

荧光定量 PCR 用于胎儿非整倍体的产前快速诊断

苗明珠 综述 孙丽洲* 审校

(南京医科大学第一附属医院妇产科, 江苏 南京 210036)

【摘要】 染色体非整倍体异常是人类最常见的一类染色体数目异常。目前, 这类异常尚缺乏有效的治疗方法, 因此产前诊断对预防此类缺陷儿的出生具有至关重要的作用。细胞遗传学核型分析是诊断胎儿非整倍体异常的金标准, 但诊断周期较长。随着分子生物学的发展, 荧光定量聚合酶链反应 (quantitative fluorescent polymerase chain reaction, QF-PCR) 等技术逐渐用于胎儿非整倍体异常的产前快速诊断。本文就 QF-PCR 技术在胎儿非整倍体产前快速诊断中的应用做一综述。

【关键词】 非整倍体; 产前诊断; 荧光定量聚合酶链反应

Rapid Prenatal Detection of Fetal Aneuploidy by Quantitative Fluorescent PCR

Miao Ming-zhu, Sun Li-zhou*.

(The First Affiliated Hospital with Nanjing Medical University, Jiangsu 210036, China)

【Abstract】 In human, aneuploidy is the most common chromosomal numerical abnormality. To prevent these defected fetuses born, prenatal diagnosis plays an important role, because of the lack of effective therapy for such diseases. Cytogenetic karyotyping is the gold standard of aneuploidy detection, but it requires a lengthy reporting time after sampling. With the development of molecular biology, quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) be used to rapid aneuploidy detection (RAD) gradually. This review is about the application of QF-PCR on RAD.

【Key words】 Aneuploidy; Prenatal Diagnosis; QF-PCR

非整倍体异常是人类最常见的一类染色体数目异常, 其中最常见的是三体征, 常见染色体三体综合征的发病率为 1:400^[1]。最常见的非整倍体异常发生在 21、18、13 号常染色体及 X、Y 性染色体。这些异常主要包括 21-三体综合征(唐氏综合征)、18-三体综合征(Edward 综合征)、13-三体综合征(Patau 综合征)、45 XO (Turner 综合征)、47 XXY (Klinefelter 综合征), 约占产前诊断中有临床意义的染色体异常的 80%^[2,3]。因此, 做好对胎儿非整倍体的检测一直是产前诊断的重要部分。

传统的产前诊断方法为细胞遗传学核型分析, 是诊断染色体异常的金标准。方法是对羊膜腔穿刺获得的羊水细胞或绒毛抽吸获得的绒毛细胞进行培

养, 对染色体有丝分裂期的核分裂相进行分析。对所有的 23 对染色体都进行检查, 可以检出包括染色体数目异常和染色体重排等结构异常在内的多种染色体异常, 例如平衡或不平衡的染色体易位和染色体倒位。尽管核型分析为最有效的产前诊断方法, 但是该方法需要高质量的专业人员且非常耗时, 其结果报道的时间大约为 10~14 天^[4]。据报道, 在英国每 20 个孕妇就有一个需要进行产前诊断^[5]。传统的细胞遗传学方法在产前诊断的发展中已受到限制, 寻找快速、准确的产前诊断方法已成为当今产前诊断的研究热点。对于我国这样一个人口大国来讲, 寻求更快、更简便的产前诊断方法更加重要及必需。目前我国进行产前诊断的指征主要有: 高龄孕妇(≥ 35 岁)、血清学筛查高风险、超声探测的胎儿异常及父母一方或双方有染色体异常的家族史。近

* 通讯作者: 孙丽洲. E-mail: lizhou_sun121@hotmail.com

基金项目: 卫生部科研基金资助项目(WKJ 2007-3-001)

年来,随着高龄产妇的增加,以及孕妇外周血清学筛查的开展和超声技术的发展,需要进行产前诊断的孕妇数量逐年增加^[5],因此,很有必要建立快速、简便的非整倍体诊断方法应用于临床。分子生物学技术的发展为寻求新的产前诊断技术提供了基础。一些分子诊断技术已用于产前诊断领域,可做到快速诊断,通常在24~48小时内即可得到结果^[1]。荧光定量聚合酶链反应(quantitative fluorescent polymerase chain reaction, QF-PCR)就是一种迅速发展的可用于快速产前诊断的分子生物学方法。1992年,日本人 Higuchi 发明了该技术^[6]。QF-PCR 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法^[6]。1993年 Mansfield ES^[7]首次报道了基于短串联重复序列(short tandem repeat, STR)的 QF-PCR 产前诊断技术,至今已经历了近20年的发展。本文着重对 QF-PCR 在产前诊断非整倍体中的应用进行探讨。

1 QF-PCR 原理及背景

自从1983年 Mullis 发明聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)以来,PCR 技术作为一种重要的基因诊断方法,以其迅速、简便、灵敏等优点很快成为科研、临床诊断的热点技术。但是传统 PCR 技术不能准确定量。为克服上述不足,人们采取了许多方法,如杂交法、酶联法及尿苷酶降解法等,但均不能得到满意的结果。直到1992年,日本人 Higuchi^[6]发明实时荧光定量 PCR 技术,该问题才逐步得到改善。他在原有的普通 PCR 仪的基础上,加以改进,添加一个激发和检测装置,并通过在 PCR 反应液中添加染料溴化乙锭(EB)的方法,来实时监测整个 PCR 反应的全过程。随着新的荧光染料和荧光标记探针的引入以及 QF-PCR 高灵敏度、高特异性和高精准确性的特点,目前该技术已被广泛应用于基础科学研究、临床诊断、疾病研究及药物研发等领域。

2 QF-PCR 在非整倍体产前诊断中的发展

QF-PCR 技术首次用于非整倍体的产前诊断源于1993年, Mansfield^[7]应用基于 STR 的 QF-PCR

技术诊断了21三体、18三体及X染色体数目异常。STR,是多型性的一种类型,指两个或多个核苷酸重复排列,且不同的重复序列相邻的形式,长度约2~10个碱基对,常见于非编码的内含子中。由于重复单位及重复次数不同,使其在不同种族、不同人群之间的分布具有很大差异性,构成了 STR 遗传多态性。不同个体之间在一个同源 STR 位点的重复次数不同,由此可应用基于 STR 的等位基因比判断感兴趣的染色体的拷贝数。Mansfield 用于诊断的 STR 分别为21号染色体的 D21S11,18号染色体的 MBP 的5'端的2个 STR、X染色体的 HPRT 等。1994年, Pertl 等应用相同的 STR——D21S11,对134例样本进行了诊断。除了2例无法判断,其余正常样本均显示双等位基因比接近1:1,21三体样本显示为1:1:1的三等位基因比或2:1的双等位基因比^[8]。当一种染色体只应用一个 STR 时,如果两条同源染色体的 STR 相同,即为纯合,就无法判断该染色体的拷贝数。为了克服上述问题,在接下来的一系列研究中一些学者逐渐对一种染色体应用几个 STR,以提高杂合覆盖率,进而减少无法判断的情况^[9,10]。经历了近20年的发展,现在用于常见非整倍体诊断的 STR,英国临床细胞遗传学协会(Association of Clinical Cytogenetics, ACC)已于2007年做了明确规定。

除了上述几种非整倍体异常的诊断方法,1998年13三体综合征也应用 QF-PCR 的方法首次成功诊断^[11]。于是,QF-PCR 在非整倍体的产前诊断中主要应用于21、18、13、X、Y几种常见染色体异常的诊断。在 QF-PCR 首次报道用于非整倍体的产前诊断后,接下来的研究主要集中于其在几种常见非整倍体异常产前诊断中的应用及单细胞方面^[8,9,12],并未对该方法的灵敏度及特异性进行系统的研究。直到2001年,一些大样本的研究才开始对 QF-PCR 的灵敏度及特异性进行考察^[13,14]。一系列的研究证实,QF-PCR 对于非嵌合的非整倍体诊断的灵敏度和特异性均在90%以上^[15-20]。在欧洲一些实验室,QF-PCR 已取代其他非整倍体快速产前诊断(rapid aneuploidy detection, RAD)方法,作为核型分析的一种辅助手段用于非整倍体的快速产前诊断。

3 QF-PCR 用于非整倍体产前诊断的特点

3.1 优点

3.1.1 所需样本量小、取样孕周要求低 QF-PCR 用于产前诊断所用的样本可以是羊水、绒毛、胎儿血或胎儿组织,目前最常用的为羊水和绒毛。传统的核型分析需要 20 mL 的羊水,FISH 需要 5~10 mL 的羊水。用于 QF-PCR 的 DNA 可以从很少量的羊水中提取,文献中报道的用量为 0.5~5 mL^[21-25],最常见的用量还是 1~2 mL^[23]。其他样本的用量为胎儿血 5 μ L,1~2 mm 厚的胎儿组织层等^[20]。用于 PCR 扩增的 DNA 主要提取自细胞,因此不要求细胞必须是未受损的或是活细胞。这就使该方法对样本的取样孕周无特定要求,可早在 12 周,或晚期 34 周时进行取样,此时细胞活性对结果的可靠性没有影响^[13]。

3.1.2 快速 现在已认识到孕妇在等待核型分析结果的这段长时间内,心理上处于一种焦虑状态^[5],对胎儿也会造成不良影响。因此减少等待时间、缓解焦虑也是 RAD 被应用的一个主要原因。QF-PCR 在获取样本后 24~48 小时即可获得诊断报告,可显著减少孕妇的等待时间^[18]。如果结果正常,可早期缓解孕妇及家庭的焦虑;如果结果不正常,可继续等待核型分析的结果,也可即时采取终止妊娠等处理措施。

3.1.3 自动化程度高 传统的细胞遗传学核型分析需要大量的人力,技术水平要求高,需要专业人员。一个有经验的工作人员每年最多也只能完成 250 例核型分析^[26]。而现在,在一个有 DNA 测序仪的实验室条件下,每次每台仪器可完成 90 份样本的检测^[13],甚至有的实验室每次可完成 96 例^[27]。QF-PCR 可实现自动化,一个工作人员可完成的检测量明显多于核型分析。因此,每天可进行大量患者样本的检测。

3.1.4 可检出母体细胞污染的样本 母体细胞污染主要发生于侵入性产前诊断取样过程中。肉眼可见的母血细胞污染的样本,我们在处理时不难发现,但是对于一些肉眼无法辨别的污染样本,在进行核型分析或 FISH 检测时则会遇到一定的问题。当胎

儿性别为男性时,母体细胞污染容易检出,但当胎儿为女性时,母体和胎儿混杂的细胞则无法分辨。在对母体细胞污染的样本进行 QF-PCR 检测时,会出现两种基因型,此时可获取母体样本进行扩增,与用于产前诊断的样本进行仔细比较,可确定母体细胞的污染,但不能对欲进行诊断的样本做出染色体情况的诊断^[22,28]。

3.1.5 成本-效益 与细胞遗传学核型分析不同,QF-PCR 不需要细胞培养,也不需要 FISH 操作时复杂的处理程序及人力的消耗,因此其费用相对较低^[5,13,17,21,23,28]。对我国的国情来说,也是一种可行的方法。

3.2 缺点

3.2.1 只能用于常见染色体异常 QF-PCR 现在所用的 STRs 主要是针对 21、18、13、X、Y 等常见染色体的标记物,因此该方法目前只能用于这五类常见染色体数目异常的检测^[13]。对于其他目前仍没有 STRs 标记物的染色体,现在还无法检测。

3.2.2 对嵌合体的检出还不是很灵敏 QF-PCR 已被证实为可靠的、有效的用于诊断主要的三体征的方法,对于非嵌合体样本没有假阳性和假阴性的结果^[16]。Celia Donaghue 等^[29]通过实验评估了 QF-PCR 对嵌合体的检出效力,并对检出结果与核型分析结果的相关性进行了分析,所得出的结论是当异常细胞占整个样本至少 15%时,QF-PCR 可对其嵌合状态做出诊断。也就是说,QF-PCR 并不能对所有嵌合状态做出诊断,只有异常细胞达到一定比例时,才能做出诊断。

4 QF-PCR 在非整倍体产前诊断中的应用

QF-PCR 在产前诊断中的应用,仍存在一定的争议。尽管所有报道都认为 QF-PCR 是一种经济且快速的诊断技术,但对其准确性却持有不同的观点。一些学者认为,QF-PCR 可作为传统细胞遗传学的一种辅助手段^[9,13,30]。也有学者认为,如果将来胎儿细胞能从母体外周血中分离得到,QF-PCR 可作为产前诊断非整倍体的一种不错的选择^[10],因为 QF-PCR 的应用仅需很小的样本量,有报道最少可用 10 个细胞^[31]。而 Mann 等^[32]却持有不同的观

点,他提倡个体化的产前诊断方案,即产前超声异常或父母染色体异常者,建议核型分析;高龄孕妇或母体血清学筛查阳性者,可只进行 QF-PCR 诊断。近几年,Ogilvie 和 Leung^[33,34]建议用 QF-PCR 取代传统的细胞遗传学核型分析,他们认为该项技术的优点明显大于缺点。

QF-PCR 在非整倍体快速产前诊断中的研究主要在英国等一些欧洲国家^[20,25,35,36],也有一些在亚洲人群中的研究^[22,24,37],而在美国的研究报道则很少^[38]。英国从 2007 年开始已将 QF-PCR 作为非整倍体诊断的一种独立方法,而不再作为核型分析的一种辅助手段。且英国 ACC 也于 2007 年底发布了 QF-PCR 用于非整体产前诊断的实践指南,使其在此领域的应用更加规范化。关于 QF-PCR 在国内非整倍体产前诊断中应用的报道不是很多^[22,37]。由于大部分这方面的研究都以国外人群作为研究对象,且 STR 的遗传多态性在不同人群与不同种族之间的分布具有很大差异性,所以直接将国外研究的 STR 应用于国内人群的灵敏度与特异性还有待考察。中国应用 QF-PCR 于产前诊断领域,目前主要应基于国内人群的 STR 杂合率覆盖的研究,以选取合适的 STR 标记用于国内人群的非整倍体诊断。

经历了近 20 年的发展,QF-PCR 在英国已作为独立检测手段应用于临床。随着此技术在非整倍体产前诊断中的逐渐应用,相应的商品化试剂盒也应运而生。目前用的最广泛的试剂为 ANEUPFAST Multiplex QF-PCR Kit,与 Chromoquant Version 2 kit 相比,该试剂盒的数据采集与结果分析都更加容易。

5 QF-PCR 在非整倍体产前诊断中的展望

QF-PCR 作为快速产前诊断的一种分子生物学方法,给现在的产前诊断带来了巨大的发展前景。但其是否可以取代核型分析,作为一种最具成本-效益的单独测试手段仍存在很大的争议。在将来希望能将其与母血中游离胎儿核酸的非侵入性检测手段结合起来,进行胎儿染色体异常的诊断。相信随着 QF-PCR 方法的不断发展与成熟,QF-PCR 将发挥越来越大的作用。

参 考 文 献

[1] De Vigan C, Baena N, Cariati E, et al. Contribution of

ultrasonographic examination to the prenatal detection of chromosomal abnormalities in 19 centres across Europe[J]. Ann Genet, 2001, 44(4): 209-217.

- [2] Stumm M, Wegner RD, Bloechle M, et al. Interphase M-FISH applications using commercial probes in prenatal and PGD diagnostics[J]. Cytogenet Genome Res, 2006, 114: 296-301.
- [3] Shaffer LG, Bui TH. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis[J]. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2007, 145C(1): 87-98.
- [4] Liehr T, Ziegler M. Rapid prenatal diagnostics in the interphase nucleus: procedure and cut-off rates [J]. J Histochem Cytochem, 2005, 53(3): 289-291.
- [5] Hulten MA, Dhanjal S, Pertl B. Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR [J]. Reproduction, 2003, 126(3): 279-297.
- [6] Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences [J]. Biotechnology, 1992, 10(4): 413-417.
- [7] Mansfield ES. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms [J]. Hum Mol Genet, 1993, 2(1): 43-50.
- [8] Pertl B, Yau SC, Sherlock J, et al. Rapid molecular method for prenatal detection of Down's syndrome [J]. Lancet, 1994, 343(8907): 1197-1198.
- [9] Pertl B, Weitgasser U, Kopp S, et al. Rapid detection of trisomies 21 and 18 and sexing by quantitative fluorescent multiplex PCR [J]. Hum Genet, 1996, 98(1): 55-59.
- [10] Verma L, Macdonald F, Leedham P, et al. Rapid and simple prenatal DNA diagnosis of Down's syndrome [J]. Lancet, 1998, 352(9121): 9-12.
- [11] Toth T, Findlay I, Papp C, et al. Prenatal detection of trisomy 13 from amniotic fluid by quantitative fluorescent polymerase chain reaction [J]. Prenat Diagn, 1998, 18(7): 669-674.
- [12] Sherlock J, Cirigliano V, Petrou M, et al. Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells [J]. Ann Hum Genet, 1998, 62: 9-23.
- [13] Levett LJ, Liddle S, Meredith R. A large-scale evaluation of amnio-PCR for the rapid prenatal diagnosis of fetal trisomy [J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2001, 17(2): 115-118.
- [14] Cirigliano V, Ejarque M, Canadas MP, et al. Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies [J]. Mol Hum Reprod,

- 2001,7(10):1001-1006.
- [15] Yoon HR, Park YS, Kim YK. Rapid prenatal detection of down and edwards syndromes by fluorescent polymerase chain reaction with short tandem repeat markers[J]. Yonsei Med J, 2002, 43(5):557-566.
- [16] Mann K, Donaghue C, Fox SP, et al. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy[J]. Eur J Hum Genet, 2004, 12(11):907-915.
- [17] Cirigliano V, Voglino G, Canadas MP, et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18,000 consecutive clinical samples[J]. Mol Hum Reprod, 2004, 10(11):839-846.
- [18] Ogilvie CM, Donaghue C, Fox SP, et al. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy using quantitative fluorescence-PCR (QF-PCR) [J]. J Histochem Cytochem, 2005, 53(3): 285-288.
- [19] Cirigliano V, Voglino G, Marongiu A, et al. Rapid prenatal diagnosis by QF-PCR: evaluation of 30,000 consecutive clinical samples and future applications[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1075:288-298.
- [20] Cirigliano V, Voglino G, Ordonez E, et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience[J]. Prenat Diagn, 2009, 29(1):40-49.
- [21] Cirigliano V, Canadas P, Plaja A, et al. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies and zygosity in multiple pregnancies by amniocentesis with single insertion of the needle and quantitative fluorescent PCR[J]. Prenat Diagn, 2003, 23(8): 629-633.
- [22] Liao C, Yang X, Li FT, et al. The detection of aneuploidy and maternal contamination by QF-PCR in samples undergoing prenatal diagnosis for thalassemia in Southern China[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009, 144(2): 149-152.
- [23] Rahil H, Solassol J, Philippe C, et al. Rapid detection of common autosomal aneuploidies by quantitative fluorescent PCR on uncultured amniocytes[J]. Eur J Hum Genet, 2002, 10(8):462-466.
- [24] Cho EH, Park BY, Kang YS, et al. Validation of QF-PCR in a Korean population[J]. Prenat Diagn, 2009, 29(3):213-216.
- [25] Putzova M, Pecnova L, Dvorakova L, et al. OmniPlex—a new QF-PCR assay for prenatal diagnosis of common aneuploidies based on evaluation of the heterozygosity of short tandem repeat loci in the Czech population[J]. Prenat Diagn, 2008, 28(13):1214-1220.
- [26] Kagan KO, Chitty LS, Cicero S, et al. Ultrasound findings before amniocentesis in selecting the method of analysing the sample[J]. Prenat Diagn, 2007, 27(1):34-39.
- [27] Baart EB, Martini E, Van Opstal D. Screening for aneuploidies of ten different chromosomes in two rounds of FISH: a short and reliable protocol[J]. Prenat Diagn, 2004, 24(12):955-961.
- [28] Ramsden SC, Mann K, McConnell C, et al. External quality assessment of rapid prenatal detection of numerical chromosomal aberrations using molecular genetic techniques: 3 years experience[J]. Prenat Diagn, 2007, 27(5):404-408.
- [29] Donaghue C, Mann K, Docherty Z, et al. Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal samples by QF-PCR and karyotype analysis[J]. Prenat Diagn, 2005, 25(1): 65-72.
- [30] Bili C, Divane A, Apessos A, et al. Prenatal diagnosis of common aneuploidies using quantitative fluorescent PCR[J]. Prenat Diagn, 2002, 22(5):360-365.
- [31] Tutschek B, Sherlock J, Halder A, et al. Isolation of fetal cells from transcervical samples by micromanipulation: molecular confirmation of their fetal origin and diagnosis of fetal aneuploidy[J]. Prenat Diagn, 1995, 15(10):951-960.
- [32] Mann K, Fox SP, Abbs SJ, et al. Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis[J]. Lancet, 2001, 358(9287): 1057-1061.
- [33] Ogilvie CM. Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future [J]. Pathol Biol (Paris), 2003, 51(3):156-160.
- [34] Leung WC, Lau ET, Lao TT, et al. Rapid aneuploidy screening (FISH or QF-PCR): the changing scene in prenatal diagnosis[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2004, 4(3):333-337.
- [35] Onay H, Ugurlu T, Aykut A, et al. Rapid prenatal diagnosis of common aneuploidies in amniotic fluid using quantitative fluorescent polymerase chain reaction [J]. Gynecol Obstet Invest, 2008, 66(2):104-110.
- [36] Putzova M, Soldatova I, Pecnova L, et al. QF-PCR-based prenatal detection of common aneuploidies in the Czech population: five years of experience[J]. Eur J Med Genet, 2008, 51(3):209-218.
- [37] Sun X, Yan M, Zhang Y, et al. Practical application of fluorescent quantitative PCR on Trisomy 21 in Chinese Han population[J]. Mol Biol Rep, 2006, 33(3):167-173.
- [38] Brown L, Abigania M, Warburton D, et al. Validation of QF-PCR for prenatal aneuploidy screening in the United States[J]. Prenat Diagn, 2006, 26(11):1068-1074.

编辑:宋文颖

(收稿日期:2010-11-19)