

STR 分型检测技术在胎儿性染色体嵌合体检测中的应用

胡听听 胡蓉 张艳霞 袁腾龙 卢健 王继成*

(广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 511400)

【摘要】 目的 探究短串联重复序列(short tandem repeat,STR)检测技术在产前诊断性染色体嵌合体检测中的价值。**方法** 自 2018 年 1 月至 2020 年 5 月在广东省妇幼保健院医学遗传中心,对孕妇具有产前诊断指征的样本进行绒毛穿刺、羊水穿刺或脐血穿刺,进行 STR 检测发现的 34 例性染色体嵌合体,并同时对其应用染色体微阵列分析(chromosome microarray analysis,CMA)检测技术进行进一步检测,对两种方法进行比较,评价检测结果。**结果** 34 例 STR 结果性染色体嵌合体中,主要嵌合体类型为 45,X/46,XX,45,X/46,XY,其中 CMA 也提示为嵌合的比例为 73.53%。**结论** 在产检诊断检测胎儿异常染色体中,STR 检测技术可以为临床遗传咨询提供快速而相对准确的信息和依据,为孕妇提早做抉择准备和心理安慰具有重要作用。

【关键词】 短串联重复序列; 染色体微阵列分析; 性染色体嵌合; 产前诊断

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

Value of STR in prenatal diagnosis of sex chromosome mosaicism

Hu Tingting, Hu Rong, Zhang Yanxia, Yuan Tenglong, Lu Jian, Wang Jicheng*

Medical Genetics Center, Guangdong Women and Children Health Care Hospital, Guangzhou 511440, Guangdong, China

Corresponding author: Yin Aihua, E-mail: jicheng0927@126.com

【Abstract】 Objective To analyze the value of short tandem repeat (STR) in prenatal diagnosis of chromosomal mosaicism. **Methods** 34 cases with sex chromosome mosaicism detected by STR or chromosome microarray analysis (CMA) in Prenatal Diagnosis Center of Guangzhou maternal and Children Health Care Hospital from January 2018 to May 2020 were selected as the study object. Then we compared the two methods of the detection results. **Results** The main sex chromosome mosaicism of the 34 cases were 45,X/46,XX and 45,X/46,XY, and the CMA results of sex chromosome mosaicism were 25(73.53%). **Conclusion** STR is an important test for prenatal diagnosis of chromosomal mosaicism.

【Key words】 Short tandem repeat; Chromosome microarray analysis; Sex chromosome mosaicism; Prenatal diagnosis

短串联重复序列(short tandem repeat,STR)为基因组中由核心序列 2~7bp 重数次到数十次的高度串联重复序列,由于其具有在不同人群不同个体间具有高度多态且高杂合度,并且其检测快捷简

便,使其在临床遗传性疾病检测和法医学等方面具有广泛的应用^[1,2]。性染色体嵌合为产前诊断中常见的一种染色体异常,在患者中典型表现为身体、心理、行为、学习能力、神经认知等方面的异常,生育能力低下或者不育。但是一般情况,大多数的性染色体非整倍体患者具有正常人的生活能力、寿命以及智力^[3]。在产前诊断中,STR 检测技术已经广泛应

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2022.01.005

基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(B2019150)

* 通信作者:王继成, E-mail: jicheng0927@126.com

用于13、18、21和XY性染色体非整倍体的检测,但对于性染色体嵌合的检测报道不多。常规的染色体核型分析检测技术为胎儿性染色体嵌合检测的金标准,但该方法费时费力,给产前遗传咨询带来难度^[4]。本文回顾性分析1164例胎儿染色体检测病例,探讨STR在胎儿性染色体嵌合体检测中的作用,并报道分析如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择2018年1月至2020年5月在广东省妇幼保健院(本院)进行产前诊断,筛选出性染色体异常的病例共计1164例,其中性染色体嵌合的病例有34例,年龄为18~47岁,平均年龄为28.09岁,孕周为13~30周,平均孕周为21.3。其中羊水25例(73.5%),脐血5例(14.7%),绒毛4例(11.8%)。本研究经我院伦理委员会批准通过,并且所有研究对象都签署了知情同意书(广东省妇幼保健院医伦第[202101243]号)。

1.2 检测方法

1.2.1 样品采集 在充分告知患者本实验情况下,进行签订知情同意书,对于羊水穿刺须在超声引导下进行羊水穿刺,穿刺过程中应尽量避免胎盘和隔膜,初始的2ml羊水丢弃后再抽取20ml羊水;对于绒毛穿刺须在超声引导下选择合适的穿刺点和角度进行,将引导套针穿刺入胎盘绒毛边缘,并使用活检针抽取绒毛组织5~10支;对于脐血穿刺应尽量避免胎盘和隔膜抽取胎儿2~4ml脐血。

1.2.2 STR检测 使用德国Macherey-Nagel公司的NucleoSpin Blood提取试剂盒进行羊水、绒毛、脐血DNA提取。定量荧光聚合酶链反应(quantitative fluorescence polymerase chain reaction, QF-PCR)扩增位点选择XY染色体上的8个STR位点,分别为AMEL、DXS1187、DX981、DXS7423、SRY、DYS448、DXYS267、DXYS218、TAF9。扩增体系为12.5 μ l Takara-Premix, 7.5 μ l引物混合液, 3~5 μ l DNA模板(约60ng DNA)。PCR反应为:95 $^{\circ}$ C 5min 变性, 94 $^{\circ}$ C 30s, 58 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min 循环30次, 72 $^{\circ}$ C 10min后保存。PCR产物使用3500XL毛细管电泳仪检测,结果使用GeneMarkerV2分析。

1.2.3 染色体微阵列分析(chromosomal microarray analysis, CMA) 该实验DNA提取试剂盒为德国QIAGEN公司QIAamp DNA Blood Mini Kit提取试剂盒,芯片平台为美国Affymatrix的cyto750K芯片检测平台,实验数据分析结合公共数据库进行联合分析。

1.2.4 STR检测结果性染色体嵌合判断标准 使用GeneScan3.7软件进行结果分析,根据显示的峰图进行结果判断。判断标准(临床生化协会/临床分子遗传协会规定)如下:若STR等位基因出现3个峰,且峰值面积(area rate, AR)接近1:1:1,可判断为三体;若显示2个峰,则计算峰图面积,面积比值 >1.8 或者 <0.65 则判断为三体,双峰面积比值为0.8~1.4则判断为正常;介于两个区间之间的值则需重新检测,若重新检测依然介于两区之间则怀疑为嵌合,需进一步进行检测。若X染色体STR位点检测图谱均呈现单峰,则判断为45,X。

2 结果

2.1 34例样本中绒毛4例,脐血5例,羊水25例,最小孕周13⁺,最大孕周35⁺。34例样本中,产前超声异常的有10例(29.41%),唐氏筛查高风险或临界风险的有6例(17.65%),无创性染色体数目异常的有12例(35.29%),高龄的8例(23.4%),复发性流产的2例(5.88%),不良孕产史2例(5.88%)。(详细结果见附表1)。

2.2 34例STR性染色体嵌合体结果与CMA结果比对后,均为嵌合的为25例(73.53%),性染色体异常的样本有7例(20.59%),CMA正常而STR异常的样本有2例(5.88%)。25例嵌合体样本中,检测结果为45,X/46,XXY有10例(29.41%),45,X/46,XY有6例(17.65%),46,XX/47,XXX有3例(8.82%),46,XY/47,XYY有2例(5.88%),1例45,X/46,XX/47,XXX(2.94%),1例Y染色体嵌合缺失(2.94%),2例X染色体嵌合缺失合并重复(5.88%)。STR检测嵌合体中,CMA检测为性染色体异常的有7例,分别为47,XXY有4例(11.76%),1例45,X(2.94%),1例47,XXXY(2.94%),1例Y染色体异常(2.94%)。CMA检测为阴性而STR

检测提示为嵌合的有 2 例,检测结果分别为 XY 和 XX。详细结果见表 1。

表 1 35 例样本 STR 和 CMA 检测结果

样本	年龄 (岁)	标本类型	孕周 (周)	STR 检测结果	CMA 检测结果(根据人类细胞遗传学国际命名体制)	CMA 结果解释
1	20	脐血	30 ⁺	可能为 X 三体或 X/XX 等类型嵌合体	arr [hg19] Xp22. 33p11. 21 (168, 551-55, 476, 636) × 1 Xp11. 21q28 (55, 754, 932-155, 233, 098) × 3	发现 X 染色体 Xp11. 21-pter 位置发生缺失,片段大小约 55. 3Mb, 涉及 376 个基因; Xp11. 21-qter 位置发生重复, 片段大小约 99. 5Mb, 涉及 630 个基因。由于 X 短臂大部分区域发生缺失, 且涉及 Xp11 卵巢功能关键区域, 因此可能会表现 Turner 综合征部分体征及卵巢功能不良。
2	24	羊水	15 ⁺	可能为 XXY/XY 等类型嵌合体	arr[hg19] Xp11. 1q28 (58, 527, 154-155, 233, 098) × 3	染色体微阵列结果显示: 发现 X 染色体整个长臂发生重复, 片段大小约 96. 7Mb, 涉及 619 个基因。临床可能表现为 klinefelter 综合征相关症状。
3	38	羊水	23 ⁺	可能为 XXY, 但不排除 X/XY 等类型嵌合体	arr(X) × 1, (Y) × 0-1	发现 Y 染色体发生嵌合缺失, 提示为 X/XY 嵌合体。
4	20	脐血	35 ⁺	可能为 X/XX 或 XX/XXX 等类型嵌合体	arr [hg19] Xp22. 33p22. 11 (168, 551-24, 233, 359) × 1 Xp22. 11q21. 31 (24, 245, 004-88, 927, 254) × 1-2 Xq21. 31q28 (88, 944, 543-155, 233, 098) × 2-3	发现 X 染色体发生复杂异常。①在 Xp22. 33-p22. 11 位置发生缺失, 片段大小约 24. 2Mb; ②在 Xp22. 11-q21. 31 位置发生嵌合缺失, 片段大小约 64. 7Mb; ③在 Xq21. 31-q28 位置发生嵌合重复, 片段大小约 66. 3Mb; ④胎儿可能表现为 Turner 综合征部分症状。
5	30	羊水	24 ⁺	XXY	arr(X) × 2, (Y) × 1	发现 X 染色体发生重复, 提示为 XXY。
6	42	羊水	22 ⁺	XXX/XX 嵌合体	arr(X) × 2-3	发现 X 染色体发生嵌合重复(拷贝数为 2. 77), 提示为 X 三体嵌合体。
7	28	羊水	17 ⁺	X 三体	arr(1-22) × 2	未发现明显异常
8	37	羊水	22 ⁺	XXY	arr(X) × 2, (Y) × 1	发现 X 染色体发生重复, 提示为 XXY。
9	26	羊水	27 ⁺	可能为 X/XY 嵌合体	arr(X) × 2, (Y) × 1	发现 X 染色体发生重复, 提示为 XXY。
10	26	羊水	19 ⁺	X/XX 嵌合体	arr [hg19] 16q21q24. 3 (65, 009, 262-90, 155, 062) × 2-3 Xp22. 33q28 (168, 551-155, 233, 098) × 1-2	检测出致病性染色体异常 16 号染色体 16q21-qter 位置发生嵌合重复(嵌合比例约 30%), 片段大小约 25. 2Mb, 涉及 299 个基因; 16q 末端部分三体通常表现为发育迟缓、严重智力障碍、肌张力减退、面部畸形等先天异常。X 染色体发生嵌合缺失, 其中 Xp21. 1-qter 嵌合缺失比例约 60%, Xp21. 1-pter 嵌合缺失比例约 30%; X 染色体嵌合缺失通常表现有“Turner 综合征”症状。
11	29	羊水	23 ⁺	可能为 X/XX 嵌合体	arr(1-22) × 2, (X) × 1-2	发现 X 染色体发生嵌合缺失(X 单体比例约 10%~20%), 提示为 X 单体嵌合体。
12	41	羊水	21 ⁺	X 三体	arr(1-22) × 2, (X) × 2-3	发现 X 染色体发生嵌合重复(嵌合比例约 75%), 提示为 X 三体嵌合体。
13	25	羊水	24 ⁺	可能为 X/XX 嵌合体	arr(1-22) × 2	未发现明显异常
14	32	绒毛	19 ⁺	可能为 X 单体	arr(1-22) × 2, (X) × 1	发现 X 染色体发生缺失, 提示为 X 单体。
15	22	羊水	22 ⁺	可能为 X/XY 等类型嵌合体	arr(1-22) × 2	未发现明显异常
16	20	脐血	28 ⁺	可能为 XYY/XY 嵌合体	arr(X) × 1, (Y) × 1-2	发现 Y 染色体发生嵌合重复(嵌合比例约 50%), 提示为 XYY 嵌合体。
17	31	羊水	21 ⁺	可能为 X/XX 嵌合体	arr(1-22) × 2, (X) × 1-2	发现 X 染色体发生嵌合缺失(嵌合缺失比例约 30%), 提示为 X 单体嵌合体。
18	20	脐血	31 ⁺	Y 染色体 AMEL 位点为阴性, 但 SRY 基因阳性, 提示可能存在性染色体异常	arr[hg19] (X) x2 Yp11. 2 (7, 251, 143-9, 526, 559) × 1 Yp11. 31p11. 2 (2, 650, 424-6, 172, 383) × 1	胎儿有 2 条 X 染色体, 但发现 Y 染色体短臂大部分区域有留存, 且留存区域包含了男性性别决定因子(SRY 基因), 提示胎儿可能表型为 Klinefelter 综合征。
19	29	羊水	20 ⁺	可能为 X/XX 或 XXX/XX 等类型嵌合体	arr(1-22) × 2, (X) × 1-2	发现 X 染色体发生嵌合缺失(比例约 10%~20%), 提示为 X 单体嵌合体。
20	30	羊水	22 ⁺	可能为 XXXY	arr(X) × 3, (Y) × 1	发现 X 染色体发生重复, 提示为 XXXY。
21	38	羊水	19 ⁺	性染色体 STRs 比值虽在正常范围内, 但偏向切值, 不能排除嵌合可能	arr(X) × 1, (Y) × 0-1	发现 Y 染色体发生嵌合缺失(缺失比例约 20%), 提示可能为 X/XY 嵌合体。

续表

样本	年龄 (岁)	标本 类型	孕周 (周)	STR 检测结果	CMA 检测结果(根据人类 细胞遗传学国际命名体制)	CMA 结果解释
22	32	羊水	19 ⁺	性染色体嵌合,可能为 X/XX 嵌合体	arr(1-22)×2	未发现明显异常。
23	19	绒毛	14 ⁺	可能为 X/XY 嵌合体	arr[hg19] Yp11.31p11.2(2,650,424-8,757,836)×0-1	发现 Y 染色体 Yp11.31-p11.2 位置发生嵌合缺失(嵌合缺失比例约 50%),片段大小约 6.1Mb,涉及 31 个基因,包含 SRY 等 8 个 OMIM 基因。Y 染色体结构异常与外生殖器异常、不育等异常有关。
24	47	羊水	14 ⁺	可能为 XXX/XX 等类型嵌合体	arr(X)×2-3	发现 X 染色体发生嵌合重复(嵌合比例 58%),提示为 X 三体嵌合体。
25		脐血	31 ⁺	可能为 X/XX 或 XXX/XX 等类型嵌合体	arr(1-22)×2,(X)×1-2	发现 X 染色体发生嵌合缺失(缺失比例约 23%),提示为 X 单体嵌合体。
26	29	绒毛	16 ⁺	可能为 X/XX 嵌合体	arr(1-22)×2,(X)×1	发现 X 染色体发生缺失,提示为 X 单体。
27	18	羊水	21 ⁺	可能为 X/XX 嵌合体	arr(1-22)×2,(X)×1-2	发现 X 染色体发生嵌合缺失(缺失比例约 40%),提示为 X 单体嵌合体。
28	35	羊水	19 ⁺	可能为 X/XX 嵌合体	arr(1-22)×2,(X)×1-2	发现 X 染色体发生嵌合性缺失(比例约 54%),提示为 X 单体嵌合体。
29	27	羊水	22 ⁺	可能为 X/XY 嵌合体	arr[hg19] 15q24.1q24.2(72,969,435-75,543,359)×3(X)×2,(Y)×1	发现 2 处染色体异常。①在染色体 15q24.1-q24.2 位置发生重复,片段大小约 2.6Mb,包含 50 个基因;该 CNV 与已知微重复综合征区域不重叠,普通人群 DGV 数据库未见类似重复,现有数据不能明确该 CNV 是否致病;②发现 X 染色体发生重复,提示为 XXY。
30	25	羊水	17 ⁺	可能为 XYY/XY 嵌合体	arr(X)×1,(Y)×1-2	发现 Y 染色体发生嵌合重复(比例约 70%),提示为 XYY/XY 嵌合体。
31	26	羊水	17 ⁺	可能为 X/XY 嵌合体	arr(X)×1,(Y)×0-1	发现 Y 染色体发生嵌合性缺失(缺失比例约 25%),提示为 X/XY 嵌合体。
32	36	羊水	19 ⁺	可能为 X 三体	arr(1-22)×2,(X)×1-2	发现 X 染色体发生嵌合性缺失(嵌合比例约 50%),提示为 X 单体嵌合体。
33	27	绒毛	13 ⁺	可能为 XYY/XY 嵌合体	arr(1-22)×2	未发现明显异常。
34	26	羊水	18 ⁺	可能为 X/XX 嵌合体	arr(Xp)×1,(Xq)×1-2	发现 X 染色体整个短臂(Xp)发生杂合缺失(拷贝数为 1),X 染色体整个长臂(Xq)发生嵌合性缺失(拷贝数为 1.5),此种异常患者通常表现为“Turner 综合征”症状。

3 讨论

产前诊断中具有严重表型的主要染色体疾病为 13、18、21-三体综合征,大约占 89%^[5],随着技术的发展,为了缓解孕妇的紧张情绪和拥有更多选择时间,需要一种快速而准确的方法应用到产前诊断。QF-PCR(quantitative fluorescence polymerase, QF-PCR)的出现缓解了临床需求,现今广泛应用于临床检测 13、18、21 和性染色体非整倍体^[6]。但是对于性染色体嵌合的诊断由于缺少准确、便捷的方法导致检出率不高。

性染色体嵌合由于往往不影响患者生存,往往在临床中被忽视,导致在人群中发生率较高,有研究发现 X 染色体嵌合在女性人群中发生率大概是常

染色体的 4 倍(0~0.25%)^[7]。本实验中 STR 检测技术和 CMA 检测技术均为嵌合的有 25 例,阳性预测值 PPV 为 73.53%(25/34),Dorte 等^[8]的研究表明 QF-PCR 检测非整倍体具有快速、可靠性高,但对于性染色体嵌合其阳性预测值为 44%。Lildballe 等^[8]的研究研究与本研究的阳性预测值有差异,但该研究性染色体嵌合样本只有 9 例,而本研究样本更为丰富,具有更强的说服力。有 2 例 STR 检测为嵌合而 CMA 检测为正常,可能是 STR 位点的引物区的多态性而出现等位基因全部或部分丢失^[9]。由于 STR 检测技术只选取染色体特定部分 STR 位点,而无法检测到性染色体其他部分缺失或重复^[1],CMA 技术主要功能是检测微缺失或微重复^[10]。STR 检测技术在检测染色体嵌合或其他异常中具

有较高的可靠性,这可能与 STR 检测技术通过设计染色体上多个不同的 STR 特异性位点而检测染色体数目异常,又通过 PCR 扩增,更进一步扩大了染色体异常比例。同时 STR 检测技术也存在诸多缺陷,比如无法检测染色体平衡易位、无法检测出少于 30% 母体污染的样本等。

4 结论

综上所述,性染色体嵌合的患者在精神、身体、行为、生育等方面会收到较大影响,并且随着嵌合比例的增加,其症状会加重,给家庭带来沉重负担,而使用 STR 检测技术能够及时而准确的获取检测结果,可以给孕妇带来宝贵的时间进行选择,极大地缓解孕妇的精神压力,对后续的产前检查也可以做出重要指导。但 STR 技术的本身技术缺陷使其需要联合其他方法(核型分析技术、CMA 检测技术等)综合判断,给孕妇提供更准确可靠的结果^[11]。故 STR 检测方法在产前诊断胎儿性染色体嵌合体中具有重要价值。

参 考 文 献

[1] MANN K, PETEK E, PERTL B. Prenatal detection of chromosome aneuploidy by quantitative fluorescence PCR[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1885: 139-160.

[2] GYMREK M. A genomic view of short tandem repeats[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2017, 44:9-16.

[3] LINDEN MG, BENDER BG, ROBINSON A. Genetic counseling for sex chromosome abnormalities[J]. *Am J Med Genet*, 2002, 110(1): 3-10.

[4] 李星,李显笋,许玲,等. 产前诊断中胎儿性染色体嵌合体的发生率及其妊娠结局[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2018, 37(4): 292-296.

[5] LEWIN P, KLEINFINGER P, BAZIN A, et al. Defining the efficiency of fluorescence in situ hybridization on uncultured amniocytes on a retrospective cohort of 27407 prenatal diagnoses[J]. *Prenat Diagn*, 2000, 20: 1-6.

[6] 徐爱群,边旭明,刘俊涛,等. 多重荧光定量 PCR 方法的建立及其在快速产前诊断中的应用[J]. *中华妇产科杂志*, 2010, 45(7): 481-487.

[7] MACHIELA MJ, ZHOU W, KARLINS E, et al. Female chromosome X mosaicism is age-related and preferentially affects the inactivated X chromosome[J]. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 11843.

[8] LILDBALLE DL, VOGEL I, PETERSEN OB, et al. Diagnostic performance of quantitative fluorescence PCR analysis in high-risk pregnancies after combined first-trimester screening[J]. *Dan Med J*, 2014, 61: A4964.

[9] ANDREW S, WHITESIDE D, BUZIN C, et al. An intronic polymorphism of the hMLH1 gene contributes toward incomplete genetic testing for HNPCC [J]. *Genet Test*, 2002, 6: 319-322.

[10] WAPNER RJ, MARTIN CL, LEVY B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(23):2175-2184.

[11] Liu Y, Guo L, Chen H, et al. Discrepancy of QF-PCR, CMA and karyotyping on a de novo case of mosaic isodentric Y chromosomes[J]. *Mol Cytogenet*, 2019, 12:1.

(收稿日期:2021-10-19)

编辑:宋文颖