

分子细胞遗传学技术应用于产前诊断的新进展

刘晗* 综述 李东至 审校

(广州市妇女儿童医疗中心, 广东 广州 510180)

【摘要】 在过去的 10 年中, 临床细胞遗传学有了显著的进步, 分子生物技术被应用到了常规染色体分析。这些新技术的应用解决了传统核型显带分析在准确诊断和解释某些染色体的技术上的缺陷, 这些新技术包了荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH)、多色荧光原位杂交 (Multicolor-fluorescence in situ hybridization, M-FISH)、光谱核型分析 (Spectral karyotyping, SKY)、比较基因组杂交 (comparative genomic hybridization, CGH) 和微阵列基因组杂交 (array comparative genomic hybridization, aCGH)。每 1 种技术都有特定的检测范围与限制。本文对这些技术的特点及它们的在产前诊断的应用综述。

【关键词】 产前诊断; FISH; SKY; CGH; aCGH

细胞遗传学是产前诊断中的一个重要组成学科, 也是研究胎儿畸形、死亡及婴儿出生缺陷原因的一种重要手段。根据研究指标和孕周可以选择抽取羊水、绒毛 (chorionic villus, CV) 或是胎血等胎儿细胞用于细胞培养和染色体核型分析。羊水的核型分析准确性可以达到 99.4%~99.8%, 绒毛约为 97.5%~99.6%。虽然传统的细胞遗传学技术可以准确地诊断各种染色体数目和结构异常, 但是却存在一定的缺点。一是精确度较差, 这种方法不能可靠地检测超过 5 万~10 万个碱基对 (Mb) 或更小的基因组片段的缺失、重复或重排, 也不能明确标记染色体的来源和端粒附近的细微重排^[1,2]; 二是核型分析的周期长, 主要是由分析前细胞培养所需要 10~14 天的时间所决定的。为了有效克服上述缺点, 学者们把分子生物学技术运用于细胞遗传学中, 使分子细胞遗传学技术得以兴起并较快地发展起来。本文对目前的分子细胞遗传学技术进行综述。

1 FISH

荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization,

FISH) 技术是细胞遗传学和分子技术的结合, 它能确定特定 DNA 序列在染色体中的位置, 杂交的基本原理是 DNA 双螺旋之间的碱基互补。FISH 技术有 3 个重要组成部分: 探针、荧光和目标片段。同时有 3 个基本步骤: 探针的制备、目标片段的准备和原位杂交。探针是 DNA、RNA 序列或 1 组在基因组中已知的序列, 在一定的条件下特异性地与染色体上互补片段结合, 未结合的探针将在随后的洗涤步骤中被冲走, 结合的探针最后在荧光显微镜下分析。

有若干种类的探针可以用来检测染色体重排和非整倍体, 例如, 着丝粒特异性的重复序列探针被用于产前诊断, 检测常见的 18、X 和 Y 非整倍体^[8]。这些探针也经常被用来确定标记染色体起源^[9]。全染色体涂抹探针可以用于检测中期核上的重排^[10]; 位点特异性探针, 可在发现异常超声结果的基础上帮助诊断已知特定的缺失综合征 (如心脏缺陷和 DiGeorge 综合征的 FISH 探针), 或用于那些没有着丝粒特异性重复序列探针的染色体 (例如染色体 13 和 21)。FISH 打破了常规细胞遗传学分析的诸多限制, 提供了常见非整倍体间期快速核型分析平台^[3], 还可应用于异常染色体核型但需要进一步分子水平鉴定 (例如标志染色体)。研究证明它是一种可行的诊断方法^[4-6]。FISH 已成为产前诊断中从

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划课题 (NO: 2006BAI05A05); 卫生部课题 (NO: WKJ2007-3-001)

* 通讯作者: 刘晗, Email: hanliu1983@hotmail.com

细胞遗传学角度全面分析染色体结构异常和标记染色体来源不可或缺的一部分^[7]。多色荧光原位杂交(Multicolor-fluorescence in situ hybridization, M-FISH)是一种染色体涂染技术。它将24种标记不同的人体染色体涂染探针同中期核细胞杂交,可以同时鉴别22对常染色体和2种性染色体,在一个中期核中每一种染色体的颜色都不同。这24种可以为人眼识别的伪色彩是由一套滤镜和计算机软件分配的。因而,M-FISH不需要额外的成像系统,它已普遍用于标记染色体、衍生染色体的来源定性,并能检测微小平衡易位和复杂的染色体重排^[11]。

但是,应用FISH技术通常要求患者有定义明确的综合征的临床表现并且是一种已知的染色体病。这是因为单个FISH探针只能检测特定片段的重复,丢失或重排,而不提供余下基因组的其他信息。因此,着丝粒重复探针可能显示一个标记染色体的染色体来源,但不能界定标记染色体上常染色体区域。同样的,端粒探针可鉴定一个不平衡的移位,但是不能用单独的FISH方法分析染色质丢失或重复的量。

2 SKY

光谱核型分析(Spectral karyotyping, SKY)是指以不同颜色显示所有人类染色体的光谱成像技术。操作对24条特定染色体涂染探针同时杂交,每1个探针用1个或多个荧光素标记,可以单独或组合应用。与基于滤镜的技术不同,光谱成像生成1个干涉图,图像中每一种特定荧光或荧光组合都有特定像素,允许在单次曝光的情况下衡量整个图像的发射光谱^[12]。在光谱启动后将杂交的中期染色体通过傅里叶分光镜、CCD影像与光学显微镜捕获并衡量所有染料强度,按照光谱的分类算法推出将特定颜色(虚假颜色)分配给所有染色体,然后通过计算机影像软件分析,不同的染色体显示一种不同的虚假颜色,据此进行核型分析^[13]。SKY自从在1996年首次被Seh rock发明以来,现在它已广泛应用在产前诊断、生殖医学、癌症研究等领域。SKY技术使荧光原位杂交技术在异常染色体核型筛查的应用成为可能。SKY特点在于它使用

光谱干涉仪检测染色体信号,信号比M-FISH高(9~10倍),因而它的检测准确性高于M-FISH。同时SKY检测整个光谱,可以检测到肉眼不能区分的包含在低光的颜色信息,也可以提高染色体突变识别的准确性。SKY技术既可以筛选染色体异常,也具有FISH技术高灵敏度和高度特异性的特点,可以同时识别所有24染色体,并且鉴定长度在1~2 Mb的异常片段^[14]。此外,它还可以判断标记染色体和不平衡易位染色体片段的来源、染色体复杂易位,以及微小的染色体畸变等等。

但是,M-FISH和SKY的探针都是由5种荧光团不同组合标记。如同全染色体涂染探针标记,高重复的DNA序列会被过多的非标记互补DNA抑制。因而,富含重复DNA序列的染色体区域,如异染色质区域和近端着丝粒染色体短臂区域都不能被这两种方法涂染。染色体内小的缺失、重复或插入都可能由于这种方法的限制性被漏诊^[13]。

3 CGH

比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH)可以全面的分析整个基因组。它能快速检测正常与异常基因组DNA序列拷贝数的不同。CGH具有明显的优势,因为它是全基因组范围的检测,并没有优先考虑问题染色体的畸变。因为DNA拷贝数变化是癌症发病的重要病因,CGH大多应用于癌症研究,然而CGH的潜力不局限于此。在临床遗传学,CGH也成为常规细胞遗传学诊断不平衡染色体重排的辅助手段,并且应用越来越多^[15]。CGH所需的DNA通常来自于一个已知的正常个体和一个未知染色体核型或已知异常染色体核型但需要进一步确诊的个体。这2种DNA样本分别标记2种不同的荧光素,它们同时与一个来自正常核型个体的中期核染色体杂交,在染色体一定位置荧光强度的不同显示了基因组中片段的重复或丢失。CGH与M-FISH相比的优势是它不只找出未知染色体的来源,还能绘制出来源染色体的特定区带。M-FISH或SKY也可以识别标记染色体,它们对染色体畸变得诊断极有价值,但安装和维护附带设备需要耗费大量的财力和物力。因此,

CGH 最大优点是它只需要从患者和一个正常对照提取所需的 DNA,用于全基因组范围筛查的一次杂交,而不是用于杂交的一整组 24 条染色体涂染探针。此技术与传统的细胞遗传学有相同的局限性,主要是由于分析的基底是中期核细胞。因此,如同传统的细胞遗传学技术,CGH 检测的分辨率不高,分辨率是 5~10 Mb^[16,17]。

4 array CGH

微阵列基因组杂交(array comparative genomic hybridization, aCGH)是一种高分辨率、检测全基因组范围染色体特定拷贝数不平衡改变的方法。它的原理与 CGH 技术相似,但其最大的特点是将基因芯片替代了中期核染色体。以前的 CGH 技术受阻于中期核染色体上,并且最大分辨率为 5~10 Mb,而 array CGH 技术的分辨率只受插入克隆的片段大小和其之间的距离限制。微阵列能使用各种大小的目标片段,从寡核苷酸(25~85 bp)^[18,19]到细菌人工染色体(BAC, 80~200kb)^[20]。array CGH 能够检测到基因组内任何 DNA 剂量不平衡改变,包括非整倍体、微小缺失和复制。array CGH 能把成百上千个分散的位点整合在一张可以同时分析的微阵列上,它明显优于常规的细胞核型分析和 FISH 技术。大多数的临床可用的 aCGH 芯片都是靶向微阵列芯片,即经过设计用来特异性检测非整倍体,已知的微缺失或是微复制综合征和亚端粒或是其他非平衡性染色体重排。

现在已经普遍认为靶向微阵列芯片有显著的优势,因为它覆盖了已知有临床意义的染色体特定区域。一个好的靶向芯片应在检测有临床意义染色体非平衡改变有最高的敏感性,同时尽量减少发现需要 FISH 等试验验证的拷贝数变异(copy number variants, CNVs)。虽然现在的诊断方法还在不断更新,但是可以预计微阵列芯片将成为确定染色体异常首要的诊断方法,因为它对于怀疑有细胞遗传学上不平衡改变的患者有非常高的染色体异常检出率^[21]。与此同时 aCGH 也更容易检出镶嵌体,因为 DNA 将从送来的外周血或组织样本提出,不会存在培养可能导致的突变^[22]。

目前的研究显示基因组中拷贝数的复制或丢失数量巨大并且十分常见。这些 CNVs 中的一部分被认为是无临床意义的,因为在表型正常和异常的个体中它们平均分布。而剩下的则被认为是有益的,尤其在异常表型的个体中发现了一个新的改变,但只有发现更多有相同改变的病例并且有确定的特点,才能确定它们之间的关联。基于基因组微阵列的高分辨率,越来越多的 CNVs 将被发现,但是在诊断的模式中,这可能导致问题,因为不易分辨这些 CNVs 是单纯多态性还是致病性的^[23]。相对于全基因组 aCGH,靶向微阵列芯片仅仅应用了已知染色体重排区域的克隆。这类芯片更常用于出生缺陷、精神发育迟缓或智能发育障碍、疑为染色体异常患儿临床诊断^[22,23]。因而在我们更清楚地认识人类基因组 CNVs 前,在临床产前诊断中应用产前诊断靶向微阵列芯片是更可取的。

aCGH 也有其技术的限制性。aCGH 不能发现平衡性染色体改变,如易位和倒位等。这项技术是只能检测同一个样本中相对于其他 DNA 区域拷贝数的不平衡改变,所以 aCGH 无法检测多倍体。此外,覆盖整个基因组的高分辨率芯片更加昂贵,更有可能检测到不清楚临床意义的基因组非平衡改变。预算有限的小实验室不能承担微阵列实验中需要用到的许多仪器(如:杂交仪,自动图像分析)费用。此外,采购插入克隆扫描的 FISH 映射也非常昂贵。然而,这些障碍并不能阻挡其应用。aCGH 能提供其他分子细胞遗传学技术所不能达到的全面检测染色体畸变的分辨率,可以预期 aCGH 会在不久的将来成为常规分子细胞遗传学技术。

5 展望

分子细胞遗传学技术的发展给胎儿染色体异常检测提供了更多的方法。aCGH 能提供前所未有的分辨率,但它同时也引起了有关解释和区分病理和良性拷贝数改变的争议。如同认识普通人群的倒位或是近端着丝粒断臂的变异一样,更深入地了解人类基因组时, CNVs 的困扰也将会消失。在产前诊断的应用中,新技术可能会检测到一些额外的信息,如成人患的疾病,这是今后医学伦理学需要探讨的问题。

题。毫无疑问,这些新的技术将大大有助于发现胎儿畸形和死亡的染色体病因,花费时间更少并且有更高的分辨率。然而,在这些新技术成熟发展成为某种形式的标准常规之前,它们还只能被认为是传统核型分析的辅助方法。

参考文献

- [1] Flint J, Knight S. The use of telomereprobes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation[J]. *Curr Opin Genet*, 2003, 13:310-316.
- [2] Knight SJ, Flint J. The use of subtelomeric probes to study mental retardation[J]. *Methods Cell Biol*, 2004, 75:799-831.
- [3] Pettenati MJ, Von Kap-Herr C, Jackle B, et al. Rapid interphase analysis for prenatal diagnosis of translocation carriers using subtelomeric probes[J]. *Prenat Diagn*, 2002, 22:193-197.
- [4] Locatelli A, Mariani S, Ciriello E, et al. Role of FISH on uncultured amniocytes for the diagnosis of aneuploidies in the presence of fetal anomalies[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2005, 20: 1-4.
- [5] Luquet I, Mugneret F, Athis PD, et al. French multi-centric study of 2000 amniotic fluid interphase FISH analyses from high-risk pregnancies and review of the literature[J]. *Ann Genet*, 2002, 45:77-88.
- [6] Wyandt HE, Tonk VS, Huang XL, et al. Correlation of abnormal rapid FISH and chromosome results from amniocytes for prenatal diagnosis[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2006, 21:235-240.
- [7] Liehr T, Claussen U, Starke H. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2004, 107:55-67.
- [8] Lim HJ, Kim YJ, Yang JH, et al. Amniotic fluid interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of aneuploidy: experiences in 130 prenatal cases[J]. *J Korean Med Sci*, 2002, 17:589-592.
- [9] Daniel A, Malafiej P, Preece K, et al. Identification of marker chromosomes in thirteen patients using FISH probing [J]. *Am J Med Genet*, 1994, 53:8-18.
- [10] Spikes AS, Hegmann K, Smith JL, et al. Use of fluorescence in situ hybridization to clarify a complex chromosomal rearrangement in a child with multiple congenital anomalies[J]. *Am J Med Genet*, 1995, 57:31-34.
- [11] Jalal SM, Law ME, Sramberg J, et al. Detection of diagnostically critical, often hidden, anomalies in complex karyotypes of haematological disorders using multicolor fluorescence in situ hybridization [J]. *Br J Haematol*, 2001, 112:975-980.
- [12] Garini Y, Macville M, Manoir S du, et al. Spectral karyotyping[J]. *Bioimaging*, 1996, 4:65-72.
- [13] Fan YS, Siu VM, Jung JH, et al. Sensitivity of multiple color spectral karyotyping in detecting small interchromosomal rearrangements[J]. *Genet Test*, 2000, 1:9-14.
- [14] Belaud Rotureau MA, Elghezal H, Bemardin C. Spectral karyotyping(SKY) principle, advantages and limitations[J]. *Ann Biol Clin*, 2003, 61:139-146.
- [15] Levy B, Dunn TM, Kaffe S, et al. Clinical applications of comparative genomic hybridization[J]. *Genet Med*, 1998, 1: 4-12.
- [16] Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics[J]. *J Med Genet*, 2001, 38:740-744.
- [17] Lichter P, Joos S, Bentz M, et al. Comparative genomic hybridization: Uses and limitations [J]. *Semin Hematol*, 2000, 37:348
- [18] Lucito R, Healy J, Alexander J, et al. Representational oligo nucleotide microarray analysis: A high-resolution method to detect genome copy number variation [J]. *Genome Res*, 2003, 13:2291-2305.
- [19] Ylstra B, van den Ijssel P, Carvalho B, et al. BAC to the future or oligo nucleotides: A perspective for microarray comparative genomic hybridization(array CGH) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34:445-450.
- [20] Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC, et al. Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: Is less more[J]? *Am J Med Genet Part A*, 2005, 134A:259-267.
- [21] Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R, et al. Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases[J]. *J Pediatr*, 2006, 149:98-102.
- [22] Shaffer LG, Bejjani BA. Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2006, 115:303-309
- [23] Friedman JM, Baross A, Delaney AD, et al. Oligo nucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation[J]. *Am J Hum Genet*, 2006, 79:500-513.

编辑:赵欣之

(收稿日期:2010-04-02)