

# 比较 MLPA 与细胞遗传学技术在流产绒毛染色体分析中的应用

王伟\* 李海波 刘敏娟 段程颖 毛君 孙健 丁杨 陈瑛 李红  
(南京医科大学附属苏州医院 生殖与遗传中心,江苏 苏州 215002)

**【摘要】 目的** 对比多重连接探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)与染色体核型分析技术,明确两种技术在流产绒毛样本检测中的效能,以期建立最优化的实验室检测方案。**方法** 采集 189 例稽留流产绒毛样本,同步行 MLPA (SALSA P290-B1)和常规染色体核型分析检测,并对检测结果进行统计分析。**结果** 两种方法综合分析成功 187 例,占 98.94%。其中核型分析成功 117 例,占 61.90%;MLPA 能够检测 185 例,占 97.88%。核型分析与 MLPA 结论一致 70 例,占 37.04%;42 例多倍体或非探针目标区染色体异常,MLPA 未能检出,占其独立检测样本的 22.70%(42/185);72 例因培养失败等因素未能成功核型分析,占 38.10%。**结论** ①独立采用核型分析或 MLPA 技术均不能有效实现流产绒毛染色体异常的检测分析。②综合考虑检测成本和效能,先行染色体核型分析并同时留取流产绒毛样本,应用 MLPA 作为核型分析失败的补充方案具有临床可行性。

**【关键词】** 流产;绒毛;多重连接探针扩增技术;细胞遗传学

**【中图分类号】** R394.2 **【文献标识码】** A

**【Abstract】 Objective** To establish optimized laboratory testing proposal through comparison of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and conventional karyotyping for the diagnosis of pregnancy loss. **Method** A cohort of 189 patients underwent side-by-side analysis of chorionic villi samples by both conventional karyotyping and MLPA (SALSA P290-B1) with direct comparison of results. **Results** 187 samples (98.94%) were analyzed successfully by conventional karyotyping and MLPA. 117 samples (61.90%) were analyzed successfully only by karyotyping and 185 samples (97.88%) were analyzed only by MLPA. 70 samples (37.03%) yielded the same findings with both MLPA and cytogenetic results. 42 samples (22.70% in the MLPA alone samples) were not detected because of inability to characterize structural rearrangements or ploidy changes. 72 samples (38.10%) had no cytogenetic results due to culture failures where MLPA results were available. **Conclusions** ①Chromosomal abnormalities can't be detected effectively in single method whether MLPA or conventional karyotyping. ②Considering the cost and efficiency, the optimal situation would be to have MLPA available in the laboratory as the complementary examination of the conventional karyotyping.

**【Key words】** pregnancy loss; chorionic villi; multiplex ligation-dependent probe amplification; conventional karyotyping

自然流产是孕早期最常见的并发症<sup>[1]</sup>,约 65% 的受孕胚胎及 15% 的临床可见妊娠会发生流产<sup>[2]</sup>,

1% 的女性会出现连续 3 次以上的复发性流产。而自然流产的病因通常不明或是多因素造成的,但约 50%~70% 的早期自然流产被认为是染色体异常造成的,而这些异常中约 95% 表现为常染色体的非整

基金项目:江苏省临床医学科技专项(BL2013019);苏州市科技局社会发展项目资助项目(No. SS08019)

\* 通讯作者:王伟, E-mail: ww126626@163.com

倍体<sup>[3-5]</sup>,因此染色体倍性检测是流产查因的重要方向。

细胞遗传学是自然流产查因的首选技术手段,但其技术要求高,费时费力,通量低,且存在10%~40%的样本因培养失败、细菌或真菌感染、母血污染等原因而未能给出检测结果<sup>[6]</sup>。分子遗传学技术如荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)和定量荧光PCR技术(quantitative fluorescent-PCR, QF-PCR)等是检测非整倍体的可靠方法,并能短时间内得出检测结论,但这些技术检测的染色体数目有限,且FISH、Array-CGH的检测成本高昂。与之相比,多重连接探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)一次可实现基因组中40个目标区的定量检测,具有较高的性价比。2007年Diego-Alvarez等<sup>[7]</sup>即开始应用MLPA技术对流产样本检测。本研究旨在对比MLPA与染色体核型分析在流产绒毛样本中的检测,明确两种技术的效能,以期建立最优化的实验室检测方案。

## 1 资料与方法

1.1 实验材料 签署知情同意后,收集苏州市立医院生殖与遗传中心2009年至2012年2月期间经超声检查发现胚胎停止发育后行清宫术的绒毛组织189份。孕妇平均年龄29岁,孕龄5~17周,为保护患者隐私,所有数据资料的统计分析均在未知患者临床背景的状态下进行。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞遗传学分析 于体视镜下显微操作挑取、分离绒毛样本,明确为胎儿部分进行清洗后用于细胞培养,传统方法收获和G显带体核型分析。

1.2.2 MLPA检测分析 挑取流产绒毛约15 mg,采用Blood DNA mini Kit(QIAGEN公司,德国)试剂盒提取基因组DNA。用ND-1000(Thermo公司,美国)测定DNA浓度和纯度,并将DNA稀释至25 ng/ $\mu$ l。依照MLPA试剂盒(SALSA P290-B1)

的操作说明操作,产物用ABI3130遗传分析仪进行毛细管电泳。用Genemarker软件分析电泳数据,并与细胞遗传学结果比对。

## 2 结果

189例绒毛样本经细胞遗传和MLPA同步分析两种方法综合分析成功187例,占98.94%,因质量问题2例样本用两种方法均未能给出检测结论。其中核型分析成功117例,占61.90%,72例因培养失败等因素未能成功核型分析,占38.10%;185例有MLPA检测结论,占97.88%,4例样本未见探针信号或杂乱而无法分析。MLPA与核型分析结论一致70例,占37.03%。42例多倍体或非探针目标区染色体异常,MLPA未能检出,占其独立检测样本的22.70%(42/185),则独立应用MLPA可成功分析143例,占总样本的75.66%。两种技术方法检测效能的对比分析参考(表1)。

2.1 MLPA结果与核型结论一致 70例样本两种技术结论一致。其中43例(22.99%)未见明显异常,27例(14.44%)可见部分染色体的非整倍体。

2.2 两种技术检测结论不一致 3例样本(1.60%)经MLPA两次双盲实验明确为微缺失/微重复综合征而核型分析未能检出。包括7q11.23区域与William-Beuren综合征(OMIM:609757)相关的微重复1例;15q11.2区域与Prader-Willi/Angelman综合(OMIM:176270/105830)征相关的微重复1例;22q13.33区域与22q13/Phelan-McDermid综合征(OMIM:606232)相关的微缺失1例。42例样本(22.22%)因多倍体或非探针目标区染色体异常,MLPA未能检出,包括非探针目标区的非整倍体21例(11.23%),多倍体7例(3.74%),嵌合体14例(7.49%)

2.3 只有一种技术的检测结论 共70例样本(37.03%)因污染、培养失败等原因仅能通过MLPA得出检测结论,包括35例(18.72%)未见明显

异常,26例(13.90%)存在非整倍体,9例(4.81%)存在非同一条染色体的单个或多个探针的异常(信号降低3例,信号增加6例),怀疑为微缺失或微重复。2例(1.07%)可能因样本质量、核酸降解或污染等原因,MLPA未能检测到扩增信号,仅有核型分析结果[1例为45,XO;1例为92,XXYY,t(8;14)]。

表1 MLPA与染色体核型检测的对照分析

	异常检出数	正常检出数	未正确检出数	无结果数	合计
MLPA	65	78	42	4	189
核型分析	71	43	3	72	189
差异*	-6	+35	-39	+68	+58

注:\*差异栏表示MLPA的检测效能,计算以核型分析的结论作为参照

### 3 讨论

胚胎染色体异常是导致自然流产的主要原因之一,早期自然流产的胚胎染色体异常以染色体多倍体和非整倍体异常为主,最常见的是染色体数目异常,而结构异常所占比例较少<sup>[8]</sup>,这在本研究中也得到了验证。目前,最常用的检测方法主要是通过绒毛活检取胎儿细胞进行染色体核型分析。但该方法存在时间长、易污染、对操作人员要求高等缺陷,有着一定的局限性。随着分子诊断技术的发展,这些问题得到了逐步解决。MLPA技术是2002年荷兰科学家Schouten等<sup>[9]</sup>发明的一种针对靶核酸序列进行定性和定量分析技术,从DNA提取至结果分析仅需1~2个工作日,每次反应可同时多达30~50目标位点的缺失、重复、单核苷酸多态性等进行检测,其操作相对简单,设备自动化程度高,具有快速、高通量的优势,可同时检测几十个样本。

目前国内已有采用MLPA(SALSA P095)仅针对流产绒毛13、18、21、X和Y非整倍体检测的报道<sup>[10]</sup>,目前MLPA针对染色体组拷贝数异常检测的试剂盒有多个,包括多个针对微缺失/微重复、染色体端粒、5条常见非整倍体、具体染色体长短臂及组合型的检测试剂盒。而流产绒毛样本不仅仅是常

见5条染色体的数目异常,还包括其他染色体数目异常<sup>[11]</sup>,及染色体的微缺失<sup>[12,13]</sup>等。考虑尽可能覆盖与已知流产密切相关的染色体畸变,组合型试剂盒SALSA P290-B1成为本次研究的选择对象,其除了能检查常见的13、18、21、X和Y 5条常见染色体非整倍体情况,同时可对常见14种染色体微缺失/微重复情况进行检测。共包含13条染色体上的51个探针:除21号染色体6个探针,13号、18号、X染色体各4个探针,Y染色体2个探针之外,还包括17号染色体8个探针,15号染色体6个探针,22号染色体5个探针,1号、7号染色体各3个探针,4号、5号、8号染色体各2个探针,不包含12号、14号、16号等其他10条染色体信息。较之Caramins MC等<sup>[14]</sup>采用SALSA P070的全染色体端粒探针,本研究在常见非整倍体及微缺失/微重复综合征检测的探针密度增加,并发现3例核型分析未见的可能与流产相关的微缺失/微重复。但75.66%的综合检出效能较之Caramins MC等<sup>[14]</sup>采用SALSA P070 85.91%的检出效能有所降低,可见SALSA P290-B1探针试剂盒中未包含的10条染色体约占流产异常染色体的10%,流产绒毛中染色体数目异常较之微缺失/微重复等亚显微结构异常占有更多比例。

本研究189例流产绒毛样本,细胞遗传学技术共检出异常71例,正常43例,未能正确检出3例,培养失败72例。MLPA技术共检出异常65例,正常78例,未能正确检出42例,无结果4例(表1)。两者比较MLPA能增加30.69%明确检出率(58/189),这部分增加的检出率主要是针对培养失败的样本,进一步分析这些数据可发现,成功检出的样本中MLPA的正常检出率(54.54%)要显著高于核型分析(37.72%)( $P < 0.05$ ),而异常检出率核型分析(62.28%)显著高于MLPA(45.45%)( $P < 0.05$ )。且独立采用MLPA的检出效能(75.66%)和独立采用核型分析的检出效能(60.32%)均不能完全满足

临床需求,因此两者各有技术优劣。核型分析的缺陷主要表现为费时、费力、培养失败、染色体形态难分辨等;而 MLPA 的缺陷主要因其技术限制,包括染色体平衡易位、多倍体、非探针目标区的染色体剂量异常等。因此最佳的实验室方案应该是 MLPA 与核型分析同步双盲对流产样本进行检测,这样可达到 98.94% 的检测成功率。考虑到检测成本和性价比,根据我们对两者检测效能的分析,先行 MLPA 检测,核型分析作为补充是最佳的实验室方案。但因 MLPA 实验过程至少需要 2 个工作日,如果未能给出检测结论,冻存后的绒毛样本再培养制备染色体会因部分绒毛细胞死亡而相对困难,而冻存的绒毛样本并不影响后续的 DNA 提取。因此,综合考虑检测成本和效能,先行染色体核型分析并同时留取流产绒毛样本,应用 MLPA 作为核型分析失败的补充方案具有临床可行性。

#### 参 考 文 献

- [1] Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage[J]. *Lancet*, 2006, 368(9535):601-611.
- [2] Warburton D, Susser M, Stein Z, et al. Genetic and epidemiologic investigation of spontaneous abortion: relevance to clinical practice[J]. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 1979, 15(5A):127-136.
- [3] Wolf GC, Horger ER. Indications for examination of spontaneous abortion specimens: a reassessment[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1995, 173(5):1364-1368.
- [4] Rubio C, Pehlivan T, Rodrigo L, et al. Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2005, 53(4):159-165.
- [5] Diego-Alvarez D, Ramos-Corrales C, Garcia-Hoyos M, et al. Double trisomy in spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular approach[J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(4):958-966.
- [6] Carvalho B, Doria S, Ramalho C, et al. Aneuploidies detection in miscarriages and fetal deaths using multiplex ligation-dependent probe amplification: an alternative for speeding up results? [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2010, 153(2):151-155.
- [7] Diego-Alvarez D, Rodriguez DAM, Cardero-Merlo R, et al. MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages[J]. *Prenat Diagn*, 2007, 27(8):765-771.
- [8] Fritz B, Hallermann C, Olert J, et al. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)-Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions[J]. *Eur J Hum Genet*, 2001, 9(7):539-547.
- [9] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(12):e57.
- [10] 邓璐,孙筱放,张慧敏,等. MLPA 快速诊断胎儿染色体非整倍体疾病方法的研究与应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 03(5):312-317.
- [11] Nagaishi M, Yamamoto T, Iinuma K, et al. Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2004, 30(3):237-241.
- [12] Pina-Aguilar R E, Martinez-Garza S G, Kohls G, et al. Y chromosome microdeletions in Mexican males of couples with idiopathic recurrent pregnancy loss[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2012, 38(6):912-917.
- [13] Dewan S, Puscheck EE, Coulam CB, et al. Y-chromosome microdeletions and recurrent pregnancy loss[J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(2):441-445.
- [14] Caramins MC, Saville T, Shakeshaft R, et al. A comparison of molecular and cytogenetic techniques for the diagnosis of pregnancy loss[J]. *Genet Med*, 2011, 13(1):46-51.

编辑:刘邓浩

(收稿日期:2014-01-27)