

染色体、阈值—高分辨比较基因组杂交技术的质控关键

盛敏 朱海燕 朱湘玉 李洁 胡娅莉*
(南京医科大学鼓楼临床医学院,江苏南京 210008)

【摘要】 目的 讨论高分辨比较基因组杂交 (high resolution comparative genomic hybridization, HR-CGH) 技术中高分辨染色体玻片的质量以及不同阈值分析方法对 HR-CGH 技术的结果影响。方法 以正常男性外周血为材料,制备高分辨染色体玻片,分析滴片方案、后固定、预变性等技术环节对染色体玻片质量的影响,从而确立 HR-CGH 的染色体玻片制备及挑选标准。另以 10 名正常男、女性外周血为材料,进行 HR-CGH 检测,杂交结果分别以固定阈值及动态参考阈值 (dynamic standard reference intervals, DSRI) 进行判定,讨论不同判定方法对 HR-CGH 检测结果的影响。结果 实验证实,过火、后固定及预变性的实施有利于稳定制备高质量的染色体玻片。另外 10 名正常人标本的杂交结果,以固定阈值法分析的结果均与核型分析结果一致;以 ASI 软件附带的 DSRI 法分析,9 例结果与核型一致,1 例女性结果出现假阳性,为 46,XX,dup(15)(q2.2~2.6)。结论 高分辨染色体玻片的背景、染色体分散度、抗变性能力是 HR-CGH 实验成功的关键。以固定阈值分析结果,不受人群差异限制,可在各实验室间广泛应用。而以 DSRI 分析结果,则受人群差异限制,该 DSRI 数据必须来自本地正常人群。

【关键词】 高分辨比较基因组杂交;高分辨染色体玻片;固定阈值;动态阈值

Chromosomes and Intervals The Quality Control of HR-CGH

Sheng Min, Zhu Hai-yan, Zhu Xiang-yu, Hu Ya-li.

(The Drum Tower Clinical Medical College of Nanjing Medical University, Jiangsu Nanjing 210029, China)

【Abstract】 Objective To explore the the important influence factor of HR-CGH: chromosomes and intervals. **Methods** Use normal male peripheral blood to make high resolution chromosomes, to establish the criterion of making and selecting chromosomes by analyzing the influence of drop method, post-fixation and pre-denaturing. In addition, ten HR-CGH experiments were done and analyzed using both fixed threshold and dynamic standard reference intervals. **Results** The results of the HR-CGH experiments using fixed threshold were the same as their karyotype results while a false positive result 46,XX,dup(15)(q2.2-2.6) was appeared using DSRI. **Conclusion** The background and the spread of chromrsomes as well as their anti-denatured ability were the key points of HR-CGH experiment. Unlike DSRI, Fixed threshold could be used in all labs without the limitation of population.

【Key words】 HR-CGH; high resolution chromosome; fixed threshold; DSRI

基金项目:江苏省社会发展项目(BS2006012);江苏省六大人才高峰课题;南京市卫生局重点项目(zkx 06018)。

*通讯作者:胡娅莉,江苏省南京市中山路321号,邮编:210008。E-mail: yali_hu@hotmail.com.

比较基因组杂交技术 (comparative genomic hybridization, CGH) 自 1992 年建立至今,已被推广应用到肿瘤、血液病、产前诊断等多个领域,成为研究染色体数目、结构异常的热门技术。近年来,如何

提高 CGH 的检测敏感性(即分辨率)成为众多学者研究的焦点。2000 年, Krichhoff 等^[1]对 CGH 技术进行了改进,将杂交载体-中期染色体替换为高分辨染色体,同时将结果判定以大量正常人群标本的杂交结果获得的 DSRI 代替固定阈值法,由此建立了高分辨比较基因组杂交技术(high resolution comparative genomic hybridization, HR-CGH)。在其后的研究中, Huang 等^[2]发现,通过不断加入正常人群检测结果的数据,可对 DSRI 进行修正,将 HR-CGH 最大分辨率提高到 3Mb。但 HR-CGH 技术操作较为繁琐,室间差异大,因此,解析影响 HR-CGH 质量控制的直接因素直接关系到该技术临床推广的可行性。

本研究针对 HR-CGH 技术中染色体玻片与阈值分析法这两个关键技术环节进行讨论,为 HR-CGH 的质量控制及规范化推广提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象 随机挑选男、女志愿者,分别进行 X 线胸片、心电图、超声、血常规、染色体核型分析等检查,从中挑选各项指标结果正常、无家族遗传性疾病的男性、女性数名,定义为正常人群。

1.2 研究方法

1.2.1 染色体玻片的处理

1.2.1.1 细胞培养 抽取一名正常男性外周血 2 ml,接种 0.5~1 ml 于 RPMI1640(威海生物)培养基中,于 37℃、5%的 CO₂ 培养箱培养 66~72 小时。加入 5-氟尿嘧啶(10⁻⁵ M)与尿嘧啶核苷(10⁻⁴ M)各 100 μL,继续培养 17 小时后加入 100 μL 胸腺嘧啶(10⁻³ M),1 小时后加入 40 μL 溴化乙啶(1 mg/ml),3 小时后加入 25 μL 秋水仙胺(25 μg/ml),10 min 后收获。细胞收获法参照本院产前诊断中心常规方法^[3]。

1.2.1.2 滴片 一部分淋巴细胞悬液采用高滴片法,具体方法为:桌面放置 4 片洁净玻片,悬液于其上方 50 cm 高度垂直滴落,每个玻片滴 1~2 滴。

另一部分悬液采用过火法,具体方法为:悬液滴 1~2 滴于 4 片洁净玻片上,迅速将玻片从酒精灯火焰顶端移过,玻片表面的固定液燃烧,吹灭火焰。反

复 2~3 次。各取数张高滴片法与过火法所制玻片,经 G 显带后于显微镜(Lecia DM1000)下观察。

1.2.1.3 后固定 将部分高滴片或过火结束后的玻片立即置于新鲜固定液(甲醇 冰醋酸 = 3 : 1)中漂洗 3~5 秒后取出,室温晾干。

1.2.1.4 预变性实验 取数张同批制作的高分辨染色体玻片,于预热 74℃的变性液(70%甲酰胺:2×SSC,pH7.0)中变性,各玻片变性时间从 3 分钟到 5 分钟不等。变性结束后室温晾干,于玻片上滴加含有抗淬灭剂的 DAPI,盖玻片封片后置于荧光显微镜下观察(Lecia DM2500),CCD 相机(Change-Coupled Device, CCD)拍摄 DAPI 图像。

1.2.2 阈值选择 从正常人群中挑选 6 名男性、5 名女性,抽取周静脉血 2 ml,以蛋白酶 K 充分消化,酚-氯仿提取 gDNA,ddH₂O 溶解,紫外分光光度仪测定 gDNA 的浓度和纯度,将各 gDNA 调整浓度至 200~500 ng/μl。按缺口平移法^[4](nick translation kit,美国 Vysis 公司),1 名男性 gDNA 作为对照 DNA 采用光谱红脱氧尿苷三磷酸(SpectrumRed-dUTP)标记为红色,剩余 10 名男、女性 gDNA 采用光谱绿脱氧尿苷三磷酸(SpectrumGreen-dUTP)标记为绿色。在 DNA 内切酶与连接酶的作用下,切碎 DNA 长链的同时将荧光基团连接到切口断端从而标记荧光。所有 DNA 均酶切至探针片段长度为 200~1 000 bp 时停止反应。探针、玻片变性、杂交 72 小时后自湿盒中取出,洗片后 DAPI 复染,荧光显微镜下观察,CCD 相机拍摄杂交图像,ASI 软件分析计算出各号染色体上的绿、红荧光比值,绘出曲线图。

1.2.2.1 固定阈值 除着丝粒、端粒等区域被人竞争 DNA(cot-1 DNA, Vysis)封闭外,每号染色体荧光比值均以 0.8~1.2^[5]的区间作为正常范围,绿、红荧光的比值曲线在其范围内判定为正常,小于 0.8 处定为缺失,大于 1.2 处定为扩增。

1.2.2.2 DSRI 除着丝粒、端粒等区域被人竞争 DNA(cot-1 DNA, Vysis)封闭外,每条染色体均以 ASI 软件自带的动态阈值区间作为正常范围,绿、红荧光的比值曲线在其范围内判定为正常,低于该范围处定为缺失,高于该范围处定为扩增。ASI 软件附带的 DSRI 来自美国 15 例正常人群的 HR-CGH

杂交数据。

2 结果

2.1 高滴片与过火法的染色体分散度比较

两种方法均为细胞收获制片常用方法。如图 1 所示,高滴片法所制玻片经 G 显带处理后带纹显现清晰,利于辨认染色体,但是分散程度较差。且染色体更弯曲、黏着,不利于进行进一步的杂交。过火法经 G 显带处理后带纹稍欠清晰,但分散效果好,染色体更直,有利于杂交后荧光值的获取。故认为过火法为 HR-CGH 技术中更理想的滴片方法。

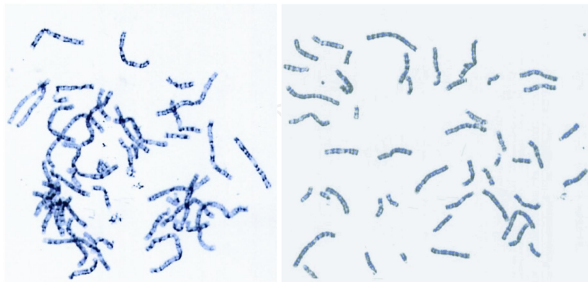


图 1 左一:高滴片法所制玻片的 G 显带图
左二:过火法所制玻片的 G 显带图

2.2 增加后固定步骤对高分辨染色体片背景的影响 玻片中的胞浆、细胞碎屑等杂质具有很强的荧光吸附能力,因而这部分物质的存在会与染色体竞争荧光,从而影响 HR-CGH 杂交效率。通过增加后固定这一步骤我们发现,利用新鲜的固定液可以将大部分的杂质洗脱下来,相差显微镜下观察发现玻片背景更干净。

2.3 预变性实验确定同一批次玻片的合适变性时间 在 HR-CGH 实验中笔者发现,不同批次的染色体玻片在杂交的变性时间上存在很大的差异,若变性时间过短,杂交失败,变性时间过长则染色体呈空泡状,DAPI 显带后无带纹。因此,通过设立预变性实验,可以对同一制作批次的玻片的变性时间进行初步评估(图 2)。

2.4 阈值 核型分析结果:5 名男性结果均为 46,XY,5 名女性结果均为 46,XX。

固定阈值:5 名男性结果均为 46,XY,5 名女性结果均为 46,XX。

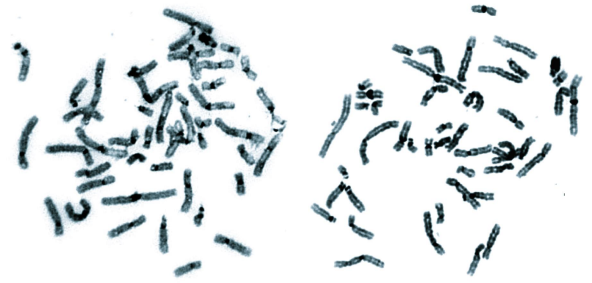


图 2 左一:变性时间过长(5 min),DAPI 复染后染色体呈空泡状
左二:变性时间合适(3.5 min),DAPI 复染后染色体呈 G 带带纹

DSRI:5 名男性结果均为 46,XY,4 名女性结果为 46,XX,1 名女性结果为 46,XX,dup(15)(q2.2~2.6)。见表 1、图 3。

表 1 10 名男、女性标本的核型分析及 HR-CGH 结果

标本	核型分析	HR-CGH 固定阈值	HR-CGH 动态阈值
男性 1 号	46,XY	46,XY	46,XY
男性 2 号	46,XY	46,XY	46,XY
男性 3 号	46,XY	46,XY	46,XY
男性 4 号	46,XY	46,XY	46,XY
男性 5 号	46,XY	46,XY	46,XY
女性 1 号	46,XX	46,XX	46,XX
女性 2 号	46,XX	46,XX	46,XX,dup(15)(q2.2-2.6)
女性 3 号	46,XX	46,XX	46,XX
女性 4 号	46,XX	46,XX	46,XX
女性 5 号	46,XX	46,XX	46,XX

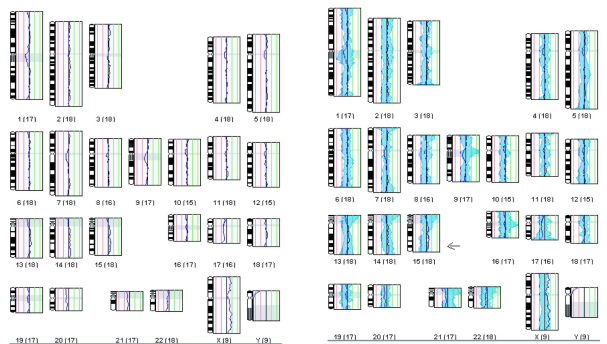


图 3 左一:2 号女性标本的固定阈值分析结果:46,XX
左二:该女性的 DSRI 分析结果:46,XX,dup(15)(q2.2-2.6)
箭头所指为 15 号染色体扩增区域

3 讨论

3.1 HR-CGH 的质量控制 HR-CGH 技术是一种连接细胞遗传与分子遗传的技术,该技术不再依

赖传统的肿瘤细胞、羊水或脐带血的培养,一次实验即可对待测样本的整套 DNA 进行检测,因而在肿瘤研究、产前诊断等领域具有很大的应用前景。但是,除硬件需要外,该技术本身也存在多处难点。由于 HR-CGH 的结果来自染色体上绿、红荧光的比值,任何一点人为操作失误使该比值发生变化都会导致假阳性或假阴性的产生,因此,HR-CGH 技术质量控制的关键在于降低失败率、假阳性率、假阴性率以及减少实验室间技术手法差异。在 HR-CGH 技术中,有两个环节尤为重要,即染色体玻片的制备与阈值分析。染色体玻片是杂交的载体,承载着吸附荧光探针、分析辨认染色体的任务。目前在国内,仅有少数实验室能成功制备高分辨染色体玻片,相关报道也较少,因此 HR-CGH 质控的首要任务是确保高分辨染色体玻片的稳定、高质量。通过多次摸索,本中心成功掌握了高分辨染色体培养方案(2.1.1)。在后期玻片的制作中,笔者在比较两种滴片方法的同时首次引入“后固定”技术,使玻片能获得良好的染色体分散效果及干净背景。

固定阈值(0.8~1.2)是公认的 HR-CGH 结果分析方法,自 1992 年起沿用至今。2000 年, Krichhoff 等提出了 DSRI 的概念,其后的报道亦指出,DSRI 的应用使 HR-CGH 的最高分辨率达到 3Mb。由此,HR-CGH 真正成为了细胞遗传与分子遗传之间的桥梁技术。但 DSRI 分析法是否可以直接为我们所用尚未可知。阈值的选择也成为 HR-CGH 的质控点之一。

3.2 高分辨染色体玻片影响杂交结果的主要因素

作为 HR-CGH 技术的杂交载体,高分辨染色体玻片的质量直接关系到杂交的效率,也是 HR-CGH 质量控制的第一关。玻片的质量主要取决于染色体的分散度、染色体的背景及染色体抗变能力。由于高分辨染色体处于有丝分裂的晚前期,染色体长度较长,染色体的黏附力也较中期染色体大,要获得很好的分散效果,必须完全打破染色体之间的黏附力。在制备中期染色体玻片时,高滴片法与过火法的染色体分散效果相当,而在制备高分辨染色体玻片时,高滴片法通过高度差获得的势能不及过火法中固定液瞬间燃烧产生的热能,无法完全破坏高分

辨染色体间的黏附力,因而染色体分散效果不如过火法。除染色体的分散度外,玻片的背景也是 HR-CGH 的重要影响因素。胞浆、细胞碎片、杂质的存在能与染色体竞争吸附荧光探针,导致杂交信号/背景比(S/B)过低,杂交结果的可信度降低。针对这个环节,笔者在玻片制备中引入了新的技术:“后固定”。1997 年, Karhu 等首次提出“后固定”技术,并通过实验比较证实了同一个细胞悬液,滴片后应用后固定技术,制备的玻片背景明显优于未行后固定的玻片。后固定技术的原理并不难,主要依靠甲醇及冰醋酸等有机溶剂,将胞浆、细胞碎片等吸附不甚牢固的杂质从玻片中洗脱,而染色体与玻片间的黏附力较大,未被洗脱。在本研究中,笔者也对后固定技术降低杂交背景的特点进行了证实。另外,不同来源的淋巴细胞制备的染色体玻片的抗变能力不同,且该能力随时间的推移而发生改变。玻片若盲目选择变性时间,可能导致变性不足杂交失败或变性过度染色体形态差等结果。而杂交实验中,探针数量有限,为避免浪费探针,笔者在杂交前增加了玻片预变性实验,从同一批次制备的几十张玻片中选择数张进行,用于评估染色体玻片的抗变能力。预变性实验通过设立变性时间梯度,观察各玻片变性后在荧光显微镜下的染色体形态,从而确定最佳变性时间。过火法、后固定及预变性实验的加入为获得稳定而高质量的染色体玻片奠定了基础。

3.3 HR-CGH 的阈值选择—固定阈值与 DSRI
固定阈值分析法能客观而真实地反映染色体片段缺失/扩增情况,最大检测分辨率约为 8~10 Mb^[6]。2000 年, Krichhoff 等尝试用 DSRI 代替固定阈值,并在其后的实验中证实以 DSRI 分析结果是可行的,可将检测的最大分辨率提高至 3 Mb。在本研究中,笔者挑选了 10 名正常人群标本进行 HR-CGH 杂交,以固定阈值分析,10 例标本均与核型分析结果一致;以 ASI 软件附带的 DSRI 分析,9 例标本与核型分析结果一致,女性 2 号标本出现了 15 号染色体 2.2~2.6 区带扩增的阳性结果。

2007 年, science 杂志首次报道提出^[7],人类基因组 DNA 除单核苷酸多态性(SNP)以外,还存在 DNA 拷贝数差异(copy number variation, CNV)。

随后,许多学者都致力于寻找这些 CNV 位点。Smith 等^[8]利用 array CGH 技术发现了正常白种男性人群的 1 284 个 CNV 位点,这些位点的揭示为人类复杂疾病的表型与基因型的关联提供了帮助。CNV 的研究是一项巨大的工程,目前仅明确 CNV 主要存在于不同种族的正常人群间,但一共包含哪些位点,尚待进一步研究。本实验中,女性 2 号为正常人,无明显异常表型,外周血染色体核型结果也正常,推断 DSRI 分析结果为假阳性。本研究分析所采用的 DSRI 数据库来自美国 15 例正常人标本的 HR-CGH 检测结果。该 DSRI 在 15 号染色体长臂 2.2~2.6 区带整体偏向中线 1.0 左侧,而女性标本 2 号的荧光曲线在该区带稍偏向中线 1.0 右侧。由于 CNV 的存在,美国正常人群的 DSRI 数据库并不适用于我国人群标本的检测。盲目套用 DSRI 分析是不可行的。要真正提高分辨率,必须以本国正常人群作为标本进行杂交,建立匹配的 DSRI 数据库。

参 考 文 献

- [1] Kirchoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics[J]. Genet, 2001, 38: 740-744.
- [2] Huang XL, Maher TA, McClure R, et al. Pallister - Killian

- syndrome:tetrasomy of 12pter/12p11. 22 in a boy with an anaphoid, inverted duplicated marker chromosome [J]. Clin Genet, 2007, 72: 434-440.
- [3] 许争峰,胡娅莉,朱瑞芳. 高效羊水细胞培养技术在产前诊断中的应用[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(4): 275-276.
- [4] 胡娅莉,陈雪,陈蕾蕾,等. 两种不同遗传学分析方法用于诊断自然流产组织的比较[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(3): 148-151.
- [5] Baudis M. Genomic imbalances in 5 918 malignant epithelial tumors: an explorative meta-analysis of chromosomal CGH data[J]. BMC Cancer, 2007, 7: 226-240.
- [6] Belloso JM, Caballin MR, Gabau E, et al. Characterization of six marker chromosomes by comparative genomic hybridization [J]. Am J Med Genet A, 2005, 136: 169-174.
- [7] Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, et al. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes[J]. Science, 2007, 5813: 848-853.
- [8] Smith AJ, Tsalenko A, Sampas N, et al. Array CGH analysis of copy number variation identifies 1284 new genes variant in healthy white males: implications for association studies of complex diseases[J]. Human Molecular Genetics, 2007, 23: 2783-2794.

编辑:肖云山

收稿日期:2009-10-07

读者 · 作者 · 编者

国外有影响力的母胎医学类学术期刊一览

Abbreviated Journal Title	ISSN	Impact 06	Impact 07
GYNECOL ONCOL	0090-8258	2.319	2.614
INT UROGYNECOL J	0937-3462	1.828	2.523
SEMIN PERINATOL	0146-0005	2.358	2.477
OBSTET GYNECOL SURV	0029-7828	3.329	2.395
CLIMACTERIC	1369-7137	2.163	2.275
J SOC GYNECOL INVEST	1071-5576	2.379	2.264
CONTRACEPTION	0010-7824	1.882	2.262
BIRTH-ISS PERINAT C	0730-7659	2.058	2.217

(续表 2 见 53 页)