

细菌人工染色体微球技术对微缺失/微重复综合症的产前诊断

李一平, 任华

西安市大兴医院妇产科, 陕西 西安 710016

【摘要】 目的 评价细菌人工染色体微球技术(BoBs)在微缺失/微重复综合症产前诊断中的应用价值。方法 对西安市大兴医院 2017 年 3 月至 2019 年 2 月 1 549 例有产前诊断指征的孕妇羊水细胞行染色体核型分析和 BoBs 检测,如遇微缺失/微重复综合症,采用荧光原位杂交技术(FISH)和染色体微阵列分析(CMA)进行确认。结果 1 549 份羊水中 BoBs 共检出微缺失/微重复 8 例,检出率为 0.52%,其中 Xq27.3 缺失综合征 1 例,7q11.2 重复综合征 1 例,Xp22.31 缺失综合征 2 例,18p11.32p11.21 重复综合征 1 例,8q23.3 缺失综合征 1 例,4p16.3 重复综合征 1 例,22q11.2 缺失综合征 1 例。BoBs 结果与 FISH、CMA 验证结果完全一致。染色体核型分析仅检出 3 例,联合 BoBs 技术扩大了 0.32% 的检出率。结论 BoBs 技术能够快速提示染色体微缺失/微重复,可作为染色体核型分析的有力补充,大大提高产前诊断的效率及准确性,适合在临床上广泛应用。

【关键词】 细菌人工染色体微球技术;微缺失;微重复;产前诊断;染色体核型分析

【中图分类号】 R714.75 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2020)02-0221-03

Application of BoBs™ assay in prenatal diagnosis of microdeletion/microduplication syndromes. LI Yi-ping, REN Hua. Department of Obstetrics and Gynecology, Xi'an Daxing Hospital, Xi'an 710016, Shaanxi, CHINA

【Abstract】 Objective To evaluate the application value of BACs-on-beads™ (BoBs™) assay in prenatal diagnosis of microdeletion/microduplication syndromes. **Methods** Chromosomal karyotyping and BoBs™ assay were used for detecting 1 549 cases of amniotic fluid cells with indications for prenatal diagnosis, which were collected from March 2017 to February 2019 in Xi'an Daxing Hospital. Fluorescence in situ hybridization (FISH) or chromosomal microarray analysis (CMA) were used for further validation for microdeletion/microduplication syndromes. **Results** Eight microdeletion/microduplication syndromes were detected by BoBs™ with a detection rate of 0.52%, including 1 case of Xq27.3 microdeletion, 1 case of 7q11.2 microduplication, 2 cases of Xp22.31 microdeletion, 1 case of 18p11.32p11.21 microduplication, 1 case of 8q23.3 microdeletion, 1 case of 4p16.3 microduplication and 1 case of 22q11.2 microdeletion. High concordance was obtained between BoBs™ and FISH or CMA. Meanwhile, only 3 cases were identified by chromosomal karyotyping, allowing an additional diagnostic yield of 0.32% for microdeletion/microduplication syndromes by BoBs™. **Conclusion** BoBs™ assay can rapidly detect chromosomal microdeletions/microduplications, which can be an effective complementary of karyotyping to improve the efficiency and accuracy of prenatal diagnosis, and is suitable for wide application in clinic.

【Key words】 BACs-on-beads™ (BoBs™); Microdeletions; Microduplications; Prenatal diagnosis; Chromosomal karyotyping

出生缺陷已成为影响儿童健康和出生人口素质的重大公共卫生问题,其中染色体疾病是婴幼儿出生缺陷的重要原因。传统的染色体核型分析是染色体疾病诊断的“金标准”^[1],可准确检测胎儿染色体数目异常及倒位、易位等结构异常,但该技术培养周期长、操作要求高、易失败,对 5Mb 以下的染色体缺失/

重复无法正确检出。事实上,这些缺失/重复往往会导致复杂的临床表现,如生长发育异常、智力迟缓、特殊面容、内脏器官畸形、内分泌异常、精神行为改变等^[2,3]。微缺失/微重复综合症出生后诊断相对容易,但几乎没有有效的治疗方法。因此,产前诊断的临床意义重大。细菌人工染色体微球技术(bacterial

通讯作者:任华,E-mail:819032118@qq.com

[11] 周映,王森法,叶美婷,等.青年型颈椎病的X线、CT及MR的临床诊断分析[J].中国妇幼健康研究,2017,28(4):372-376.

[12] WENG C, WANG J, TUCHMAN A, et al. Influence of T1 slope on the cervical sagittal balance in degenerative cervical spine: an analysis using kinematic MRI [J]. Spine, 2015, 41(3): 185-190.

[13] CODESIDO MA, WEIL Y, LIEBERGALL M, et al. Femoral neck pseudoarthrosis in a polio patient treated with closed reduction and cell therapy [J]. Trauma Case Reports, 2017, 8(5): 36-40.

[14] 李晓会,靳囡,晋瑞,等.颈椎病的X线平片CT及MRI诊断和临床

应用效果分析[J].河北医学,2018,11(9):1537-1540.

[15] ZAREI A, HULLEY PA, SABOKBAR A, et al. Co-expression of DKK-1 and sclerostin in subchondral bone of the proximal femoral heads from osteoarthritic hips [J]. Calcif Tissue Int, 2017, 100(6): 609-618.

[16] 欧阳林,钱学江,汤奕林,等.退行性颈椎不稳运动降低椎动脉与小脑灌注血流动力的多模态MRI初期研究[J].中国骨与关节损伤杂志,2018,5(3):240-243.

(收稿日期:2019-05-20)

artificial chromosomes-on-beads, BoBs)无需细胞培养、高通量,能够快速检测5种常见的染色体非整倍体(13、18、21、X和Y染色体)异常及9种微缺失综合征(Wolf-Hirschhorn综合征、Cri du Chat综合征、Williams-Beuren综合征、Langer-Giedion综合征、Prader-Willi综合征、Angelman综合征、Miller-Dieker综合征、Smith-Magenis综合征及DiGeorge综合征),提供了更丰富的信息,提高了产前诊断效率。本文对1 549份羊水进行BoBs快速检测,探讨其在微缺失/微重复综合征检测中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2017年3月至2019年2月在西安市大兴医院因具有产前诊断指征行羊水穿刺的孕妇1 549例,平均年龄(30.06±5.02)岁,平均孕周(21.90±3.90)周。孕妇的产前诊断指征包括:高龄(≥35岁);超声异常;无创产前检测高风险;血清学筛查高风险;不良孕产史;其他(家族遗传病史、夫妻一方染色体异常等)。所有孕妇均签署产前诊断知情同意书,行染色体核型分析及BoBs检测,如遇微缺失/微重复综合征,样本增加荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)或染色体微阵列分析(chromosome microarray analysis, CMA)检测。

1.2 方法

1.2.1 羊膜腔穿刺 常规超声引导下羊膜腔穿刺术抽取羊水30 mL,15 mL用于细胞培养,10 mL用于DNA提取,5 mL用于FISH检测。

1.2.2 染色体核型分析 15 mL羊水按照常规方式进行细胞培养、收获、制片、G显带,每例样本计数30个分裂相,分析3~5个核型。发现染色体异常或多态性变异时,计数50个分裂相并适当增加分析的核型数。

1.2.3 BoBs检测 10 mL羊水2 000 r/min离心10 min,弃上清,利用QIAamp® DNA Blood Mini Kit(德国Qiagen公司)提取基因组DNA。按照Prenatal BACs-on-Beads™试剂盒(美国Perkin Elmer公司)说明书对DNA进行标记、纯化、与BoBs探针杂交过夜及报告分子链霉亲合素-藻红蛋白结合,洗涤后Luminex®200™读取信号强度,BoBsoft®2.0软件进行结果分析。

1.2.4 CMA检测 样本DNA利用Affymetrix公司CytoScan 750K芯片检测基因组DNA拷贝数变化、单亲二倍体及杂合性缺失等,Chromosome Analysis Suite(ChAS)软件进行结果判读。

1.2.5 FISH检测 5 mL羊水行细胞处理、玻片处理、变性杂交、洗片、复染后于荧光显微镜下观察。每例样本随机计数至少50个细胞,如果无法判读则扩大计数。FISH探针及试剂盒由北京金菩嘉医疗科技有限公司提供。

2 结果

2.1 BoBs技术对微缺失/微重复综合征的检出情

况 1 549份羊水中BoBs共检出微缺失/微重复综合征8例,检出率为0.52%。其中Xq27.3缺失综合征1例,7q11.2重复综合征1例,Xp22.31缺失综合征2例,18p11.32p11.21重复综合征1例,8q23.3缺失综合征1例,4p16.3重复综合征1例,22q11.2缺失综合征1例,见图1。22q11.2缺失综合征进行FISH验证,其余综合征CMA进行验证,结果均与BoBs一致。

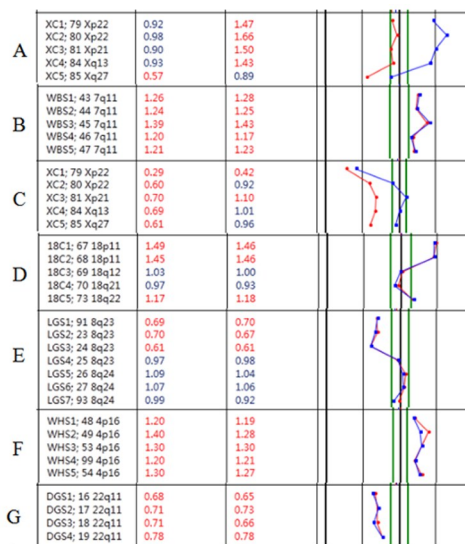


图1 BoBs检测的微缺失/微重复综合征

注:A,Xq27.3缺失综合征;B,7q11.2重复综合征;C,Xp22.31缺失综合征;D,18p11.32p11.21重复综合征;E,8q23.3缺失综合征;F,4p16.3重复综合征;G,22q11.2缺失综合征

2.2 染色体核型分析对微缺失/微重复综合征的检出情况 染色体核型分析只检出缺失/重复3例,其中缺失/重复区域均在10 Mb左右,见表1。病例1:孕妇因血清学21三体筛查高风险行羊水穿刺,核型结果为46,XX,del(X)(q27.3_q28),BoBs结果显示46XX,Xq27.3缺失,CMA结果发现Xq27.2q28(140 508 944_155 233 098)区域出现14.7Mb缺失;病例4:染色体核型分析发现标记染色体存在,不确定其来源,BoBs结果显示46XX,18p11.32p11.21重复,CMA验证发现18p11.32p11.21(136 285_15 143 614)x4:15Mb,即18号染色体p11.32p11.21区域存在15Mb重复,为18p四体综合征,其重复区域涉及SMCHD1、LPIN2、TGIF1等重要基因,可能导致发育迟缓、智力障碍、心脏及肾脏异常等严重问题;病例6:因21三体风险值1/109于孕19周行羊水穿刺,核型结果为46,XX,del(8)(q23.1q23.3),BoBs结果发现8q23.3区域存在缺失,随后CMA检测精确定位发现8号染色体q23.1q23.3区域缺失9.4Mb,该缺失区域包含TRPS1、EMC2、TRHR、NUDCD1、SYBU等13个OMIM基因,诊断该胎儿为TRPS I型综合征,孕妇在染色体核型分析、BoBs和CMA检测结果均异常并进行遗传咨询后选择终止妊娠,引产下胎儿可见明显异常,如毛发稀疏、梨状鼻、小下颌、短趾畸形等。

表 1 8 例微缺失/微重复综合征的检测结果

编号	年龄	孕周	产前诊断指征	核型结果	BoBs 结果	CMA 结果	FISH 结果
1	32	18	21 三体高风险	46,XX,del(X)(q27.3-q28)	46XX,Xq27.3 缺失	Xq27.2q28(140,508,944_155,233,098)x1:14.7Mb /	
2	25	24	神经管缺陷高风险	46,XY	46XY,7q11.2 重复	7q11.23(72,701,098_74,222,256)x3:1.5Mb /	
3	29	19	21 三体高风险	46,XY	46XY,Xp22.31 缺失	Xp22.31(6,455,151_8,141,076)x0:1.69Mb /	
4	30	25	18 三体高风险	46,XX,+mar	46XX,18p11.32p11.21 重复	18p11.32p11.21(136,285_15,143,614)x4:15Mb /	
5	27	25	双肾肾盂扩张	46,XX	46XX,22q11.2 缺失	/	22q11 缺失:92%
6	21	19	21 三体高风险	46,XX,del(8)(q23.1q23.3)	46XX,8q23.3 缺失	8q23.1q23.3(108,191,045_117,604,774)x1:9.4Mb /	
7	28	18	18 三体高风险	46,XY	46XY,Xp22.31 缺失	Xp22.31(6,501,987_8,068,902)x0:1.57Mb /	
8	36	25	B 超提示胎儿生长受限	46,XY	46XY,4p16.3 重复	4p16.3p15.2(68,345_24,886,024)x3:24.8Mb; 4q34.3q35.2(183,030,135_190,957,460)x1:7.9Mb	

3 讨论

目前,染色体疾病尚无有效地治疗方法,给家庭和社会带来沉重的经济负担,唯一可采取的途径是尽早进行遗传咨询及产前诊断。染色体核型分析是染色体疾病诊断的“金标准”,但其分辨率低,对 5 Mb 以下的染色体缺失/重复很难正确检出,可能存在一定的漏检风险。与传统染色体核型分析相比,BoBs 技术无需细胞培养、快速、高通量、准确性高,除了检测 5 种染色体非整倍体外,还可对 9 种常见的微缺失综合征进行检测,同时其覆盖的探针是已知疾病的关键区域,结果明确,易于解读,提高了产前诊断的效率,降低了遗传咨询的难度^[4-5]。LI 等^[6]、HUANG 等^[7]研究发现,BoBs 技术除了准确检出所有的染色体非整倍体,同时对微缺失/微重复综合征的检出能力明显优于染色体核型分析,是一种可选择稳定准确的新技术。

本研究利用 BoBs 技术对 1 549 份羊水进行快速检测,共发现微缺失/微重复 8 例,检出率为 0.52%,其中微缺失综合征 5 例,微重复综合征 3 例,同时产前 BoBs 结果与 FISH、CMA 验证结果完全一致,体现了该技术在微缺失/微重复综合征检测方面具有较高准确性及可靠性。此外,染色体核型分析仅检出 3 例,且缺失/重复区域均在 10 Mb 左右,联合 BoBs 技术扩大了 0.32% 的检出率,避免了一定的假阴性结果。本研究中微缺失/微重复的检出率较国内外报道偏低^[8-9],可能与微缺失/微重复综合征本身的发病率较低有关,其次目前检测的样本量不够大,可能存在一定范围的误差。

近年来,随着多重连接依赖探针扩增技术(multiplex ligation dependent probe amplification, MLPA)、荧光定量聚合酶链式反应(QF-PCR)、FISH、CMA、BoBs 等技术在临床上的广泛应用,越来越多的微缺失/微重复综合征胎儿被发现^[10-14]。目前临床上可作为微缺失综合征预测的产前高危因素包括特征性脏器畸形(主要为心脏畸形);宫内发育迟缓/姿态异常;羊水过多/过少;父母之一有明确微缺失综合征等。因此,当遇到染色体核型分析结果正常,应密切关注后期超声结果,一旦超声诊断异常,需考虑进行下一步检测排除微缺失/微重复等,必要时尽可能对胎儿父母样本进行分析,这对于染色体变异来源确定具有重要意义^[15]。

综上所述,BoBs 技术是一种敏感、可靠的检测技术,由于覆盖了更多疾病,对传统的染色体核型分析

进行了很好地补充和完善,在提高染色体异常检出率的同时缩短了检测时间,适合大量样本的快速处理,值得在临床中广泛推广及应用。

参考文献

- [1] AULA P, KARJALAINEN O, TERAMO K, et al. Safety and accuracy of midtrimester amniocentesis for prenatal diagnosis of genetic disorders [J]. *Ann Clin Res*, 1979, 11(4): 156-163.
- [2] 杨晓, 马宁, 彭薇, 等. 60 例精神发育迟滞/生长发育迟缓患儿的遗传学分析[J]. *中国计划生育学杂志*, 2018, 26(9): 823-826.
- [3] 罗俊, 邹彩艳, 徐芬, 等. 3p21.31 微缺失综合征 1 例报告并文献复习[J]. *中国儿童保健杂志*, 2017, 25(2): 214-216.
- [4] 李春艳, 燕凤, 黎昱, 等. BACs-on-Beads 技术对五例微缺失/微重复综合征的产前诊断[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2016, 24(10): 27-28.
- [5] HUANG H, ZHANG M, WANG Y, et al. Application of the BACs-on-Beads™ assay for rapid prenatal detection application of BoBs™ for PND of aneuploidies and microdeletions [J]. *Mol Reprod Dev*, 2018, 85(2): 146-154.
- [6] LI C, CHEN B, ZHENG J, et al. Prenatal diagnosis of BACs-on-Beads assay in 3647 cases of amniotic fluid cells [J]. *Reprod Sci*, 2018, 26(7): 1005-1012.
- [7] HUANG H, ZHANG M, WANG Y, et al. Application of the BACs-on-Beads™ assay for rapid prenatal detection application of BoBs™ for PND of aneuploidies and microdeletions [J]. *Mol Reprod Dev*, 2018, 85(2): 146-154.
- [8] GRATI FR, MOLINA GOMES D, FERREIRA JC, et al. Prevalence of recurrent pathogenic microdeletions and microduplications in over 9500 pregnancies [J]. *Prenat Diagn*, 2015, 35(8): 801-809.
- [9] 刘晓丹, 宋勤浩, 苗正友, 等. Bobs 技术在胎儿染色体异常产前诊断中的应用[J]. *中国计划生育学杂志*, 2018, 26(6): 439-442.
- [10] LEE D, NA S, PARK S, et al. Clinical experience with multiplex ligation-dependent probe amplification for microdeletions syndromes in prenatal diagnosis: 7522 pregnant Korean women [J]. *Mol Cytogenet*, 2019, 12: 10.
- [11] ZHANG D, ZHU Y, FENG X, et al. A novel case of global developmental delay syndrome with microdeletion at 10p14-p15.3 and microduplication at 18p11.31-p11.32 [J]. *Medicine(Baltimore)*, 2019, 98(15): e15146.
- [12] WAN S, ZHENG Y, DANG Y, et al. Prenatal diagnosis of 17q12 microdeletion and microduplication syndrome in fetuses with congenital renal abnormalities [J]. *Mol Cytogenet*, 2019, 12: 19.
- [13] ARICAN P, OLGAC DUNDAR N, OZYILMAZ B, et al. Chromosomal microarray analysis in children with unexplained developmental delay/intellectual disability [J]. *J Pediatr Genet*, 2019, 8(1): 1-9.
- [14] FANG Y, WANG G, GU L, et al. Application of karyotype analysis combined with BACs-on-Beads for prenatal diagnosis [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(4): 2895-2900.
- [15] 李春艳, 徐慧, 宋婷婷, 等. BACs-on-Beads 技术对 Wolf-Hirschhorn (4p-) 综合征的产前诊断[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2017, 25(5): 27-28.

(收稿日期: 2019-07-05)