

“一种新型的适合于 CVS—PCR 的绒毛 DNA 提取方法” 点评

邹刚

(同济大学附属第一妇婴保健院, 上海 200040)

A novel method for extracting DNA from chorionic villus samples for use in CVS-PCR, which ensures complete villus dissociation

To demonstrate that glass disruption beads dissociate chorionic villus samples releasing DNA from mesenchymal and cytotrophoblast cells that is suitable for processing by CVS-PCR (rapid molecular aneuploidy testing). This method is quicker than conventional methods and may limit discrepancies between PCR and karyotype in certain types of placental mosaicism.

Method: DNA was extracted from villus samples by mechanical disruption of the cells using glass beads. This method was compared to collagenase incubation followed by chelex extraction of the digested villus. PCR data generated were compared using standard criteria.

Results: DNA extracted by glass bead disruption generated data of equivalent quality to that obtained from DNA extracted using conventional collagenase and chelex-based extraction method. The case study demonstrates probable cytotrophoblast enrichment of a sample when processed by collagenase digestion and chelex incubation. Re-extraction of the digested sample by glass bead disruption resulted in cytotrophoblast and mesenchyme cells contributing to the supernatant.

Conclusion: Glass bead disruption of chorionic villus samples is an effective, inexpensive and

rapid DNA extraction method that dissociates villus ensuring that DNA from both cytotrophoblast and mesenchyme cells is represented in the supernatant. Extracted DNA produced is suitable for CVS-PCR and can be stored stably at -20°C .

这是最近发表在 2009 年第 29 卷的“Prenatal Diagnosis”上的一篇题为《一种新型的适合于 CVS—PCR 的绒毛 DNA 提取方法》。

文章简介: 在本文中, 作者阐述了通过玻璃珠离解法得到的绒毛组织 DNA 适合于绒毛快速分子诊断, 即 CVS-PCR。作者使用了两种方法进行对比, 即玻璃珠机械破碎离解法和胶原酶消化培养后用 chelex 法(传统法)进行绒毛 DNA 提取。实验结果提示玻璃珠法和传统胶原酶—chelex 提取法的 DNA 在质量和稳定性上(放置于 -20°C 环境中半年后再用作 PCR)相似。此时作者引用了一个特例。该标本采用了两种方法进行绒毛染色体的提取, 结果 CVS-PCR 结果不全相同。玻璃珠法提取 DNA 可以防止细胞滋养层细胞过度的富集。该病例的绒毛标本来自一个孕 12 周的孕妇, 临床 B 超提示颈项透明带 7.8 mm, 鼻骨缺乏, 拳头紧握, 心脏异常。唐氏综合征(Down's Syndrome) 风险为 1: 2, 13-三体 (Patau syndrome) 和 18-三体 (Edwards syndrome) 风险均为 1: 4。使用标准的胶原酶/chelex 提取法进行 CVS-PCR 的结果均正常。5 个 13 号染色体上 STR 位点(一种常见用于染色体数目异常的诊断中常用的位点, 又称短串联重复序列或微卫星, 通过对其的扩增得到的扩增峰值比可以判断是否有染色体数目异常)的扩增峰值

均在正常范围内。18 号和 21 号染色体上各 4 个 STR 位点上的扩增图形也为正常。一个 X/Y 染色体上的标志为正常,而 5 个 X 染色体上的位点为纯合子(无诊断意义)。13、18 和 21 号染色体其他的 STR 位点的扩增结果也为纯合子(无诊断意义)。但如果仔细分析 18-三体的有诊断意义的 4 个 STR 的扩增峰型,可以发现 D18S1002 的峰值比为 1.451,处于 1.41~1.59 的“灰色区域”内(通常如果峰值 < 1.4 为正常二倍体,而 > 1.6 可诊断为三倍体),提示是否诊断有误?接着作者从残留的胶原酶消化的组织中和另取一块等分的绒毛组织(放在培养液里孵育两天)通过玻璃珠法提取 DNA 并进行 PCR,其结果则与传统法存在差异。玻璃珠法提取的绒毛组织 DNA 经 PCR 后都在 18 号染色体上出现了有诊断意义的峰值或“灰色区域”(1.41~1.59)。其中通过 2 天培养液孵育后的组织其 PCR 结果更有诊断价值。

该标本经过绒毛染色体核型分析证实为 18 三体。PCR 结果和染色体结果之间的差异表明胎盘组织嵌合体现象的存在。绒毛滋养层细胞可能存在正常细胞株,而中胚叶细胞包含 18-三体的细胞株。核型分析通常选取的是间质细胞进行培养,间质细胞的核型更加接近于胎儿的细胞核型。

点评:绒毛有两种细胞组分,内层为间质细胞,外层为滋养层细胞,间质细胞的核型更加接近于胎儿的细胞核型。在孕 10 周进行的绒毛取样现在开展的越来越多,绒毛组织-聚合酶链反应(CVS-PCR)近来被用作核型分析的替代补充方法。PCR

方法分析了来自绒毛滋养层和间质细胞的 DNA,如果滋养层细胞和间质细胞的核型存在差异,差异细胞存在 15% 以上,PCR 方法就能进行诊断。而近來有文献报道 PCR 和核型分析的结果完全不一致。这可能是由于在滋养层和间质细胞之间嵌合现象的存在或胎盘嵌合存在导致了用于 PCR 和核型分析的细胞来自绒毛组织的不同部分。因此笔者在进行 CVS-PCR 时最好能使得提取的 DNA 标本能够代表整个绒毛组织(既包括滋养细胞,更要包括间质细胞)。2007 年最新的临床分子遗传协会(Clinical Molecule Genetics Society, CMGS)最佳实践指南也建议送到实验室的绒毛活检标本应该剪碎并且应该使用代表所有活检样本的 DNA 进行定量荧光 PCR。然而由于胎盘中存在嵌合现象的存在,差异性结果始终不可避免。传统的 DNA 提取方法可能过度富集了滋养层细胞而导致了 PCR 对嵌合体诊断的失败。本文作者通过实验证明玻璃珠分离法是提取绒毛活检标本 DNA 的可信的方法。通过这种方法,样本处理的时间大大缩短,试管间不停转换的流程的减少也使得转化错误的几率达到最少。该方法还可以完全分离绒毛组织,可以提高间质细胞的比例并降低由于滋养层细胞 DNA 过度富集导致的扩增差异。

该文提供了一个新的绒毛组织 DNA 快速有效的提取方法,对笔者产前诊断中绒毛活检取样进行快速分子诊断的开展大有裨益,因此建议从事产前诊断的专业人员可以尝试这种方法并对其不断改进。

(收稿日期:2009-05-12)

读者·作者·编者

本刊对文稿撰写的要求

文稿应具科学性、实用性,论点明确,资料可靠,数据准确,层次清楚,文字精练,用字规范,文稿附图量不限,提倡多附图片和视频(音频)内容。论著性文章 4000 字左右,综述、讲座 5000 字左右,论著摘要、经验交流、病例报告等一般不超过 2000 字,欢迎以图像为主的来稿,并贯穿文字说明和评析,专家视频讲座为 30~40 分钟(分成 3~4 段)。当报告是以人为研究对象的试验时,作者应该说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制定的伦理学标准并得到该委员会的批准,是否取得受试对象的知情同意。文题力求简明,且能反映出文章的主题。中文文题一般不超过 20 个汉字。