karyotyping (knowing more) for advanced maternal age: what would be missed, who should decide [J]? *Hong Kong Med J*, 2008, 14:6-13.
- [19] Caine A, Maltby AE, Parkin CA, et al. Prenatal detection of Down's syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosomes 13, 18, and 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment [J]. *Lancet*, 2005, 366:123-128.
- [20] Sparkes RL, Bernier FP, Chernos JE, et al. Suitability of rapid aneuploidy detection for prenatal diagnosis [J]. *J Obstet Gynaecol Can*, 2008, 30:781-787.
- [21] Speevak MD, Dolling J, Terespolsky D, et al. An algorithm for the prenatal detection of chromosome anomalies by QF-PCR and G-banded analysis [J]. *Prenat Diagn*, 2008, 28:1221-1226.
- [22] Sparkes RL, Bernier FP, Chernos JE, et al. Suitability of rapid aneuploidy detection for prenatal diagnosis [J]. *J Obstet Gynaecol Can*, 2008, 30:781-787.
- [23] Dickinson JE, Harcourt E, Murch A, et al. The selective use of rapid aneuploidy screening in prenatal diagnosis Australian and New Zealand [J]. *J Obstet Gynecol*, 2009, 49:28-33.
- [24] Boormans E, Birnie E, Bilardo C, et al. Karyotyping or rapid aneuploidy detection in prenatal diagnosis? The different views of users and providers of prenatal care [J]. *BJOG*, 2009, 116:1396-1399.

(收稿日期: 2010-05-18)